

00582 (19)

**UNAM**  
**POSGRADO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS

**"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."**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(FARMACIA)

**P R E S E N T A:**

**M. en C. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

MÉXICO D.F.

298527

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis está 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***

<b>Presidente:</b>	Dra. Estela Sánchez Quintanar
<b>Primer Vocal:</b>	Dr. Leovigildo Quijano
<b>Segundo Vocal:</b>	Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez
<b>Tercer Vocal:</b>	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
<b>Secretario:</b>	Dr. Rogelio Pereda Miranda
<b>Primer Suplente:</b>	Dr. Manuel Jiménez Estrada
<b>Segundo Suplente:</b>	Dr. Miguel Ulloa Sosa

**TUTOR:**

---

Dra. Rachel Mata Essayag

**SUSTENTANTE:**

---

M. en C. Martha Lydia Macías Rubalcava

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes Instituciones:

- A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) UNAM; al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través de los proyectos 27978N, IN207300 y PADEP 207344 y 108321, respectivamente.
- Al CONACyT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (marzo de 1997 a septiembre de 1999) y al Sistema Nacional de Investigadores (SEP-CONACyT), por el nombramiento de ayudante de Investigador (octubre de 1999 a octubre del 2001).

También agradezco a los siguientes académicos por el apoyo brindado a lo largo de la realización de la presente investigación:

- Al los Drs. María del Carmen González y Miguel Ulloa del Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología UNAM, por proporcionar el hongo coprófilo del presente estudio. Así mismo agradezco las

## *Agradecimientos.*

facilidades proporcionadas por el Dr. Miguel Ulloa para realizar los cultivos en pequeña escala en su laboratorio.

- Al Ingeniero Abel Blancas de la Planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, por las facilidades proporcionadas para realizar los cultivos en mediana escala.
- Al Biólogo Samuel Aguilar (Departamento de Botánica, Instituto de Biología UNAM), a las M en C Isabel Rivero Cruz y Laura Acevedo Arteaga (Departamento de Farmacia Facultad de Química, UNAM) por su valiosa ayuda en varios aspectos técnicos a lo largo del desarrollo del presente trabajo de tesis.
- De manera especial a la Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología de la UNAM, por proporcionar la enzima NAD cinasa parcialmente purificada y por su invaluable asesoría en la determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina.
- A las M en C Isabel Chávez y Beatriz Quiroz (Instituto de Química, UNAM), y al M en C Atilano Gutiérrez (UAM, Iztapalapa) por el registro de espectros de RMN. A la QFB Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) por el registro de los espectros de DC. Al Dr. Rubén Alfredo Toscano (Instituto de Química, UNAM) por su colaboración en la determinación de la estructura química por rayos X del compuesto **109**. Al IQ. Luis Velasco Ibarra, al M en C Javier Pérez Flores (Instituto de Química, UNAM) y a la Q. Georgina Duarte (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros de masa. A la Química Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de espectros de IR y las determinaciones de rotación óptica. En

particular agradezco al personal técnico de los laboratorios de espectroscopia y espectrometría del Instituto de Química, por su valiosa ayuda técnica durante el periodo de huelga que afecto a la UNAM durante 1999.

- A los miembros de mi comité tutorial integrado por los Doctores Alfredo Ortega Hernández, Miguel Ulloa Sosa y Rogelio Pereda Miranda por el estímulo y recomendaciones brindados durante la realización de este proyecto de tesis.
- A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones, que sin duda enriquecieron la versión final de la tesis.
- A todos mis profesores y al Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme el valioso tesoro de la educación.

También deseo agradecer a los prestadores de Servicio Social del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia, en particular a Iliana Morales, Rafael García y Mayte Reyes y a mis compañeros del Laboratorio, por su ayuda desinteresada en todo momento.

De manera muy especial agradezco infinitamente a la Dra. Rachel Mata Essayag, creadora del presente proyecto e Investigadora de la Facultad de Química de la UNAM, por su invaluable dirección en la presente investigación, por todas sus enseñanzas y consejos que han contribuido grandemente en mi formación profesional y personal. Con profunda admiración y respeto agradezco la paciencia, el apoyo, la motivación y la confianza que me ha brindado a lo largo de mis estudios de Licenciatura y de Posgrado.

## ***DEDICATORIAS.***

# ÍNDICE.

	Página
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	IX
<i>LISTA DE CUADROS</i>	XV
<i>LISTA DE ESPECTROS</i>	XIX
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	XXI
<i>RESUMEN</i>	XXIII
<i>ABSTRACT</i>	XXVII
<i>I. INTRODUCCIÓN.</i>	1
<i>II. ANTECEDENTES.</i>	17
<i>1. MICROORGANISMOS COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES HERBICIDAS.</i>	17
<i>2. ANTECEDENTES GENERALES DEL HONGO COPRÓFILO <i>GUANOMYCES POLYTHRIX</i>.</i>	41
<i>3. GENERALIDADES SOBRE LA PROTEÍNA CALMODULINA Y SOBRE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CALMODULINA.</i>	44
<i>4. METABOLITOS SECUNDARIOS QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA CALMODULINA.</i>	55



	Página
<b>III. HIPÓTESIS.</b>	<b>59</b>
<b>IV. OBJETIVOS.</b>	<b>61</b>
<b>1.OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>61</b>
<b>2. OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	<b>61</b>
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL.</b>	<b>65</b>
<b>1. MATERIAL FÚNGICO.</b>	<b>65</b>
<b>2. ENSAYOS BIOLÓGICOS.</b>	<b>65</b>
2.1 <i>Ensayos de competencia directa.</i>	<b>65</b>
2.2 <i>Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos y compuestos puros aislados a partir de las fracciones activas.</i>	<b>66</b>
2.3 <i>Bioautografía directa para el monitoreo de la actividad fitotóxica de las fracciones.</i>	<b>67</b>
2.4 <i>Determinación de la interacción de los compuestos puros con la proteína calmodulina.</i>	<b>68</b>
2.4.1 <i>Eletroforésis desnaturalizante.</i>	<b>68</b>
2.4.2 <i>Cromatografía de afinidad.</i>	<b>69</b>
2.5. <i>Determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina.</i>	<b>76</b>
2.5.1 <i>Obtención de la enzima.</i>	<b>76</b>
2.5.2 <i>Determinación del contenido total de proteínas en los extractos crudos de enzima NAD cinasa.</i>	<b>77</b>

	Página
2.5.3 <i>Determinación de la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.</i>	79
2.5.4 <i>Obtención de la curva estándar de NADP.</i>	80
2.5.5 <i>Determinación del efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina.</i>	81
2.5.6 <i>Determinación del efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de calmodulina.</i>	81
2.5.7 <i>Determinación del efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.</i>	83
<b>3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO COPRÓFILO <b>GUANOMYCES POLYTHRIX.</b></b>	<b>83</b>
<b>4. OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA.</b>	<b>85</b>
4.1. <i>Cultivo con agitación.</i>	85
4.2. <i>Cultivo estático.</i>	86
<b>5. ESTUDIO QUÍMICO.</b>	<b>87</b>
5.1 <i>Procedimientos generales de análisis.</i>	87
5.1.1. <i>Métodos cromatográficos.</i>	87
5.1.2. <i>Caracterización de los metabolitos activos.</i>	88
5.1.2.1 <i>Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.</i>	88

	Página
5.2. <i>Fraccionamiento biodirigido.</i>	88
5.2.1. <i>Extracto del cultivo con agitación.</i>	88
5.2.1.1 <i>Separación y purificación de los metabolitos secundarios.</i>	90
5.2.1.1.1 <i>Obtención los compuestos (101) y (109).</i>	90
5.2.1.1.2 <i>Obtención de los compuestos (102)-(106).</i>	90
5.2.1.1.3 <i>Obtención de los compuestos (107), (108), (111), y (113).</i>	92
5.2.1.1.4 <i>Obtención de la emodina (110).</i>	94
5.2.1.1.5 <i>Obtención de la citrinina (114).</i>	95
5.2.2 <i>Extracto del cultivo estático.</i>	95
5.2.2.1 <i>Separación y purificación de los metabolitos secundarios.</i>	96
5.2.2.1.1 <i>Obtención de los compuestos (102)-(106).</i>	96
5.2.2.1.2 <i>Obtención de los compuestos (107), (108), (111), y (113).</i>	97
5.2.2.1.3 <i>Obtención del compuesto (109).</i>	99
5.2.2.1.4 <i>Obtención de la emodina (110).</i>	99
5.2.2.1.5 <i>Obtención de los compuestos (114) y (112).</i>	99

	Página
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>101</b>
<b>1. SELECCIÓN PRIMARIA DE <i>GUANOMYCES POLYTHRIX</i>.</b>	<b>101</b>
<b>2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO.</b>	<b>103</b>
<b>3. AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS BIODINÁMICOS.</b>	<b>108</b>
3.1 <i>Cultivo con agitación.</i>	<b>108</b>
3.2 <i>Cultivo estático.</i>	<b>111</b>
<b>4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO.</b>	<b>112</b>
<b>5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS EXTRAXTOS ACTIVOS.</b>	<b>115</b>
5.1 <i>Caracterización de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [101] y de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [105].</i>	<b>116</b>
5.2 <i>Caracterización de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [102] y de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [106].</i>	<b>131</b>
5.3 <i>Caracterización de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3 dihidronaftopirona [103] y de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3 dihidronaftopirona [104].</i>	<b>132</b>
5.4 <i>Caracterización de la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108).</i>	<b>134</b>
5.5 <i>Caracterización de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).</i>	<b>135</b>
5.6 <i>Caracterización de la rubrofusarina B (107), la emodina (110), el metilparaben (111), el ácido-4-hidroxibenzoico (112), el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (113) y la citrinina (114).</i>	<b>139</b>

	Página
<b>6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.</b>	<b>140</b>
6.1 <i>Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico.</i>	140
6.2 <i>Interacción de los principios fitotóxicos puros con calmodulinas de espinaca y de cerebro de bovino.</i>	144
6.3 <i>Determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina.</i>	156
6.3.1 <i>Purificación parcial de la enzima NAD cinasa.</i>	157
6.3.2 <i>Viabilidad de la preparación enzimática.</i>	157
6.3.3 <i>Efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de las enzimas NAD cinasa en ausencia de calmodulina y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.</i>	160
6.3.4 <i>Efecto de las fitotoxinas sobre la habilidad de la calmodulina para activar la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina.</i>	165
6.3.4.1 <i>Efecto de los compuestos 101, 102, 105 y 106 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina en presencia calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino.</i>	165
6.3.4.2 <i>Efecto de los compuestos 107, 108, 111 y 112 sobre la actividad de la enzima NADcinasa dependiente de calmodulina en presencia calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino.</i>	168
6.3.4.3 <i>Efecto de los compuestos 109, 110 y 113 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina en presencia calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino.</i>	170
6.3.4.4 <i>Efecto de la citrinina (114) sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de calmodulina en presencia de calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino.</i>	172

<b>VII. RESUMEN Y CONCLUSIONES.</b>	<b>183</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS.</b>	<b>189</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>191</b>
<b>X. APÉNDICE I.</b>	<b>207</b>
<b>XI. APÉNDICE II.</b>	<b>225</b>

# LISTA DE FIGURAS.

	Página
<b>Figura 1.</b> Representación de tres posibles mecanismos para el desarrollo de resistencia a los herbicidas comerciales. A) Sitio activo normal, B) Alteración en el blanco de acción por modificación en la conformación del receptor, C) modificación de la conformación estructural de la enzima blanco, y D) sobreproducción del sitio de acción.	24
<b>Figura 2.</b> Hongo coprófilo <i>Guanomyces polythix</i> en cultivo de agar de papa-dextrosa.	41
<b>Figura 3.</b> <i>Guanomyces polythix</i> . (a) ascoma inmaduro tomado de una colonia de 4 días de crecimiento, (b) ascoma con cuello largo ornamentado con pelos laterales, tomado de una colonia de 7 días de crecimiento, (c) amplificación de los pelos laterales glandulares (d) ascoma maduro con gotas de líquido en los pelos del cuello largo lateral glandular y (f) vista de la punta cuello ostiolar con gotas de líquido.	43
<b>Figura 4.</b> Estructura del complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$ tomada de estudios recientes de RMN y de difracción de rayos X. (A) La molécula de calmodulina tiene forma de un balancín gimnástico, con dos lóbulos en cada una de sus extremidades, conectados a lo largo de una $\alpha$ hélice. En cada punta hay dos dominios de unión al $\text{Ca}^{2+}$ y cada uno de los lóbulos está formado por 12 residuos de aminoácidos de los cuales los ácidos aspártico y glutámico se encuentran en los extremos formando uniones iónicas con el $\text{Ca}^{2+}$ . Los dominios de unión al $\text{Ca}^{2+}$ tienen diferente afinidad al catión. Los dos sitios de afinidad al $\text{Ca}^{2+}$ en el carboxilo terminal de la proteína tienen diez veces más afinidad que los dos del amino terminal (B). Cambio conformacional de la proteína calmodulina provocado por la unión del complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$ a una proteína blanco (C).	47

	<b>Página</b>
<b>Figura 5.</b> Procesos de transducción de señales mediados por el complejo Ca <sup>2+</sup> -calmodulina en plantas.	<b>49</b>
<b>Figura 6.</b> Formación del NADP a partir del NAD.	<b>52</b>
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de reacción propuesto para la interacción de la ofiobolina A y el grupo ε-amino de los residuos de lisina de la proteína calmodulina. El producto de la reacción es una enamina conjugada, formada por un arreglo tautomérico de la base de Schiff inicial.	<b>57</b>
<b>Figura 8 .</b> Curva estándar de NADP. Cada punto representan la media de tres réplicas independientes.	<b>82</b>
<b>Figura 9.</b> Velocidad de reacción en mM de NADP min <sup>-1</sup> para diferentes concentraciones de NADP.	<b>82</b>
<b>Figura 10.</b> Desplazamientos químicos y multiplicidad comparativa de los protones H-2 y H-3 de las dihidronaftopirona <b>101</b> y <b>105</b> .	<b>118</b>
<b>Figura 11.</b> Correlaciones de C-4 con H-2, H-3 y CH <sub>3</sub> -3 en el espectro de HMBC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [ <b>101</b> ].	<b>119</b>
<b>Figura 12.</b> Correlaciones de C-2/H-3, CH <sub>3</sub> -2, CH <sub>3</sub> -3 y C-3/CH <sub>3</sub> -3, CH <sub>3</sub> -2 en el espectro de HMBC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [ <b>101</b> ].	<b>120</b>
<b>Figura 13.</b> Correlación homonuclear de los protones CH <sub>3</sub> -3 y OH-5 en el espectro NOESY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [ <b>101</b> ].	<b>121</b>
<b>Figura 14 .</b> Correlaciones de C-5a, C-9/H-7; C-5a C-7, C-10/H-9 y C-4a, C-5a, C-9/10, en el espectro de HMBC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [ <b>101</b> ].	<b>122</b>
<b>Figura 15 .</b> Espectro de dicroísmo circular de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [ <b>101</b> ].	<b>124</b>



	Página
<b>Figura 16.</b> Multiplicidad comparativa para las señales asignadas a los hidrógenos de las posiciones 2 y 3 de las moléculas <b>101</b> y <b>103</b> .	133
<b>Figura 17.</b> Espectro de HMBC (500, MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona ( <b>109</b> ).	138
<b>Figura 18.</b> Vista estereoscópica de la 1-hidroxi-8-metoxicarbonil-3-metilxantona ( <b>109</b> ).	139
<b>Figura 19.</b> Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 µg de calmodulina y 2 µL de CaCl <sub>2</sub> 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + ( 0.033 µg/mL quercetina en DMSO), I ( <b>101</b> ), II ( <b>102</b> ), III ( <b>103</b> ), IV ( <b>104</b> ), V ( <b>105</b> ), VI ( <b>106</b> ), VII ( <b>107</b> ) y VIII ( <b>108</b> ). En todos los casos se aplicaron 0.033 µg/mL de compuesto en DMSO.	146
<b>Figura 20.</b> Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 µg de calmodulina y 2 µL de EGTA 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + ( 0.033 µg/mL quercetina en DMSO), I ( <b>101</b> ), II ( <b>102</b> ), III ( <b>103</b> ), IV ( <b>104</b> ), V ( <b>105</b> ), VI ( <b>106</b> ), VII ( <b>107</b> ) y VIII ( <b>108</b> ). En todos los casos se aplicaron 0.033 µg/mL de compuesto en DMSO.	147
<b>Figura 21.</b> Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 µg de calmodulina y 2 µL de CaCl <sub>2</sub> 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + ( 0.033 µg/mL quercetina en DMSO), IX ( <b>109</b> ), X ( <b>110</b> ), XI ( <b>111</b> ), XII ( <b>112</b> ), XIII ( <b>113</b> ) y XVI ( <b>114</b> ). En todos los casos se aplicaron 0.033 µg/mL de compuesto en DMSO.	148

	<b>Página</b>
<b>Figura 22.</b> Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 µg de calmodulina y 2 µL de EGTA 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + ( 0.033 µg/mL quercetina en DMSO), IX (109), X (110), XI (111), XII (112), XIII (113) y XVI (114). En todos los casos se aplicaron 0.033 µg/mL de compuesto en DMSO.	<b>149</b>
<b>Figura 23.</b> Reacciones bioquímicas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM	<b>158</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto de la concentración de CaM de espinaca, sobre la actividad de la enzima NAD cinasa de chícharo. Cada punto representan la media de tres réplicas independientes.	<b>159</b>
<b>Figura 25.</b> Actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia de diferentes concentraciones de CaM de espinaca o de cerebro de bovino y ATP (3 mM) y NAD (2mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>160</b>
<b>Figura 26.</b> Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 101-114 o de quercetina. Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>161</b>
<b>Figura 27.</b> Actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos fitotóxicos 101, 102, y 105-108 y concentraciones saturantes ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>162</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 28.</b> Actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos fitotóxicos <b>109-114</b> y concentraciones saturantes ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>163</b>
<b>Figura 29.</b> Actividad de la enzima NAD en ausencia de CaM y en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas <b>103, 104</b> o de quercetina y de concentraciones saturantes de ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>164</b>
<b>Figura 30.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas <b>101, 102, 105</b> y <b>106</b> y de concentraciones saturantes de CaM de espinaca (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>166</b>
<b>Figura 31.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas <b>101, 102, 105</b> y <b>106</b> y de concentraciones saturantes de CaM de cerebro de bovino (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>168</b>
<b>Figura 32.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas <b>107, 108, 111,</b> y <b>112</b> y de concentraciones saturantes de CaM de espinaca (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>169</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 33.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 107, 108, 111, y 112 y de concentraciones saturantes de CaM de cerebro de bovino (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>170</b>
<b>Figura 34.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 109, 110, y 113 y de concentraciones saturantes de CaM de espinaca (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>171</b>
<b>Figura 35.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 109, 110, y 113 y de concentraciones saturantes de CaM de cerebro de bovino (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>172</b>
<b>Figura 36.</b> Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de citrinina (114) y de concentraciones saturantes de CaM (2µg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.	<b>173</b>

## LISTA DE CUADROS.

	Página
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos.	3
Cuadro 2. Clasificación y ejemplos de herbicidas sintéticos.	20
Cuadro 3. Ejemplos de herbicidas sintéticos pertenecientes a los principales grupos de herbicidas comerciales.	22
Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos.	28
Cuadro 5. Composición química (aminoácidos) de la calmodulina de cerebro de bovino y de seis especies vegetales.	45
Cuadro 6. Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%).	70
Cuadro 7. Resultados obtenidos en la realización de las curvas estándar de cada uno de los metabolitos fitotóxicos, aislados a partir del hongo coprófilo <i>Guanomyces polythrix</i> .	71
Cuadro 8. Resultados obtenidos para la curva estándar (albúmina sérica bovina) realizada para determinar el contenido de proteínas en el extracto crudo de enzima NADcinasa aislada a partir de plántulas de chícharo.	78
Cuadro 9. Determinación del contenido de proteínas de los diferentes extractos proteínicos con actividad de NADcinasa aislados a partir de plántulas de chícharo.	78
Cuadro 10. Medios de cultivo empleados para el desarrollo del hongo coprófilo <i>Guanomyces polythrix</i> .	84
Cuadro 11. Fraccionamiento preliminar del extracto obtenido a partir del cultivo con agitación.	89

*Lista de Cuadros.*

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 12.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FV <sub>A</sub> <sup>a</sup> .	<b>91</b>
<b>Cuadro 13.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa FVI <sub>A</sub> <sup>a</sup> .	<b>93</b>
<b>Cuadro 14.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FVII <sub>A</sub> <sup>a</sup> .	<b>94</b>
<b>Cuadro 15.</b> Fraccionamiento primario del extracto obtenido a partir del cultivo estático.	<b>96</b>
<b>Cuadro 16.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción FV <sub>E</sub> <sup>a</sup> .	<b>97</b>
<b>Cuadro 17.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción FVI <sub>E</sub> <sup>a</sup> .	<b>98</b>
<b>Cuadro 18.</b> Hongos fitopatógenos utilizados en los bioensayos de antagonismo directo.	<b>102</b>
<b>Cuadro 19.</b> Ensayos de competencia directa entre el hongo coprófilo <i>Guanomyces polythrix</i> y cinco especies diferentes de hongos fitopatógenos.	<b>103</b>
<b>Cuadro 20.</b> Comparación de los rendimientos obtenidos en cada uno de los medios de cultivo.	<b>104</b>
<b>Cuadro 21.</b> Comparación del efecto fitotóxico de cada uno de los extractos obtenidos.	<b>106</b>
<b>Cuadro 22.</b> Comparación de los rendimientos obtenidos para los cultivos estáticos y con agitación.	<b>107</b>
<b>Cuadro 23.</b> Comparación del efecto fitotóxico de los extractos obtenidos con agitación y estáticamente.	<b>108</b>
<b>Cuadro 24.</b> Condiciones óptimas de crecimiento de <i>Guanomyces polythrix</i> .	<b>108</b>
<b>Cuadro 25.</b> Desarrollo del cultivo en mediana escala con agitación.	<b>109</b>
<b>Cuadro 26.</b> Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y del micelio generados del cultivo con agitación.	<b>110</b>

	Página
Cuadro 27. Rendimientos del cultivo con agitación.	110
Cuadro 28. Rendimientos del cultivo estático.	111
Cuadro 29. Efecto fitotóxico de los extractos del cultivo estático.	112
Cuadro 30. Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo <i>Guanomyces polythrix</i> .	113
Cuadro 31. Constantes físicas de los compuestos 101, 102, 103, 104, 106, 106 y 108.	125
Cuadro 32. Constantes espectroscópicas de UV, IR, DC y espectrométricas (EM-IE <i>m/z</i> ) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 106, 106 y 108.	126
Cuadro 33. Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.	127
Cuadro 34. Datos espectroscópicos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.	128
Cuadro 35. Correlaciones observadas en los espectros NOESY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.	129
Cuadro 36. Correlaciones observadas en los espectros HMBC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.	130
Cuadro 37. Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) y de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetilnaftopirona (108).	135
Cuadro 38. Constantes espectroscópicas de IR, de UV y espectrométricas de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (109).	136
Cuadro 39. Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) y de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona (109).	137

*Lista de Cuadros.*

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 40.</b> Efecto fitotóxico de los metabolitos aislados del hongo coprófilo <i>Guanomyces polythrix</i> .	<b>141</b>
<b>Cuadro 41.</b> Cantidad de metabolito fitotóxico retenido en la columna de afinidad (agarosa-calmodulina de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales.	<b>150</b>
<b>Cuadro 42.</b> Cantidad total de fitotoxina retenida o liberada de la columna de afinidad (agarosa-calmodulina de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales.	<b>153</b>
<b>Cuadro 43.</b> Porcentajes de máxima inhibición de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de $1.2 \times 10^{-4}$ M de fitotoxina (máxima concentración utilizada).	<b>174</b>
<b>Cuadro 44.</b> Concentración inhibitoria media de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.	<b>177</b>
<b>Cuadro 45.</b> Concentración máxima de NADP producida por la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de las fitotoxinas aisladas.	<b>180</b>



## LISTA DE ESPECTROS.

	Página
<b>Espectro 1.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [101].	209
<b>Espectro 2.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [101].	210
<b>Espectro 3.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8,10,-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [102].	211
<b>Espectro 4.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [102].	212
<b>Espectro 5.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (103).	213
<b>Espectro 6.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (103).	214
<b>Espectro 7.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3 dihidronaftopirona (104).	215
<b>Espectro 8.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> )-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3 dihidronaftopirona (104).	216
<b>Espectro 9.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [105].	217
<b>Espectro 10.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [105].	218

*Lista de Espectros.*

	<b>Página</b>
<b>Espectro 11.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-5-hidroxi-6,8,10,-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [106].	<b>219</b>
<b>Espectro 12.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [106].	<b>220</b>
<b>Espectro 13.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108).	<b>221</b>
<b>Espectro 14.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108).	<b>222</b>
<b>Espectro 15.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).	<b>223</b>
<b>Espectro 16.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).	<b>224</b>

## ***LISTA DE ABREVIATURAS.***

2,4-D,	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ATP	Adenosina trifosfato
ANOVA	Análisis de varianza
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> OH	Alcohol metílico
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitorio media
COSY	Correlation system (espectroscopia bidimensional de correlación homonuclear)
d	Doble
dd	Doble de dobles
DC	Dicroísmo circular
DEPT	Desacoplate enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
DMSO	Dimetilsulfóxido
dqd	Doble de cuádruples dobles
EGTA	(ácido tetraacético etilen glicol-bis β-aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i>
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation (espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
<i>m/z</i>	Unidades de masa carga
MHZ	Megahertz
NAD	Dinucléotido de nicotinamida
NADP	Fosfato de dinucléotido de nicotinamida oxidado
NADPH	Fosfato de dinucléotido de nicotinamida reducido

### *Lista de Abreviaturas.*

nm	Nanómetros
NOESY	Efecto nuclear de Overhauser
p.f	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
R <sub>f</sub>	Factor de retención
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RNM <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecilsulfato de sodio
t	triple
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta.
δ	Desplazamientos químicos.
λ <sub>max</sub>	Longitud de onda de máxima absorción.

## RESUMEN.

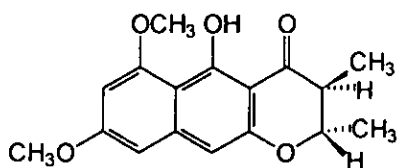
El presente trabajo doctoral describe el estudio de los productos naturales generados por cultivos estáticos y en agitación del nuevo hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* González, Hanlin y Ulloa, seleccionado mediante un criterio ecológico como una fuente potencial de fitotoxinas con un efecto inhibitorio específico sobre la proteína reguladora calmodulina.

El hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* se aisló a partir del guano del murciélago *Leptonycteris hivalis*, de la Zona III de la Cueva del Diablo, situada en Tepoztlán, estado de Morelos, México, en febrero de 1978.

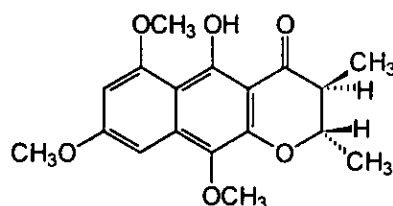
El estudio químico biodirigido de los extractos activos, preparados a partir del medio de cultivo y del micelio del hongo, permitió el aislamiento y la purificación de catorce metabolitos secundarios, incluyendo siete derivados novedosos caracterizados como: la (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (101), la (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (102), la (+)-(2*S*)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (103), la (+)-(2*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (104), la (+)-(2*S*,3*R*)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (105), la (+)-(2*S*,3*R*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (106) y la 5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-naftopirona (108). De manera adicional, se obtuvo una xantona [8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-

**Resumen.**

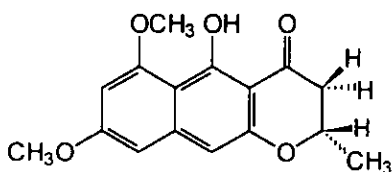
metilxantona (109)] y seis compuestos conocidos: la rubrofusarina B (107), la emodina (110), el metilparabeno (111), el ácido-4-hidroxibenzoico (112), el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (113), y la citrinina (114). La elucidación estructural de los nuevos compuestos se realizó por métodos espectroscópicos, espectrométricos y quiroópticos. En el caso de la santona 109, la estructura se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X.



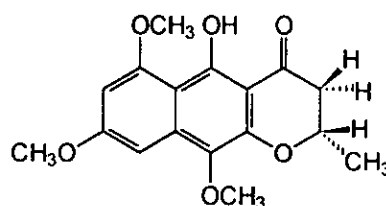
**101**



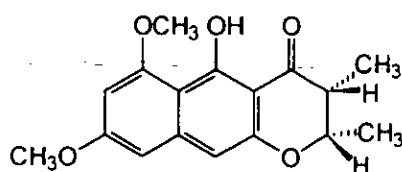
**102**



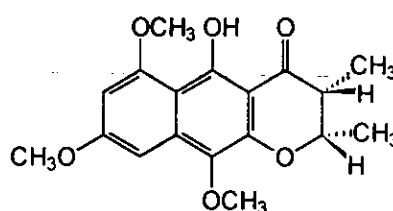
**103**



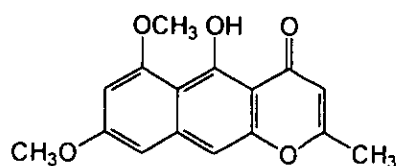
**104**



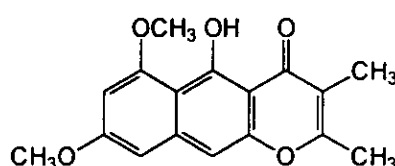
**105**



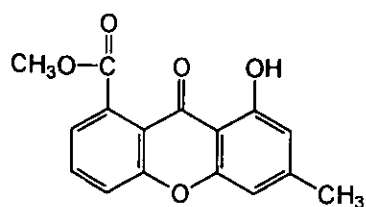
**106**



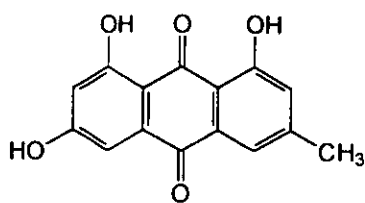
**107**



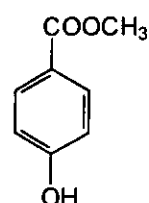
**108**



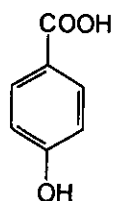
109



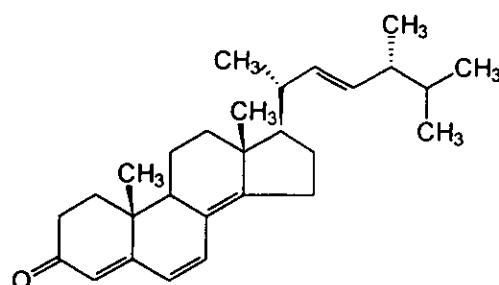
110



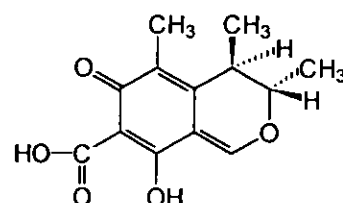
111



112



113



114

La determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la germinación y el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* permitió establecer que todos los metabolitos presentan propiedades fitotóxicas significativas. La xantona (109) demostró un marcado efecto inhibitor sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli*. El proceso de germinación no se afectó considerablemente en presencia de los metabolitos fúngicos.

La interacción de las fitotoxinas con la proteína calmodulina tanto de espinaca como de cerebro de bovino se determinó mediante una electroforesis (SDS-PAGE al 12%) en ausencia y en presencia de calcio. En general, todas las fitotoxinas modifican la movilidad electroforética de ambas calmodulinas, en particular los compuestos 102 y 106 retardaron notablemente la movilidad electroforética de las dos proteínas. El retardo en la movilidad electroforética de la calmodulina provocado por las fitotoxinas fue mayor en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## *Resumen.*

Se realizó una cromatografía de afinidad sobre agarosa unida a calmodulina de cerebro de bovino. Este análisis permitió corroborar que la unión entre las fitotoxinas 101-108, 110 y 113 y la calmodulina de cerebro de bovino es irreversible, en tanto que los compuestos 109, 111 y 112 se unen a la proteína de manera reversible. Por último, la citrinina (114) presenta una interacción parcialmente reversible ya que es retenida en la columna en un 60 %.

A continuación se determinó el efecto de los compuestos fitotóxicos sobre las propiedades activadoras enzimáticas de la calmodulina, utilizando como enzima blanco la NAD cinasa dependiente de calmodulina, aislada de chícharo. La estrategia experimental utilizada se estandarizó como parte del desarrollo del presente trabajo. La aplicación de este método experimental con las fitotoxinas aisladas del hongo *Guanomyces polythrix* permitió establecer que las 2,3-dihidronaftopironas novedosas 101, 102, 105 y 106, con grupos metilos en C-2 y C-3, inhiben específicamente la habilidad de la calmodulina de espinaca para activar la NAD cinasa dependiente de calmodulina.



## ABSTRACT.

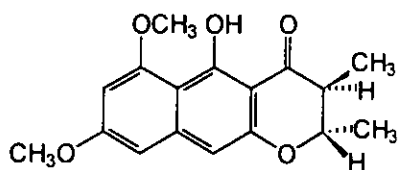
As a part of our search for potential herbicide agents from natural sources, it was found that the organic extracts prepared from the culture broth and mycelium of the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix* showed phytotoxic activity when evaluated on radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli* using the Petri dish assay.

*Guanomyces polythrix* is a species related to the genus *Chaetomium* (Chaetomiaceae). Morphological, physiological and molecular studies on this fungus revealed that it belongs to a new genus. The new fungus was isolated in 1978 from guano of the bat *Leptonycteris hivalis* obtained from zone III of the cave "Cueva del Diablo" or "Ocotlitlán", in Tepozotlán, Morelos, México.

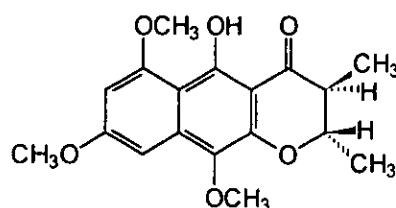
Bioactivity-guided fractionation of the phytotoxic extract led to the isolation of fourteen phytotoxins., including seven new naphthopyranone derivatives, namely (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydronaphthopyrone (**101**), (2*S*,3*S*) -5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydronaphthopyrone (**102**), (2*S*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-2,3-dihydronaphthopyrone (**103**), (2*S*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2-methyl-2,3-dihydronaphthopyrone (**104**), (2*S*,3*R*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydronaphthopyrone (**105**), (2*S*,3*R*) -5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydronaphthopyrone (**106**) and 5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-naphthopyrone (**108**). In addition, 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester

*Abstract.*

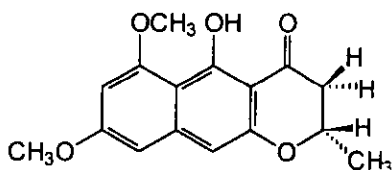
(109) and the known compounds rubrofusarin B (107), emodin (110), 4-hydroxybenzoic acid methyl ester (111), 4-hydroxybenzoic acid. (112), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (113) and citrinin (114), were obtained. The structures of the new compounds were established by spectral and chiroptical methods. The structure of compound 109 was unambiguously determined by X-ray analysis.



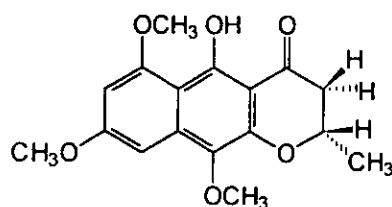
101



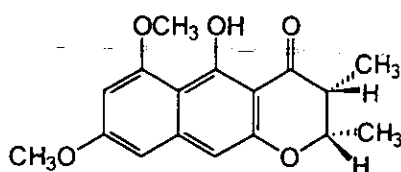
102



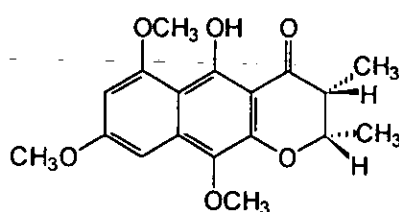
103



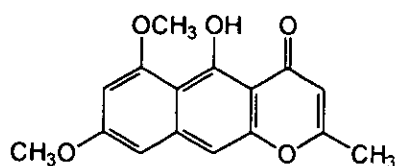
104



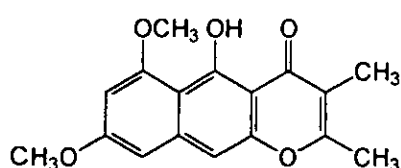
105



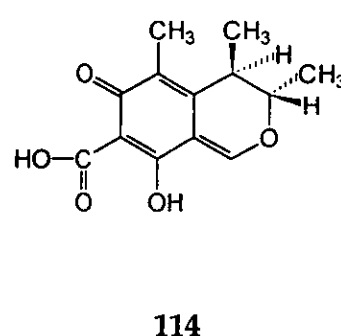
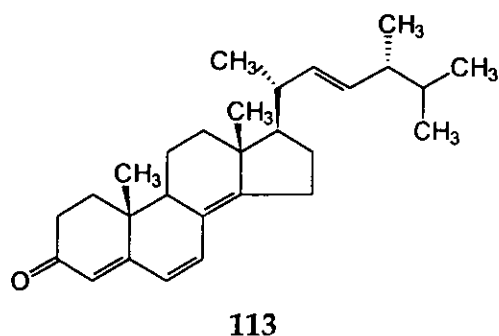
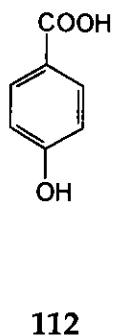
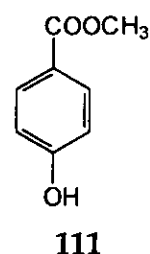
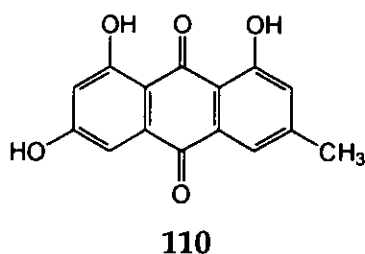
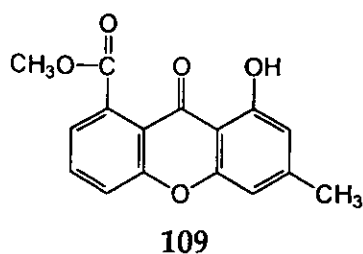
106



107



108



Compounds **101-114** were evaluated for their ability to inhibit seed germination and seedling growth of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*. In general, the tested compounds showed significant phytotoxic effect. However, the phytotoxins were more potent as radical growth inhibitors than as germination inhibitors. The fourteen compounds reduced the radicle growth of both target species in a concentration-dependent manner. Compounds **101-108** and **111-112** were most active against *A. hypochondricus*. However, *E. crusgalli* was most sensitive to compound **109** ( $IC_{50} = 9.8 \times 10^{-6}$  M).

Once the phytotoxic activity of the compounds was evaluated, their effect on calmodulin was established. The first assay conducted was a SDS-PAGE electrophoresis. In this type of experiment the interaction of any compound with calmodulin is determined by observing the change in the electrophoretic mobility of the protein in the presence of  $Ca^{2+}$  or (EGTA) and the compound. This

**Abstract.**

experiment was performed with two types of calmodulin (spinach and bovine brain). In general, all the phytotoxins affected the mobility of both calmodulins, in particular the novel dihydronaphthopyrones **102** and **106**. In general, the electrophoretic mobility was more affected in the presence of calcium.

To obtain more information about the nature (covalent *vs* noncovalent) of the interaction of compounds **101-114** with calmodulin, an affinity-based chromatographic procedure employing a bovine brain calmodulin-agarose column was used. The interaction of compounds **101-108**, **110** and **113** with bovine brain calmodulin is irreversible. However the interaction of compounds **109**, **111**, **112** and quercetin, is reversible. Finally, compound **114** showed a different elution profile and almost half of the phytotoxin remains attached to the calmodulin-agarose matrix after eluting in different conditions.

In order to establish if the interaction of the phytotoxins with calmodulin modifies its enzyme activator properties, and consequently its physiological role, an enzymatic procedure using calmodulin sensitive NAD kinase as a reporter enzyme was standardized. By using this method the ability of different concentrations of each phytotoxin to prevent the stimulation of the kinase in the presence of saturating concentration of calmodulin (spinach or bovine brain) was investigated. After processing the experimental data it was found that the dihydronaphthopyrone **101**, **102**, **105** and **106** inhibit selectively the ability of spinach calmodulin to activate the enzyme NADkinase.

# I. INTRODUCCIÓN.

Los hongos coprófilos son aquellos que colonizan el estiércol de una gran variedad de animales vertebrados. Estos microorganismos poseen ciclos de vida únicos y se caracterizan por su extraordinaria adaptación a los sustratos que habitan, misma que es considerada como el resultado de la acción que ejercen los productos de su metabolismo secundario sobre sus competidores naturales (Ikediugwu y Webster, 1970; Singh y Webster, 1973; Gloer, 1995; *inter alia*). Estudios recientes sobre numerosos géneros de organismos coprófilos han demostrado los efectos inhibitorios inducidos por estos hongos hacia diversos hongos competidores, tanto a corta como a larga distancia (Gloer y Truckenbrod, 1988; Weber *et al.*, 1990; Weber, 1991; Weber y Gloer, 1991; Wang *et al.*, 1993; Alfatafta *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Gloer, 1995; *inter alia*).

Las investigaciones químicas y biológicas conducidas sobre varios hongos coprófilos han permitido evidenciar que estos organismos constituyen una fuente distintiva y extremadamente rica de productos naturales con actividad biológica. Los metabolitos aislados incluyen un número considerable de agentes antifúngicos novedosos entre los que destacan algunos péptidos, varios policétidos, diferentes terpenoides y un gran número de metabolitos de origen biogenético mixto (Weber *et al.*, 1990; Weber, 1991; Weber y Gloer, 1991; Weber *et al.*, 1992; Wicklow, 1992a; Wicklow, 1992b; Wang *et al.*, 1993; Gloer, 1995; Whyte *et al.*, 1996 *inter alia*). En el Cuadro 1 se muestran algunos de los compuestos con actividad biológica aislados

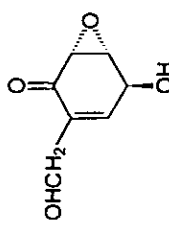
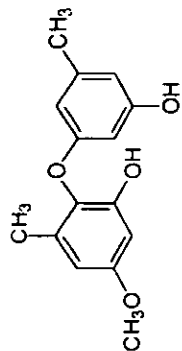
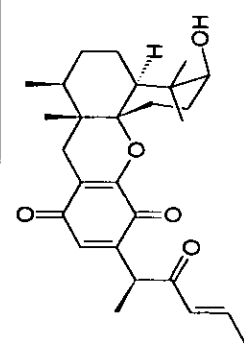
## ***I. Introducción.***

a partir de hongos coprófilos. Algunos de los metabolitos obtenidos están relacionados estrechamente con compuestos conocidos, sin embargo, la mayoría de ellos presentan características estructurales novedosas, lo cual podría incidir en el hallazgo de nuevos metabolitos biodinámicos incluyendo herbicidas con blancos de acción muy específicos (Dayan *et al.*, 2000; Evidente y Motta, 2001).

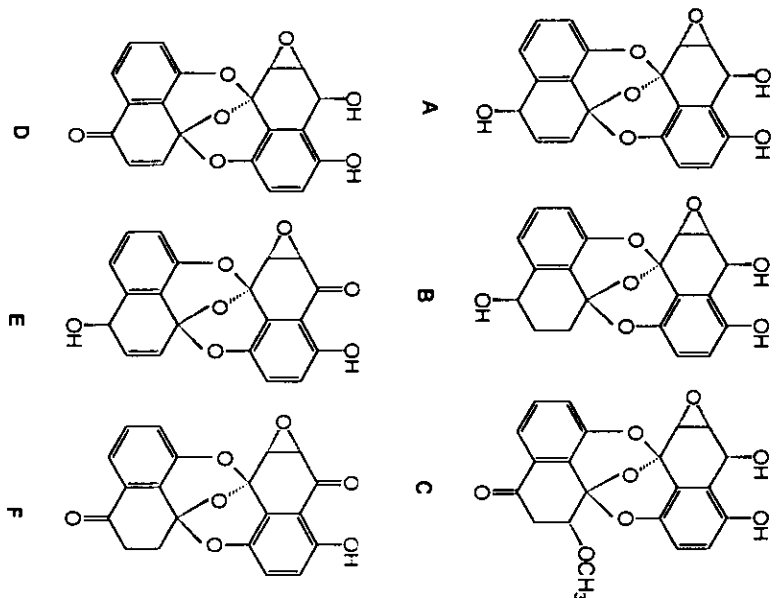
Según Gloer (1995), el potencial que ofrecen los hongos coprófilos como una fuente de principios biodinámicos ha sido poco investigada a nivel mundial. Específicamente, en México no se han realizado estudios sobre este tipo de microorganismos.

En este contexto, el presente proyecto de investigación se inicio con la intención de obtener fitotoxinas con un efecto inhibitor específico sobre la proteína reguladora calmodulina y la enzima NADcinasasa dependiente de calmodulina a partir del nuevo hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* González, Hanlin y Ulloa, seleccionado de acuerdo a los criterios convencionales y con un potencial fitotóxico demostrado mediante evaluaciones biológicas preliminares.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos.

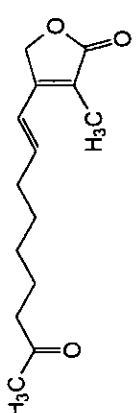
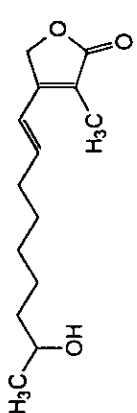
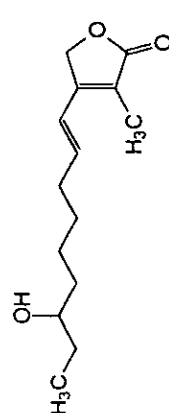
PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 (+)-Isoepoxidón (1)	<i>Poronia punctata</i>	Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i> .	Wicklow y Hirschfield, 1979b; Wicklow, 1992b; Weber y Gloer, 1988.
 Éter 2,3'-dihidroxi-4-metoxi-5',6'-dimetil difenílico (2)	<i>Preussia fleischhakeri</i>	Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i> .	Wicklow y Hirschfield, 1979b; Wicklow, 1992b; Weber y Gloer, 1988.
 Podosporina A (3)	<i>Podospora decipiens</i>	Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> , <i>Sordaria fimicola</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	Wicklow y Hirschfield, 1979b; Wicklow, 1992b; Weber <i>et al.</i> , 1988.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

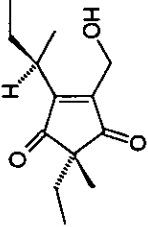
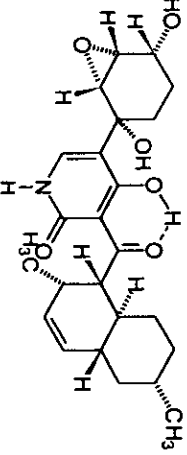
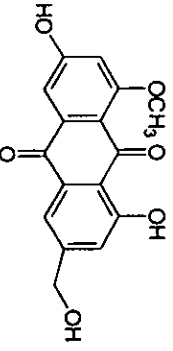
PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p data-bbox="264 331 340 631">Preussomerinas A-F (4), (5), (6) (7), (8) y (9)</p>	<p data-bbox="748 818 778 1025"><i>Preussia isomera</i></p>	<p data-bbox="695 1160 839 1554">Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p data-bbox="733 1574 801 1895">Weber <i>et al.</i>, 1990; Weber y Gloer, 1991.</p>



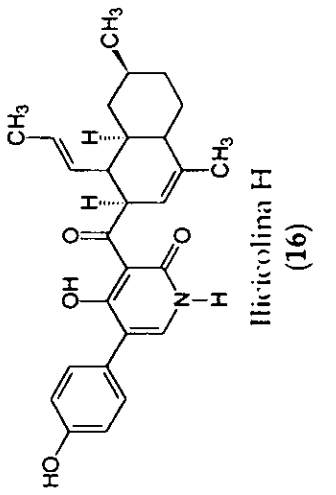
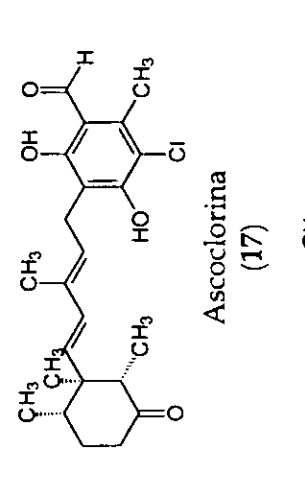
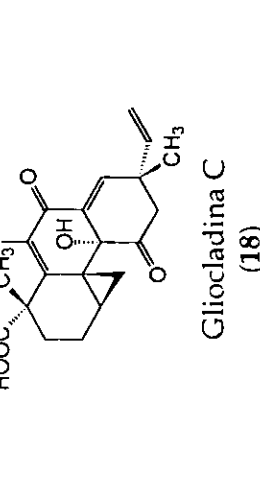
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Apenólida A (10)</p>			
 <p style="text-align: center;">Apenólida B (11)</p>	<i>Podospora appendiculata</i>	Antagonismo hacia <i>Ascoibolus furfuraceus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Candida albicans</i> .	Wang <i>et al.</i> , 1993.
 <p style="text-align: center;">Apenólida C (12)</p>			

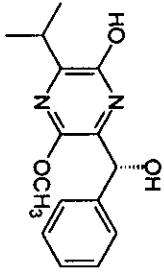
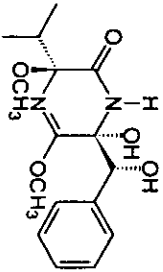
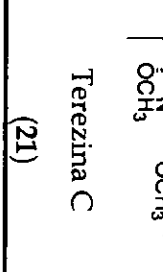
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Similina A (13)</p>	<p><i>Sporormiella similis</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria finicola</i>.</p>	<p>Weber <i>et al.</i>, 1992.</p>
 <p>Apiosporamida (14)</p>	<p><i>Apiospora montagnei</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Alfatafa <i>et al.</i>, 1994; Alfatafa, 1994.</p>
 <p>1,6-Hidroxi-8-metoxi-3-hidroximetilanttraquinona (15)</p>	<p><i>Chrysosporium merderium</i></p>	<p>Actividad antifúngica.</p>	<p>Alfatafa, 1994.</p>

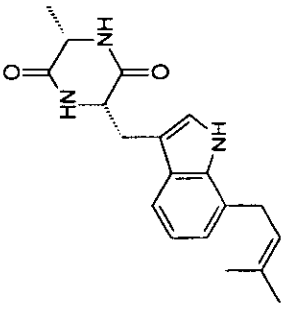
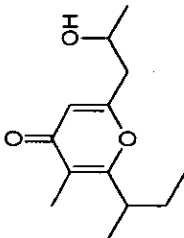
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Illicolina H (16)</p>			
 <p style="text-align: center;">Ascoclorina (17)</p>	<i>Gliocladium</i> sp.	Actividad antifúngica.	Alfatafta, 1994.
 <p style="text-align: center;">Gliocladina C (18)</p>			

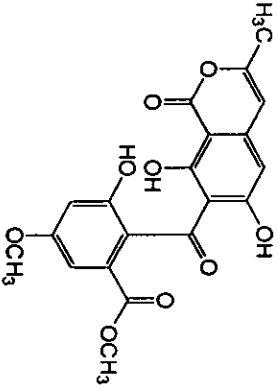
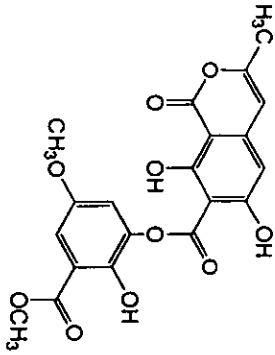
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Terezina A (19)</p>	<p><i>Sporormiella teretispora</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Wang, 1994; Wang et al., 1995.</p>
 <p>Terezina B (20)</p>			
 <p>Terezina C (21)</p>			

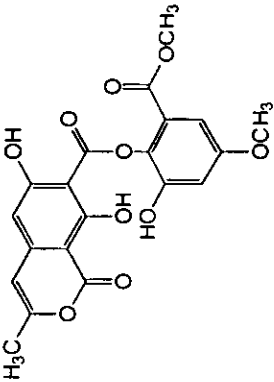
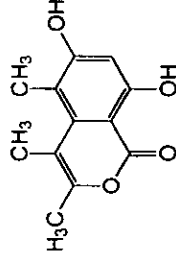
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Terezina D (22)</p>  <p style="text-align: center;">Hialopirona (23)</p>	<p><i>Sporormiella teretispora</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Wang, 1994; Wang <i>et al.</i>, 1995.</p>

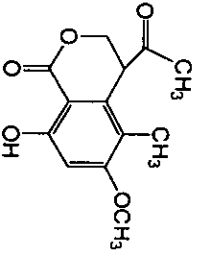
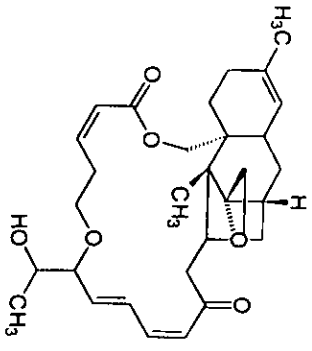
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Cercolorina A (24)</p>	<p><i>Cercophora areolata</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Whyte <i>et al.</i>, 1996.</p>
 <p style="text-align: center;">Cercolorina B (25)</p>			

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

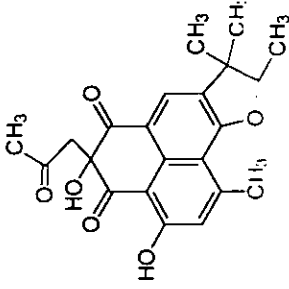
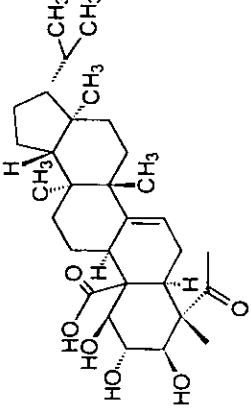
PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Cercophorina C (26)</p>  <p style="text-align: center;">Decarboxicitrona (27)</p>	<p><i>Cercophora areolata</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Whyte <i>et al.</i>, 1996.</p>

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

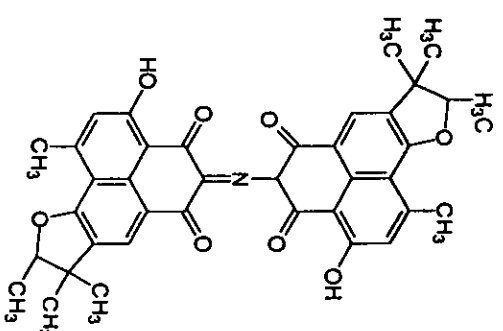
PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>4-Acetil-8-hidroxi-6-metoxi-5-metil isocumarina (28)</p>	<p><i>Cercophora areolata</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Whyte et al., 1996.</p>
 <p>Roridin E (29)</p>			



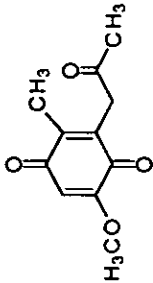
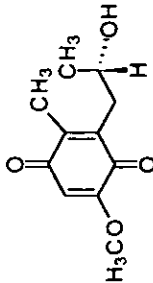
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Arugosina F (30)</p>  <p style="text-align: center;">Arugosina A (31)</p>	<p><i>Ascodesmus splaucrospora</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascoholus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Gamble <i>et al.</i>, 1995.</p>

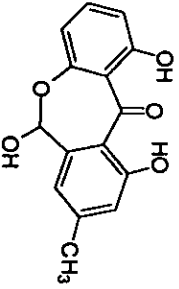
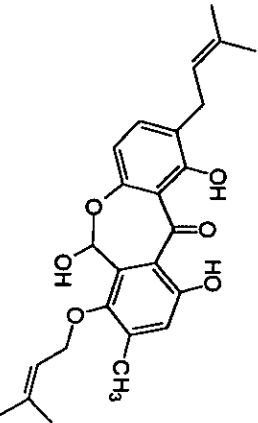
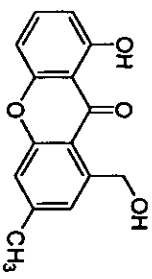
Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Arugosina A (32)</p>	<p><i>Ascodesmia sphaerospora</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Gamble <i>et al.</i>, 1995.</p>

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Anserinona A (33)</p>	<p><i>Podospora anserina</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> y <i>Sordaria fimicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Wang et al., 1997.</p>
 <p style="text-align: center;">Anserinona B (34)</p>			

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de diversas especies de hongos coprófilos (continuación).

PRODUCTO NATURAL	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Arugosina F (35)</p>	<p><i>Ascodesmis sphaerospora</i></p>	<p>Antagonismo hacia <i>Ascobolus furfuraceus</i> y <i>Sordaria finnicola</i>. Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Hein et al., 1998.</p>
 <p>Arugosina A (36)</p>			
 <p>1-hidroxi-6-metil-8-hidroxi metilxantona (37)</p>			

## **II. ANTECEDENTES.**

### **1. MICROORGANISMOS COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES HERBICIDAS.**

En la actualidad se conocen aproximadamente 30, 000 especies de plantas arvenses pertenecientes a más de 40 familias botánicas. Las gramíneas y las compuestas son las más abundantes, siguiendo en importancia las oxalidáceas, poligonáceas, quenopodiáceas, crucíferas y leguminosas (Hoagland, 1990; Terry, 1991; Cramer, 2000).

Las plantas arvenses constituyen la vegetación que invade y crece entre los cultivos de importancia económica y jardines. Estas especies son dañinas, ya que compiten por el espacio, la luz, el agua y los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas útiles. Muchas de ellas se caracterizan por presentar ciclos de vida cortos, producir una gran cantidad de semillas y reproducirse por autofertilización. Sin embargo, algunas de estas especies se cultivan para los más diversos usos. El romero, el epazote y el amaranto son ejemplos de arvenses cultivables. Estas arvenses son útiles al hombre, porque se consumen como alimentos o medicamentos y se emplean como abono o como plantas ornamentales (Villegas, 1979; Hoagland, 1990; Cramer, 2000).

Muchas arvenses son perjudiciales para el hombre porque al competir con las plantas cultivadas constituyen un problema en la agricultura y en la jardinería; asimismo, pueden causar daños a la ganadería y afectar la salud. La presencia de

## *II. Antecedentes.*

estas especies en los jardines privados y públicos es tan indeseable como en la agricultura. Asimismo, algunas plantas son perjudiciales para la ganadería debido a que algunas son tóxicas y otras producen daños físicos en los animales; también ciertas arvenses al ser ingeridas proporcionan un mal sabor a la leche y a otros productos. Por último, entre las malezas que afectan la salud del hombre se encuentran, por un lado, aquéllas que producen polen, el cual al dispersarse por el viento puede producir alergias en algunos individuos sensibles y, por el otro, aquéllas que provocan reacciones al contacto.

La presencia de las plantas nocivas en los campos dedicados a la agricultura conduce a la realización de labores de limpia antes del sembrado, así como durante la estancia de las mismas en el terreno, lo que implica una inversión adicional en mano de obra y herramientas. Entre los métodos convencionales que se han empleado para eliminar las plantas nocivas podemos mencionar la poda, la roza, la sincronización y/o la rotación de los cultivos. Además, es importante mencionar que las pérdidas anuales en los cultivos agrícolas por la presencia de plantas nocivas es de aproximadamente del 42 % y que conjuntamente se requiere invertir millones de dólares para controlarlas (Whorsham, 1989; Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Cremlyn, 1991; Duke y Abbas, 1995; Cramer, 2000; *inter alia*).

Actualmente, el método más empleado para eliminar las plantas arvenses es el uso de herbicidas sintéticos, los cuales juegan un papel importante en la protección de los cultivos de importancia agrícola y forestal. Es importante destacar que hoy en día se cuenta con más de 200 principios activos de origen sintético, los cuales pueden clasificarse en 20 grupos de acuerdo a sus estructuras químicas. En el Cuadro 2 se presentan los principales grupos de herbicidas, así como el tipo de plantas que afectan (Hoagland, 1990; Cremlyn, 1991; Collins, 1991; Evans, 1998; Cramer, 2000; *inter alia*).

Los agentes fitotóxicos se clasifican en tres grupos de acuerdo a su modo de acción: *a)* sistémicos y no sistémicos, *b)* selectivos y no selectivos, y *c)* preemergentes y poseemergentes. Los compuestos sistémicos se transportan en el

Cuadro 2. Clasificación y ejemplos de herbicidas sintéticos (Cremlyn, 1991).

CLASIFICACIÓN	HERBICIDAS	SELECTIVIDAD
Ácidos carboxílicos	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido metilfenoxiacético (MCPA), picloram, dicamba, cloramben, clorfenac.	Dicotiledóneas
	Metildiclofop, fenoxapropil, butilfluazifop.	Monocotiledóneas
Ácidos cloroalifáticos	Dicloro propionato de sodio (Dalapon), ácido tricloroacético.	Monocotiledóneas
Carbamatos aromáticos y tiocarbamatos	Profam, barbam, butilato, vernolato, bentiocarb, asulam.	Monocotiledóneas
Nitrilos	Diclobenil, bromoxinil, ioxinil.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas
Amidas (cilanidas)	Propanil, pentanoclor.	Dicotiledóneas
Amidas (cloroacetanilidas)	Alaclor, butaclor, metolaclor, metazaclo, propaclor.	Dicotiledóneas
Amidas (benzamidias)	Benzoil-propen-etil, flamprop-isopropil.	Dicotiledóneas
Dinitroanilinas	Trifluralina, pencimetalina, benfluralina, profluralina, etalfluralina, flucloralina.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas

**II. Antecedentes.**

**Cuadro 2.** Clasificación y ejemplos de herbicidas sintéticos (continuación).

CLASIFICACIÓN	HERBICIDAS	SELECTIVIDAD
Triazinas	Simazina, atriazina, propazina, desmetrina, ametrina, metropi-na, aziprotrina, azimacina, atrazina.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas
Arilureas	Monuron, diuron, linuron.	Dicotiledóneas
Piridazinas	Coridazon, metflurazon, norflu-razon.	Dicotiledóneas
Uracilos	Bromacil, terbacil, lenacil.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas
Bipiridinium	Diquat, paraquar, dibezodiquat.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas
Difenilésteres	Nitrofen, fluorodifen, bifenox, fomesafen.	Dicotiledóneas
Organofosforados	Glifosanato, glufosinato de amonio.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas
Imidazoles	Imaquin, imazetapir, imazeme-labeno.	Monocotiledóneas y Dicotiledóneas
Sulfonilureas	Sulfometuron, trasulfuron, metil-benzulfuron, clorsulfuron.	Dicotiledóneas
Triazoles	Amitrol.	Monocotiledóneas y dicotiledóneas



interior de la planta, distribuyéndose mediante el sistema vascular, mientras que los no sistémicos permanecen en su sitio de aplicación. La gran mayoría de los herbicidas de uso comercial, por ejemplo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) actúan sistémicamente. Los herbicidas no selectivos, es decir los de amplio espectro, son eficaces contra una extensa variedad de plantas nocivas. Por último, los herbicidas preemergentes y posemrgentes, son aquellos utilizados antes o después de la germinación de las semillas, respectivamente (Hoagland, 1990).

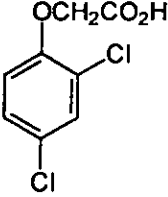
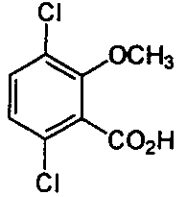
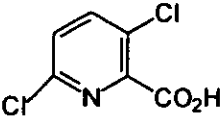
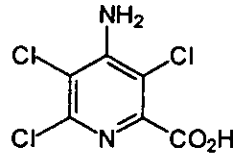
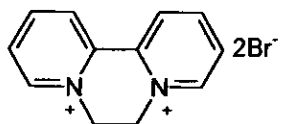
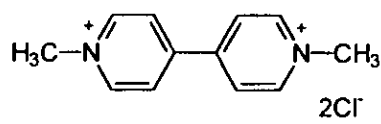
Los grupos de herbicidas más importantes por su frecuencia de uso y eficacia son los derivados de las triazinas, los carbamatos, los ácidos carboxílicos, las amidas, las sulfonilureas y la bupiridina. Las triazinas, los ácidos carboxílicos y las sales de bupiridinio son efectivas para combatir malezas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Los carbamatos son útiles para erradicar monocotiledóneas. Por último, los herbicidas de los dos grupos restantes se utilizan en contra de plantas dañinas de las dicotiledóneas. En el Cuadro 3 se presentan algunos ejemplos de cada uno de los principales grupos de herbicidas comerciales (Duke y Lydon, 1987; Cremllyn, 1991; Duke y Abbas, 1995; Warrior, 2000; *inter alia*).

Desafortunadamente, los agentes fitotóxicos sintéticos ocasionan severos daños ecológicos debido a su alta persistencia y a su poca selectividad. Además, en múltiples ocasiones resultan tóxicos no sólo para los organismos blanco, sino también para el hombre y los animales. Así por ejemplo, en la literatura se ha descrito que los herbicidas comerciales DCMU y dinoceb son altamente tóxicos para algunos mamíferos, incluyendo el hombre, y para algunas aves de rapiña (Sathiakumar y Delzell, 1997; Calabrese, 1997; Ditch *et al.*, 1997; Asogalem y Akintongua, 1997; Hardell y Eriksson, 1999; Heydens *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 1999; *inter alia*).

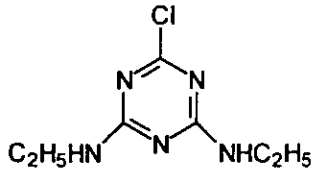
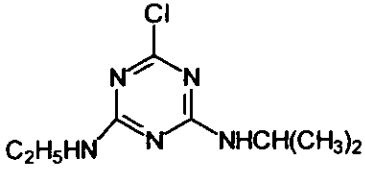
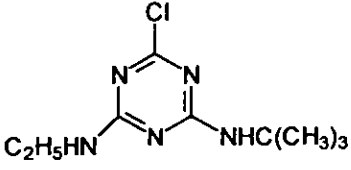
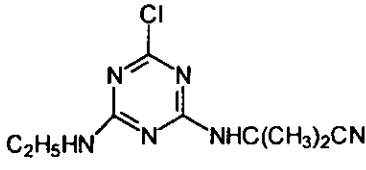
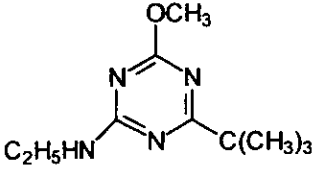
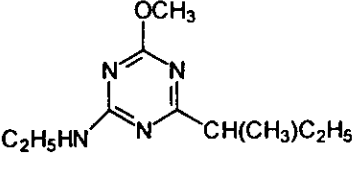
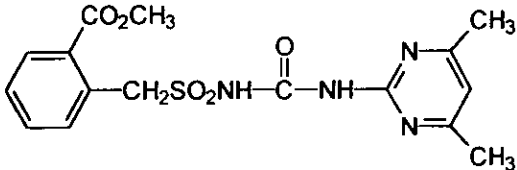
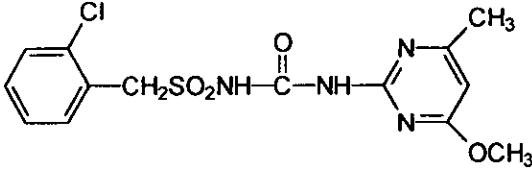
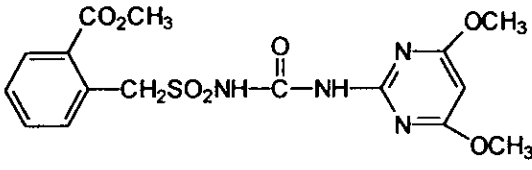
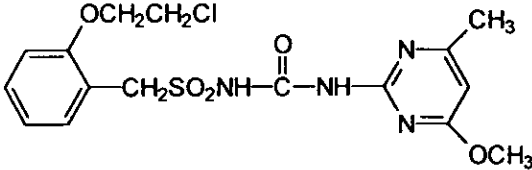
El uso indiscriminado de los herbicidas comerciales ha ocasionado también la aparición de numerosas especies de malezas resistentes a los tratamientos, y de resistencia cruzada. Por ejemplo, se ha descrito que algunas plantas nocivas

II. Antecedentes.

Cuadro 3. Ejemplos de herbicidas sintéticos pertenecientes a los principales grupos de herbicidas comerciales (Cremllyn, 1991).

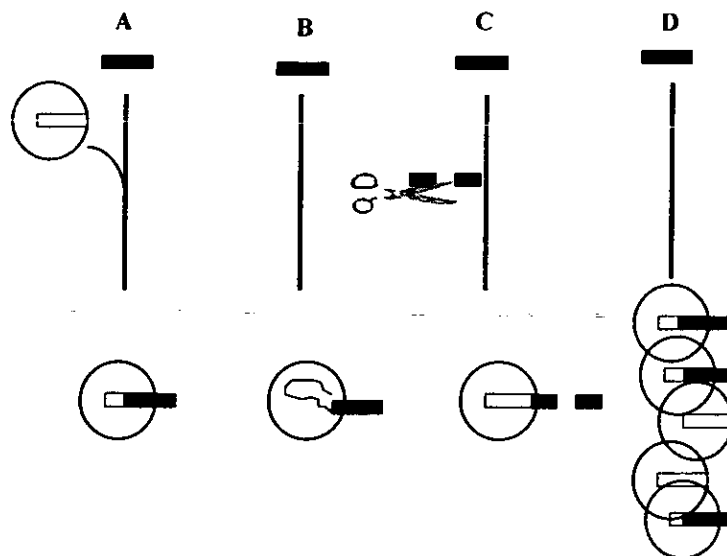
GRUPO DE LOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS			
			
Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (38)	Dicamba (39)	Clopiralid (40)	Picloram (41)
GRUPO DE LOS CARBAMATOS			
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 - \text{N} - \text{COSC}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_3\text{H}_7 - \text{N} - \text{COSC}_3\text{H}_7 \\   \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$		
Butilato (42)	Pebulato (43)		
$\begin{array}{c} \text{C}_3\text{H}_7 - \text{N} - \text{COSC}_3\text{H}_7 \\   \\ \text{C}_3\text{H}_7 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - \text{N} - \text{COSCH}_2\text{CC}=\text{CHCl} \\   \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$		
Vernolato (44)	Dialato (45)		
GRUPO DE LA BIPERIDINA			
			
Diquat (46)	Paraquat (47)		

**Cuadro 3.** Ejemplos de herbicidas sintéticos pertenecientes a los principales grupos de herbicidas comerciales (Cremlyn, 1991) [continuación].

GRUPO DE LAS TRIAZINAS		
 <p>Simazina (48)</p>	 <p>Atrazina (49)</p>	 <p>Terbutilazina (50)</p>
 <p>Cianazina (51)</p>	 <p>Terbumeton (52)</p>	 <p>Sebumeton (53)</p>
GRUPO DE LAS SULFONILUREAS		
 <p>Metil sulfometuron (54)</p>	 <p>Clorosulfuron (55)</p>	
 <p>Metil bensulfuron (56)</p>	 <p>Triasulfuron (57)</p>	

## II. Antecedentes.

(*Senecio vulgaris*, *S. nigrum*, *S. tuberosum*, *Lolium rigidum*, *Alopecurus iosuroides*, *Brassica campestris*, *B. napusresi* y varias especies de *Amaranthus*) que afectan principalmente los cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo y sorgo, han desarrollado resistencia a las triazinas, específicamente a la atrazina y la azimacina. La especie *Echinochloa crusgalli*, la cual ocasiona pérdidas hasta de 59 % de los cultivos de arroz, es resistente al propanil y al Diclofob (Cremlyn, 1991; Holt, 1993; Heap, 1997; Warrior, 2000). El desarrollo de resistencia a los herbicidas se ha atribuido a que algunas de estas sustancias inducen mutagenicidad ocasionando alteraciones en sus blancos de acción a nivel molecular, por ejemplo, modificando la conformación estructural de una enzima blanco, induciendo la activación de sistemas enzimáticos, o bien provocando una sobre-expresión del sitio de acción (Figura 1) [Baker, 1991; Collins, 1991; Terry, 1991; Duke y Lydon, 1993; Duke y Abbas, 1995; Dayan, *et al.*, 2000].



**Figura 1.** Representación de tres posibles mecanismos para el desarrollo de resistencia a los herbicidas comerciales. A) Sitio activo normal, B) Alteración en el blanco de acción por modificación en la conformación del receptor, C) modificación de la conformación estructural de la enzima blanco, y D) sobreproducción del sitio de acción.

Tomando en consideración los numerosos y severos problemas toxicológicos y ambientales ocasionados por el uso de los herbicidas sintéticos, recientemente se han propuesto estrategias alternas con la finalidad de proteger los cultivos de importancia económica. Estas estrategias comprenden la rotación de los cultivos, el uso de cultivos de cobertura, el desarrollo de especies resistentes a la invasión de plantas nocivas mediante la utilización de técnicas genéticas y el empleo de herbicidas de origen natural (Grover *et al.*, 1997; Neufeind *et al.*, 1997; Charizopoulus y Papadopoulous-Mourkidu, 1999; Oettmeier, 1999; Pearce y Mackenzie, 1999; *inter alia*). Estos últimos son generalmente menos tóxicos para el hombre y los animales, sus índices de bioacumulación son menores y los mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto herbicida suelen ser más específicos. Esta última característica es de gran importancia para el diseño bioracional de herbicidas con las características antes señaladas (Hoagland, 1990; Rodgers, 1993; Dayan, *et al.*, 2000; Cramer, 2000; *inter alia*).

En este contexto, en los años recientes la investigación de los productos naturales (tanto de origen vegetal como microbiano) como una fuente de nuevos agentes herbicidas se ha incrementado notablemente (Oiwa, 1992; Pillmoor, *et al.*, 1993; Rodgers, 1993; Benner, 1993; Harborne, 1993; Jaya y Dubey, 1999; Harborne, 1999; Dayan, *et al.*, 2000; *inter alia*). Los agentes herbicidas naturales descubiertos a través de estas investigaciones pueden utilizarse por sí mismos o constituir nuevos prototipos estructurales para el diseño y la síntesis de derivados más potentes y eficaces. De manera adicional, el descubrimiento de fitotoxinas naturales con estructuras novedosas puede conducir al descubrimiento de blancos de acción novedosos a nivel molecular y proporcionar así las herramientas necesarias para el diseño bioracional de nuevos agentes herbicidas (Duke y Abbas 1995; 1996; Duke y Lydon, 1993; 1999; Harborne, 1999; Dayan, *et al.*, 2000; *inter alia*).

Actualmente diversos programas de investigación están enfocados al estudio de varios tipos de hongos que se consideran fuentes potenciales de metabolitos bioactivos de utilidad como agentes medicinales y pesticidas

## II. Antecedentes.

(Harborne, 1999). Cabe destacar que estas especies crecen comúnmente en ambientes competitivos y su metabolismo secundario puede verse influenciado por la presión ejercida por otros organismos, incluyendo los de origen fúngico (Gloer, 1995; Harborne, 1999). De manera adicional, muchos metabolitos fúngicos están involucrados en enfermedades de plantas y otros organismos (Harborne, 1999). Los hongos fitopatógenos, específicamente, son productores no sólo de compuestos que poseen efectos fitotóxicos sobre las especies hospederas, sino también sobre otras especies vegetales, incluyendo las plantas nocivas y, en algunos casos, presentan efectos antifúngicos contra otros hongos patógenos (Duke y Abbas 1995; Harborne, 1999; Evidente y Motta, 2001; *inter alia*).

De acuerdo con revisiones recientes, las fitotoxinas derivadas de una gran variedad de hongos y actinomicetes han demostrado una gran eficacia para el control de plantas nocivas. Estos compuestos poseen una gran diversidad estructural y los mecanismos mediante los cuales ejercen su actividad biológica son también novedosos y específicos. Algunos ejemplos de fitotoxinas de origen microbiano, así como su actividad biológica se resumen en el Cuadro 4.

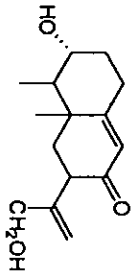
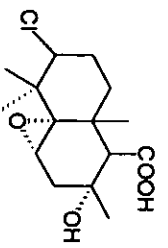
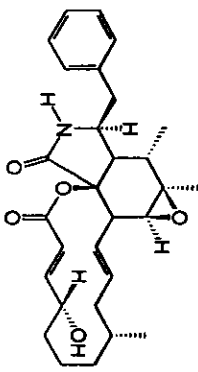
Para el descubrimiento de las fitotoxinas de microorganismos se ha aplicado en repetidas ocasiones la estrategia metodológica que se indica a continuación: en primer lugar, se realiza la preselección de los microorganismos, mediante un criterio ecológico, principalmente con base en las interacciones planta-microorganismo y microorganismo-microorganismo. En múltiples ocasiones, la observación mediante la experimentación de este tipo de interacciones ha constituido un punto de partida para la preselección de especies fúngicas como una fuente valiosa de principios fitotóxicos (Duke y Abbas 1995; Harborne, 1999). En segundo lugar, es necesario realizar cultivos en pequeña escala, con la finalidad de obtener las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos fúngicos objeto de estudio; posteriormente, se preparan los extractos del medio de cultivo y del micelio. A continuación, se realizan pruebas biológicas preliminares. Estas pruebas consisten en la determinación del efecto fitotóxico de los extractos

orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio, mediante la utilización de bioensayos sencillos y de fácil implementación. Entre los más utilizados se encuentran los ensayos de germinación y crecimiento radicular de diversas especies de semillas (Anaya *et al.*, 1995; Dayan, *et al.*, 2000) y el ensayo para detectar inhibidores y promotores del crecimiento de plantas, mediante el empleo de *Lemna minor* (McLaughling *et al.*, 1991; Harbone, 1999). Estas evaluaciones preliminares permiten detectar extractos naturales apropiados para la obtención de agentes herbicidas (Dayan, *et al.*, 2000). En general, los extractos que demuestran respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición se consideran candidatos adecuados para la realización de otras pruebas biológicas dirigidas a un blanco de acción específico en la fisiología o en el metabolismo vegetal (Evidente y Motta, 2001).

Una vez seleccionados los extractos activos se aíslan los principios fitotóxicos mediante estudios químicos biodirigidos. Este proceso permite la obtención de los principios fitotóxicos. Los compuestos naturales activos puros se identifican y, por último, estos compuestos son sometidos a ensayos biológicos adicionales con la finalidad de explorar de manera más detallada su posible aplicación como herbicidas comerciales. Asimismo, se realizan pruebas de invernadero sobre especies vegetales cultivables o sobre malezas para determinar la actividad herbicida de tipo pre y posemergente (Evidente y Motta, 2001; Dayan, *et al.*, 2000; *inter alia*).

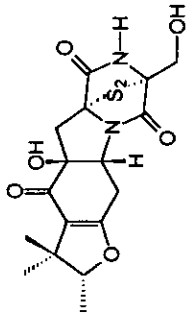
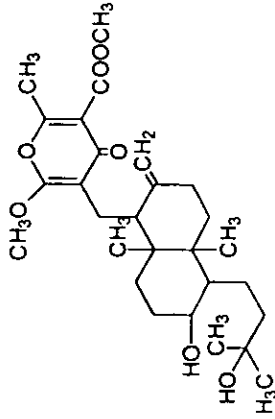
II. Antecedentes.

Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos.

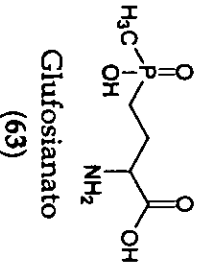
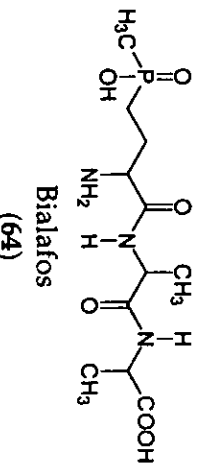
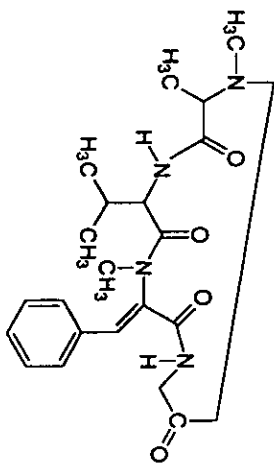
FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Fomenona (58)</p>	<p><i>Phoma exigua</i> y <i>Phoma destructiva</i>.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Riche, 1974; Capasso, 1986.</p>
 <p>Altiltoxina B (59)</p>	<p><i>Phoma asparagi</i>.</p>	<p>Actividad fitoinhibidora sobre diferentes especies de semillas.</p>	<p>Ichihara, 1984.</p>
 <p>Citocalasina F (60)</p>	<p><i>Phoma lingam</i>.</p>	<p>Fitoirnhbidor.</p>	<p>Capasso, 1991.</p>



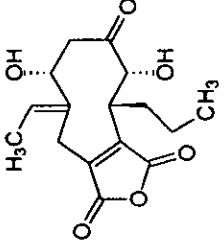
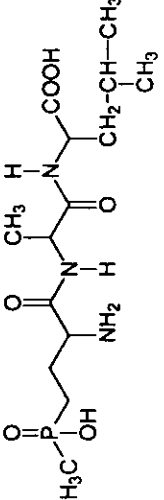
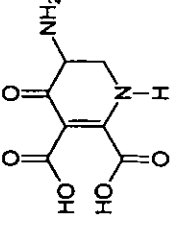
Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Fomalizarina (61)</p>	<p><i>Phoma lingam.</i></p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Pedras, 1990a; 1990b.</p>
 <p>Coletotriquina (62)</p>	<p><i>Colletotrichum</i> sp.</p>	<p>Produce la destrucción de las membranas celulares de varias especies de plantas.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993.</p>

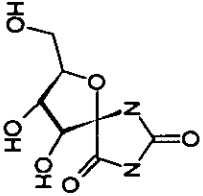
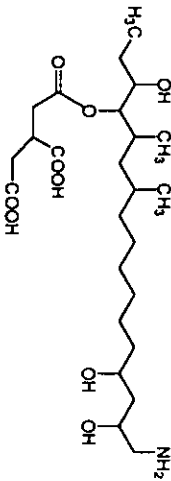
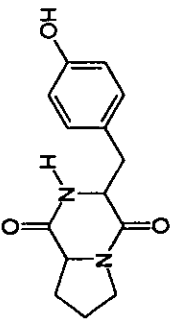
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Glufosianato (63)</p>	<p><i>Streptomyces viridochromogues</i>, <i>Streptomyces hygroscopicus</i> y otras especies.</p>	<p>Inhibe la enzima glutamina sintetasa y la biosíntesis de proteínas. Se emplean comercialmente.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993; Duke y Abbas, 1995.</p>
 <p>Bialafos (64)</p>	<p>Sintético (se transforma en glufosianato en la planta).</p>	<p>Inhibe la enzima glutamina sintetasa y la biosíntesis de proteínas. Se emplean comercialmente.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993; Duke y Abbas, 1995.</p>
 <p>Tentoxina (65)</p>	<p><i>Alternaria alternata</i> y otras especies de <i>Alternaria</i>.</p>	<p>Presenta alta efectividad sobre varias malezas de importancia agrícola. La soya y el maíz son resistentes.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993; Duke y Abbas, 1995.</p>

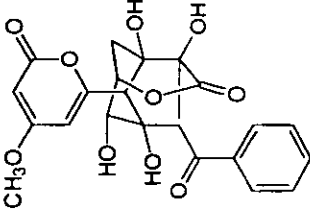
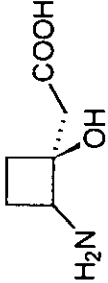
Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Cornexistina (66)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Paecilomyces variotii</i>.</p>	<p>Activo sobre semillas de dicotiledóneas y algunas semillas de monocotiledóneas. Las semillas de maíz presentan resistencia a la fitotoxina.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993; Duke y Abbas, 1995.</p>
 <p style="text-align: center;">Fosalacina (67)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Kitasatosporia phosolacinae</i>.</p>	<p>Inhibidor de la enzima glutamina sintetasa.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993.</p>
 <p style="text-align: center;">Gostatina (68)</p>	<p style="text-align: center;"><i>Paecilomyces variotii</i>.</p>	<p>Activo sobre semillas de dicotiledóneas y algunas semillas de monocotiledóneas. Las semillas de maíz presentan resistencia a la fitotoxina.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993; Duke y Abbas, 1995.</p>

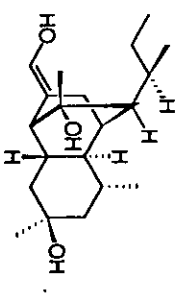
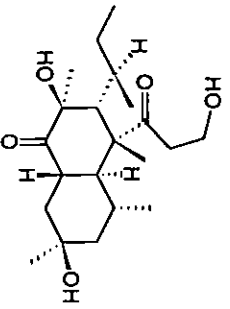
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Hidantocidina (69)</p>	<p><i>Streptomyces hygrosopicus.</i></p>	<p>Es muy efectivo sobre semillas de malezas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Inhibe la biosíntesis de purinas.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993; Duke y Abbas, 1995.</p>
 <p>toxina-AAL (70)</p>	<p><i>Alternaria alternata.</i></p>	<p>Activo sobre varias especies de plantas. Diversas especies de tomate son resistentes.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993.</p>
 <p>Maculosina (71)</p>	<p><i>Alternaria alternata.</i></p>	<p>Herbicida natural. Produce manchas foliares en <i>Centaura maculosa</i>.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993.</p>

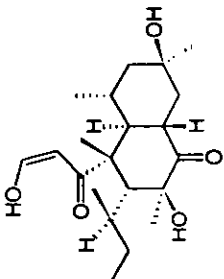
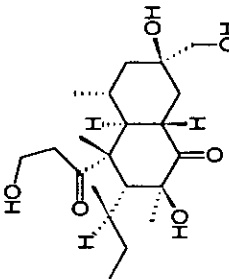
Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Vulgamicina (72)</p>	<p><i>Streptomyces</i> sp.</p>	<p>Inhibe la síntesis de isoleucina.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993.</p>
 <p>Ácido-cis-2-amino-1-hidroxibutano-ácético (CBAA) (73)</p>	<p><i>Streptomyces rochei</i>.</p>	<p>Inhibidor de la enzima glutamina sintetasa y de la biosíntesis de proteínas. Induce deficiencia de clorofila en algunas plantas.</p>	<p>Duke y Lyndon, 1993.</p>

**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

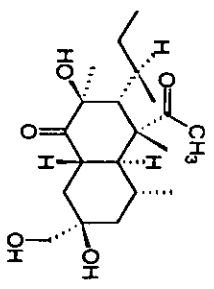
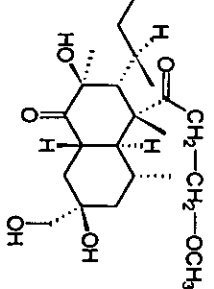
FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Betaenona A (74)</p>	<p><i>Phoma betae.</i></p>	<p>Inhibe el crecimiento de varias plantas. Se ha demostrado que inhibe la síntesis de proteínas y del RNA.</p>	<p>Ichihara, 1983a; Ichihara, 1983b.</p>
 <p>Betaenona B (75)</p>			

Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p style="text-align: center;">Betaenona C (76)</p>	<i>Phoma betae.</i>	Inhibe el crecimiento de varias plantas. Se ha demostrado que inhibe la síntesis de proteínas y del RNA.	
 <p style="text-align: center;">Betaenona D (77)</p>			



II. Antecedentes.

Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

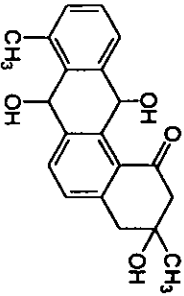
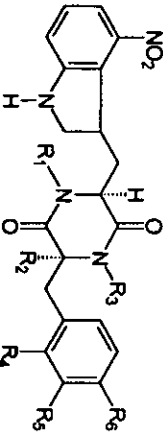
FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Betaenona E (78)</p>	<p><i>Phoma betae.</i></p>	<p>Inhibe el crecimiento de varias plantas. Se ha demostrado que inhibe la síntesis de proteínas y del RNA.</p>	<p>Ichihara, 1983a; Ichihara, 1983b.</p>
 <p>Betaenona F (79)</p>			



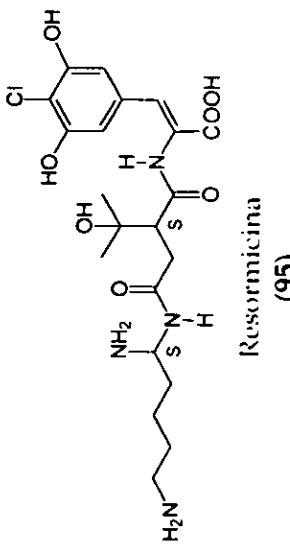
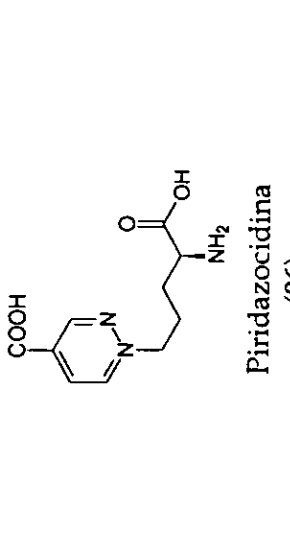
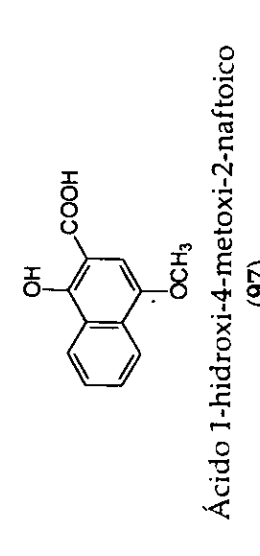
Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Fosfinotrixina (80)</p>	<p><i>Saccharothrix</i> sp.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Takahashi <i>et al.</i>, 1995; Kimura <i>et al.</i>, 1995; Dayan <i>et al.</i>, 2000.</p>
 <p>R      H A      OH B      OH C      OH D      OH</p> <p>Isómero 4Z, 6Z, 8E Diastereoisómeros 4Z, 6Z, 8E Diastereoisómeros 4Z, 6E, 8E</p> <p>Ftoxazolina A-D (81), (82), (83) y (84)</p>	<p><i>Streptomyces</i> sp.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Shiomi <i>et al.</i>, 1995.</p>

Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Hidrantomocina (85)</p>	<p><i>Streptomyces</i> sp.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Tanaka <i>et al.</i>, 1995.</p>
 <p>R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  A CH<sub>3</sub> OH OH CH<sub>3</sub> OH H H H  B CH<sub>3</sub> OH OH CH<sub>3</sub> OH H H H  C CH<sub>3</sub> H H H H H H H  D CH<sub>3</sub> OH OH CH<sub>3</sub> H H H H  E CH<sub>3</sub> H H CH<sub>3</sub> H H H H  F CH<sub>3</sub> OH OH CH<sub>3</sub> H H H OH  G CH<sub>3</sub> OH OH CH<sub>3</sub> H H OH OH  H CH<sub>3</sub> OH OH H H OH H  I H OH OH CH<sub>3</sub> H OH H</p> <p>Taxonominas A-I (86), (87), (88) (89), (90) (91) (92), (93) y (94)</p>	<p><i>Streptomyces scabies</i>.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>King y Lawrence, 1996.</p>

Cuadro 4. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
 <p>Resoromicina (95)</p>	<p><i>Streptomyces platensis</i>.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Igarashi <i>et al.</i>, 1997a; Igarashi <i>et al.</i>, 1997b.</p>
 <p>Piridazocidina (96)</p>	<p><i>Streptomyces</i> sp.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Gerwick <i>et al.</i>, 1997.</p>
 <p>Ácido 1-hidroxi-4-metoxi-2-naftoico (97)</p>	<p><i>Streptosporangium</i> sp.</p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Pfferle <i>et al.</i>, 1997.</p>

**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica obtenidos a partir de microorganismos (continuación).

FITOTOXINA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
<p>Ácido 2E, 4Z, 7Z decatrienoico (98)</p>	<p><i>Streptomyces viridochromogenes.</i></p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Maier <i>et al.</i>, 1999.</p>
<p>Ácido estilíngico (ácido 2E, 4Z decadienoico) (99)</p>	<p><i>Streptomyces viridochromogenes.</i></p>	<p>Fitoinhibidor.</p>	<p>Maier <i>et al.</i>, 1999.</p>
<p>Ofiobolina A (100)</p>	<p><i>Bipolaris oryzae</i>, <i>B. oryzaemaydis</i> y <i>B. sorghicola</i>.</p>	<p>Interacciona con CaM e inhibe su habilidad de activar algunas de sus enzimas blanco.</p>	<p>Leung <i>et al.</i>, 1985; Au y Leung, 1998; Au <i>et al.</i>, 2000a; 2000b.</p>

2. ANTECEDENTES GENERALES DEL HONGO COPRÓFILO *GUANOMYCES POLYTHRIX*.

El hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* Gonzáles, Hanlin y Ulloa (Figura 2) pertenece a un género nuevo de ascomicetes recientemente descrito por los Drs. María del Carmen González, Miguel Ulloa del Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología UNAM, y por el Dr. Richard T. Hanlin del Departamento de Patología de Plantas, Universidad de Georgia, USA.

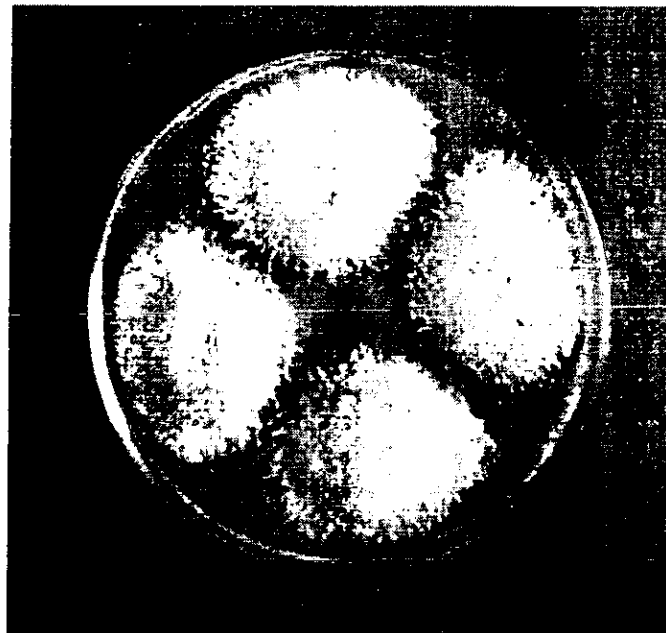


Figura 2. Hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* en cultivo de agar de papa-dextrosa.

## II. Antecedentes.

El nuevo género *Guanomyces* se encuentra estrechamente relacionado a los géneros *Chaetomium* y *Farrowia*, pertenecientes también a la familia Chaetomiaceae (orden Sordariales). A diferencia de otros géneros de esta familia, el nuevo taxón se caracteriza por la presencia de un peritecio con ascas delicuescentes, ascosporas hialinas unicelulares sin un poro geminal, y un cuello ostiolar largo, provisto de pelos laterales glandulares (Figuras 3a, 3b y 3c). Con base en esta última característica se designó a la especie con el nombre de *Guanomyces polythrix*.

La propuesta de *G. polythrix* como una nueva especie se fundamentó en el análisis morfológico y en la secuenciación del ADN ribosomal 18S (González *et.al.*, 2000).

*G. polythrix* se aisló a partir de guano del murciélago *Leptonycteris hivalis* de la Zona III en la Cueva del Diablo, situada en Tepoztlán, estado de Morelos, México, , durante una expedición realizada en febrero de 1978 para caracterizar la flora y la fauna de la cueva.

Una característica relevante del hongo coprófilo *G. polythrix* es su capacidad para acumular líquido en las puntas de los ápices de los pelos laterales, donde se forman pequeñas gotas (Figuras 3D y 3E). Aparentemente, la acumulación de este líquido aparece durante el alargamiento de los pelos laterales. Cuando el ascoma alcanza el estado maduro, las gotas de líquido tienen una apariencia clara y brillante. El estudio microscópico de este líquido permitió observar que después de permanecer unos minutos entre el porta y el cubre-objetos, se transforma en una pequeña masa cristalina. Además, se observó que los cristales son solubles instantáneamente en agua, ácido acético y en etanol. Cabe mencionar que no se conoce claramente el papel biológico de estas secreciones, pero se presume que actúan como atrayentes de insectos, favoreciendo la diseminación del hongo (González *et.al.*, 2000).

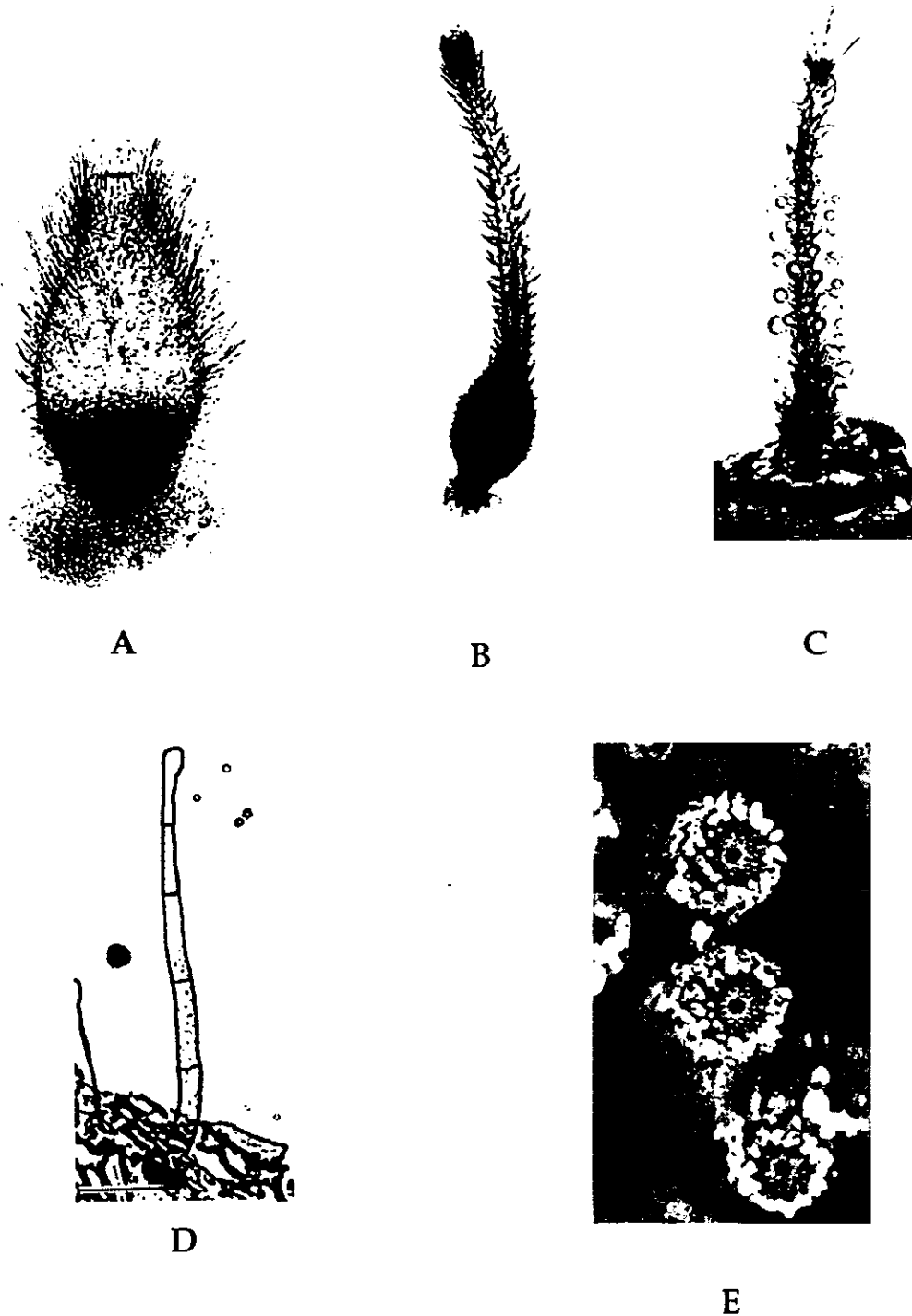


Figura 3. *Guanomyces polythix*. (A) ascoma inmaduro tomado de una colonia de 4 días de crecimiento, (B) ascoma con cuello largo ornamentado con pelos laterales, tomado de una colonia de 7 días de crecimiento, (C) amplificación de los pelos laterales glandulares (D) pelo lateral glandular, y (E) vista de las puntas de los cuellos ostiolares con gotas de líquido.

## II. Antecedentes.

### 3. GENERALIDADES SOBRE LA PROTEÍNA CALMODULINA Y SOBRE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CALMODULINA.

La Calmodulina (CaM) es una proteína multifuncional, ubicua, de carácter ácido, bajo peso molecular, (~16, 680 daltons) y constituida por aproximadamente de 148 aminoácidos (Figura 4).

La CaM se encuentra ampliamente distribuida en los organismos eucarióticos y su estructura primaria se encuentra altamente conservada en estos organismos. Esto último ha sido evidenciado recientemente al comparar la secuencia de aminoácidos de la CaM aislada a partir de diferentes especies. En el Cuadro 5, se presenta la composición de aminoácidos de la proteína aislada de seis especies vegetales y de una especie animal (CaM de cerebro de bovino) [Dieter, 1984; Roberts y Harmon ,1992; Zielinski, 1998; Hooky Means, 2001]. Como se desprende de la información resumida en el Cuadro 5 la composición de la CaM animal y la vegetal es muy similar. En general, todas las especies presentan dos residuos de prolina y uno de trimetil lisina, todas carecen de triptofano y tienen un alto contenido de aminoácidos cargados negativamente (ácido aspártico y ácido glutámico). Las principales diferencias entre las CaMs vegetales y animales son las siguientes: En las CaMs vegetales se encuentra presente un residuo de cisteína en la posición 27 (CIS-27), el cual no se encuentra en las CaMs animales. Por otro lado, el dipéptido metionina-metionina ubicado en las posiciones 145 y 146 de las CaMs de plantas se encuentra en las posiciones 146 y 147 en las proteínas de vertebrados. Así, los porcentajes de identidad de las proteínas de plantas con relación a la de los vertebrados es de 91 % y con las de levaduras de 61% (Roberts y Harmon ,1992).

Recientemente se ha encontrado que en los vegetales existen varias isoformas de CaM con diferentes grados de divergencia en la secuencia de aminoácidos. Así, de *Arabidopsis thaliana* se han aislado cuatro isoformas de CaM (CaM-1-CaM-4), las cuales difieren entre sí en al menos seis aminoácidos en la región más conservada de la proteína. Estas isoformas son también distintas desde el punto de vista bioquímico como se explicará posteriormente. Cabe señalar que



mediante el empleo de la tecnología del DNA recombinante ha sido posible la expresión de estas proteínas en *Escherichia coli*. De tal forma que las cuatro proteínas se han logrado aislar en buena cantidad para el estudio de su estructura primaria y sus propiedades bioquímicas (Liao *et al.*, 1996).

**Cuadro 5.** Composición química (aminoácidos) de la CaM de cerebro de bovino y de seis especies vegetales.

AMINOÁCIDO (No. DE RESIDUOS)	CALMODULINA					
	CEREBRO DE BOVINO	ESPINACA	CACAHUATE	CEBADA	MAÍZ	ZICCHINI
Lisina	7	9	8	9	9	10
Trimetil lisina	1	1	1	1	1	1
Histidina	1	1	1-2	1	1	1
Arginina	6	5	4	4	5	5
Ácido aspártico	23	26	27	25	24	26
Treonina	12	7	9	9	8	9
Serina	4	7	5	6	6	5
Ácido glutámico	27	27	28	25	22	26
Prolina	2	2	2	2	2	2
Glicina	11	10	11	12	12	10
Alanina	11	10	11	12	11	11
Cisteína	0	N.D	1	N.D	N.D	1
Valina	7	8	6	8	8	7
Metionina	9	8	7	7	7	7
Isoleucina	8	7	6	7	7	7
Leucina	9	11	11	12	11	12
Tirosina	2	1	1	1	1	1
Fenilalanina	8	9	8	9	9	9
Triptófano	0	0	0	N.D	N.D	0

\*N.D (No determinado)

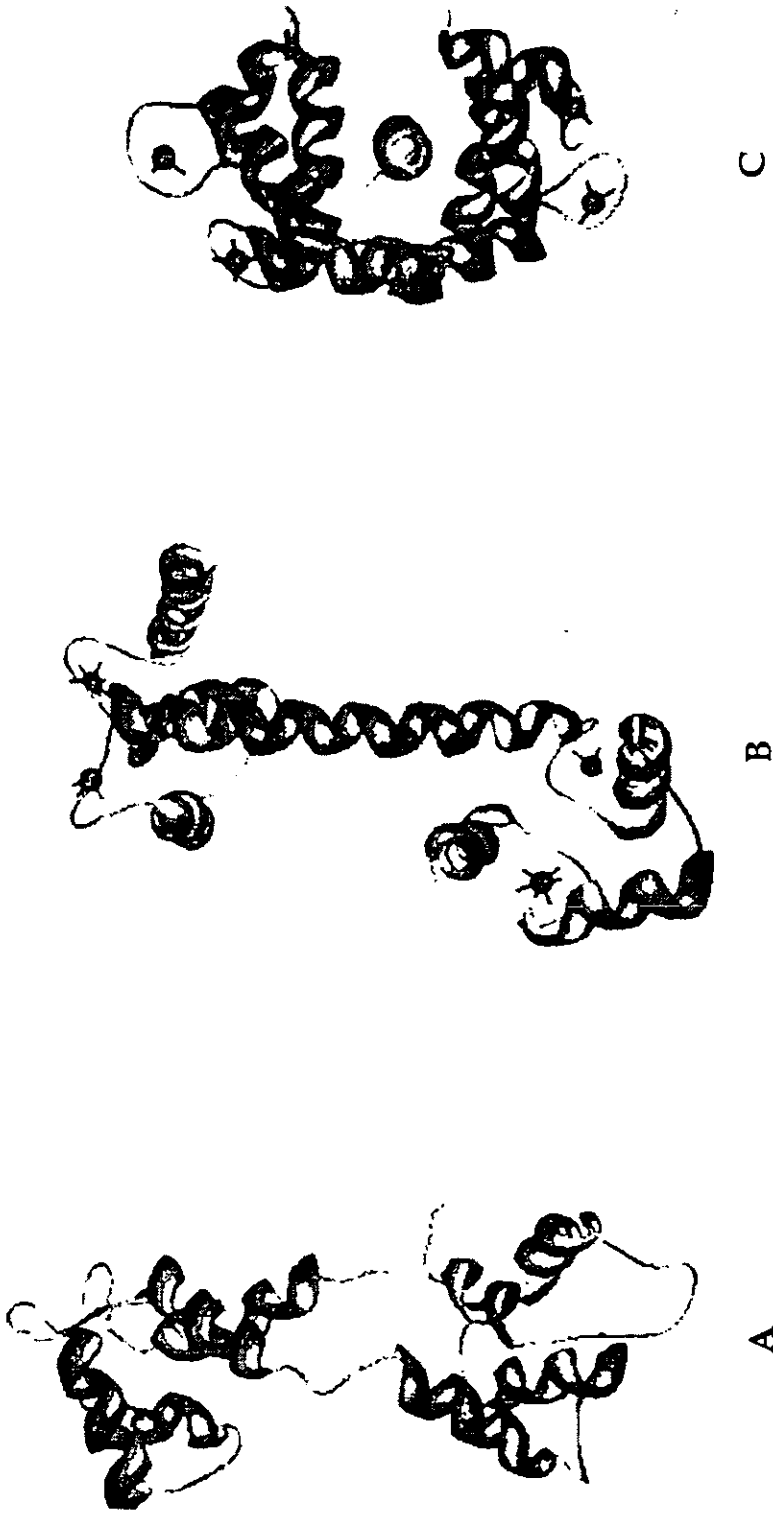
De la soya se han aislado varias isoformas de CaM (SCaM) las cuales difieren no sólo desde el punto de vista bioquímico sino también en el número de aminoácidos. A diferencia de las isoformas de *A. thaliana*, éstas presentan un mayor grado de divergencia, difiriendo hasta en 32 aminoácidos en relación a la

## II. Antecedentes.

proteína más conservada. De nueva cuenta, mediante técnicas de biología molecular fue posible expresar cinco de éstas proteínas en *E. coli* (SCaM-1-SCaM-5). Estas proteínas presentan movibilidades electroforéticas dependientes de calcio y diferentes habilidades para activar distintas enzimas dependientes de CaM (Lee *et al.*, 1995; 1997; 1999; 2000). Las isoformas SCaM-1-SCaM-3 tienen un 90 % de similaridad con la CaM de bovino en tanto que la SCaM-4 y la SCaM-5 presentan un 78 % de identidad. También se han encontrado múltiples isoformas de CaM en el trigo, la papa y el chícharo (Lee *et al.*, 2000).

Diversos estudios de difracción de rayos X y de resonancia magnética nuclear (RMN) han permitido establecer la estructura tridimensional de la CaM de cerebro de bovinos. Estos estudios revelaron que la molécula tiene forma de un balancín gimnástico. La estructura consiste en dos partes lobulares similares ( $2.5 \times 2.5 \times 2.0$  nm) unidas entre sí por una  $\alpha$ -hélice flexible larga de 2.0 nm, de tal forma que el largo de la proteína es de 6.5 nm y tiene un 63 % de estructura helicoidal. Cada estructura globular ("EF hand") contiene dos sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  o dominios funcionales. Estos dominios se designan con los números romanos I-IV y se empiezan a numerar por el extremo amino de la proteína. Cada dominio catalítico está constituido por 12 aminoácidos. (Figura 4) [Roberts y Harmon, 1992; Zielinski, 1998; Snedden y Fromm, 1998].

En el dominio IV existe la mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos. En esta zona también se encuentran las mayores diferencias en las distintas isoformas expresada por una misma especie. La zona más conservada es la III y este dominio funciona en armonía con el IV para activar los sitios de alta afinidad por calcio y así propiciar la interacción entre la CaM y sus proteínas blanco. Entonces la variabilidad encontrada en la zona IV (o dominio 4) es la determinante para la interacción entre la CaM y las diferentes proteínas blanco (Zielinski, 1998).



**Figura 4.** Estructura del complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  tomada de estudios recientes de RMN y de difracción de rayos X. (A) La molécula de calmodulina tiene forma de un balancín gimnástico, con dos lóbulos en cada una de sus extremidades, conectados a lo largo de una  $\alpha$  hélice. En cada punta hay dos dominios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y cada uno de los lóbulos está formado por 12 residuos de aminoácidos de los cuales los ácidos aspártico y glutámico se encuentran en los extremos formando uniones iónicas con el  $\text{Ca}^{2+}$ . Los dominios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  tienen diferente afinidad al catión. Los dos sitios de afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  en el carboxilo terminal de la proteína tienen diez veces más afinidad que los dos del amino terminal (B). Cambio conformacional de la proteína calmodulina provocado por la unión del complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  a una proteína blanco (C) [Hook y Means, 2001].

## II. Antecedentes.

La estructura de la CaM libre de  $\text{Ca}^{2+}$  es menos simétrica y tiene una conformación más rígida (menos helicoidal) debido a las interacciones electrostáticas entre tres pares de grupos carboxilos libres (ubicados entre los residuos 75 y 90) y otros grupos funcionales apropiados presentes en la proteína. Cuando el calcio se une a los sitios funcionales se produce un cambio en la conformación debido a la neutralización de las cargas negativas. Los cambios conformacionales provocan un incremento en la estructura  $\alpha$ -helicoidal y la exposición de una porción hidrofóbica en la parte superior de la molécula, misma que es reconocida por las proteínas blanco de la CaM y sus antagonistas.

Los distintos estudios de dicroísmo circular y de RMN llevados a cabo con CaMs de plantas han permitido definir que éstas también experimentan cambios conformacionales dependientes de calcio similares a los de la CaM animal (Roberts y Harmon ,1992).

La CaM carece de actividad enzimática propia; sin embargo, esta proteína desempeña un papel fundamental en la transducción de señales mediadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular. Así, las señales bióticas y abióticas recibidas por los receptores a nivel membranal provocan un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular, el cual se une a la CaM y a otras proteínas. El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM interacciona con una gran variedad de proteínas tanto nucleares como del citoesqueleto, modulando su actividad enzimática. Estas enzimas a su vez regulan importantes procesos metabólicos. El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM resultante regula también la expresión de genes a través de procesos complejos de transducción de señales o por unión directa a factores de transcripción (Roberts y Harmon ,1992; Zielinski, 1998; Snedden y Fromm, 1998; Au y Leung, 1998; Lee *et al.*, 1999; Hooky Means, 2001). En la Figura 5 se resume el proceso de transducción de señales inducidas por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM en plantas (Snedden y Fromm, 1998).

En los animales se han identificado alrededor de 25 proteínas dependientes de CaM incluyendo algunas cinasas, algunos receptores y algunas proteínas G. Sin embargo, las proteínas reguladas por CaM que se han aislado de plantas son

comparativamente pocas, a pesar de que la CaM ha sido implicada en una gran variedad de respuestas celulares, tales como la defensa al ataque de organismos patógenos, el gravitropismo y el crecimiento vegetal, entre otros.

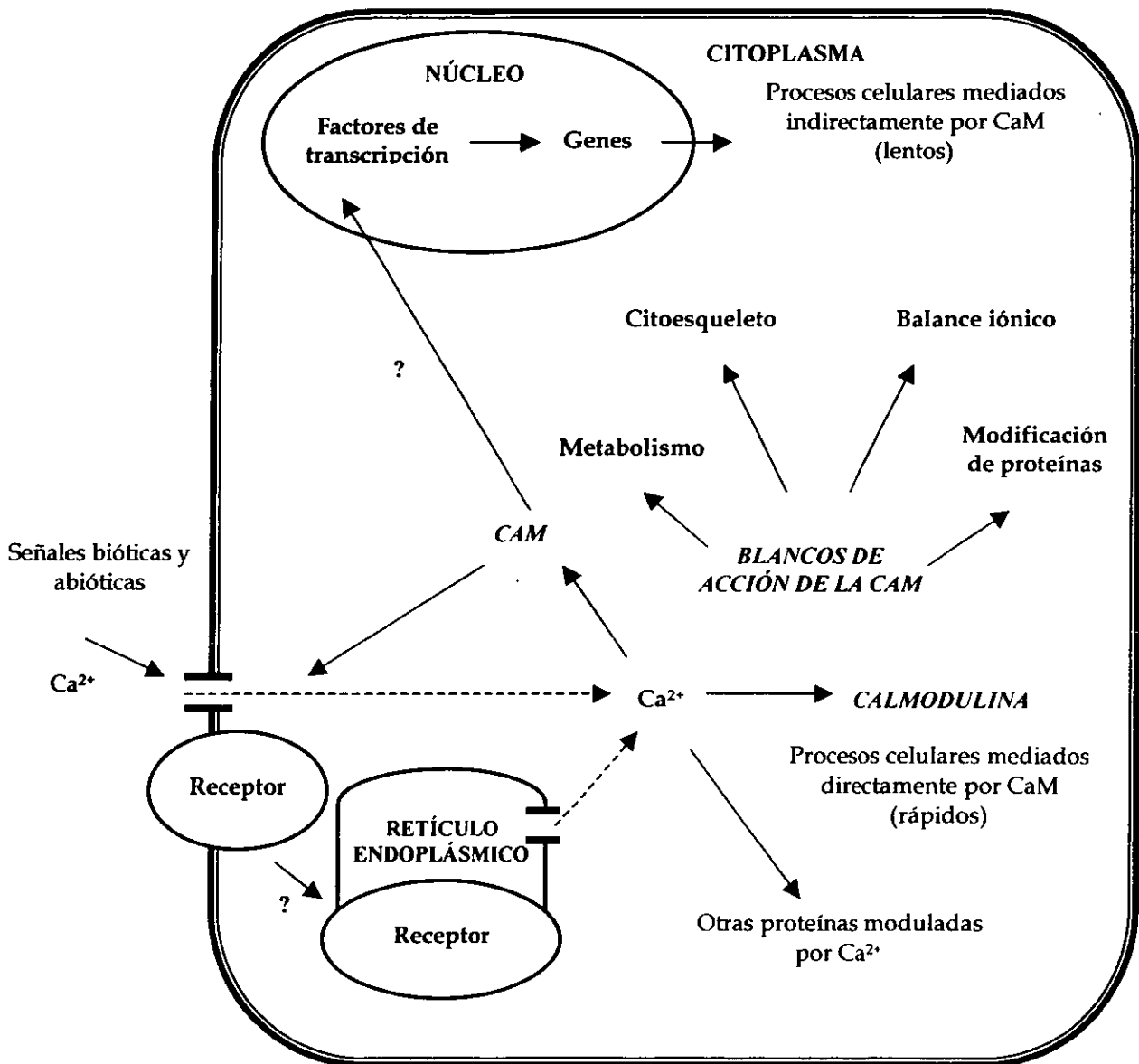


Figura 5. Procesos de transducción de señales mediados por el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM en plantas.

## II. Antecedentes.

En este último contexto se ha demostrado que la proteína CaM tiene una clara participación en los procesos de regulación y de transducción de señales que tienen lugar durante los eventos de germinación y el crecimiento vegetal (Roberts *et al.*, 1986; Dieter, 1984; Coccuci y Negrini, 1991; Roberts y Harmon, 1992; Overvoorde y Grimes 1994; Tomas., 1995; Baum *et al.*, 1996; Poovaiah *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999; Harding *et al.*, 1997, *inter alia*). Así por ejemplo, durante la primera fase de la germinación de las semillas de rábano hay un notable incremento en los niveles de CaM y una disminución en la concentración de sustancias de naturaleza proteica que inhiben la actividad de la CaM (Coccuci y Negrini, 1988).

Por otra parte, se ha determinado que la germinación de las semillas de *Phacelia tanacetifolia* se inhibe en presencia del calmidazolium, un antagonista de la CaM (Coccuci y Negrini, 1991). De manera adicional, estudios *in vitro* utilizando cultivos embriogénicos de zanahoria permitieron establecer que durante la germinación los niveles de CaM se duplican y se incrementa la concentración de una proteína dependiente de la CaM (Oh *et al.*, 1992). Por último, en estudios más recientes se comprobó que la alteración de los niveles de CaM o de sus modificaciones postraduccionales en plantas transgénicas de papa alteran el desarrollo y el crecimiento de las plantas (Poovaiah *et al.*, 1996).

Entre las proteínas más importantes reguladas por la CaM se encuentran la NAD cinasa, la glutamato descarboxilasa, la fosfodiesterasa, la miosina V homóloga (MYA1), la  $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, las cinasas dependientes de CaM I, II y III, y la superóxido dismutasa, entre otras (Lee *et al.*, 1997; Zielinski, 1998; Lee *et al.*, 1999).

Uno de los aspectos notables de la CaM es que se une y activa numerosas proteínas blanco cuya secuencia de aminoácidos en los sitios de unión es muy distinta ("target variability"). Los sitios de unión en las proteínas blanco están constituidos por un conjunto de 12-30 aminoácidos consecutivos cargados positivamente y propensos a formar una  $\alpha$ -hélice al unirse a la CaM.

Estudios recientes por difracción de rayos X y por RMN han proporcionado

un modelo para explicar la interacción entre la CaM y sus proteínas blanco. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  (en un intervalo de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  M) a la CaM induce un cambio conformacional tal que en la superficie de la molécula quedan expuestos dos regiones hidrofóbicas rodeadas por cargas negativas, una en cada dominio globular; en esta conformación la CaM se une a sus proteínas blanco principalmente por interacciones electrostáticas contribuyendo así a la estabilidad del complejo CaM-proteína blanco. En disolución los dos dominios globulares se enroscan alrededor de la proteína blanco formando una estructura casi globular (Figura 4c). La activación de las enzimas blanco por parte de la CaM tiene lugar en dos fases, en la primera la interacción del  $\text{Ca}^{2+}$  con la CaM conlleva a la unión de la CaM con el dominio de unión de la enzima. A continuación se produce otra interacción adicional que tiene como efecto la activación de la enzima blanco (Coob *et al.*, 1999).

La aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida ha permitido establecer que algunos residuos en las formas helicoidales 2 y 6 son esenciales para la activación de las enzimas dependientes de CaM.

La selectividad de las respuestas reguladas por CaM en un determinado sistema celular y por lo tanto, de los procesos de transducción de señales provocadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , ésta regulada a través de la compartimentalización (o distribución subcelular) de las enzimas blanco de la CaM en las células y de las modificaciones postransduccionales de la CaM y las proteínas que esta regula. La expresión de isoformas también podría contribuir a la regulación de la interacción de las CaM con sus proteínas blanco (Coob *et al.*, 1999).

En el contexto de la presente investigación, la enzima NAD cinasa es la proteína blanco de la CaM seleccionada para evaluar el efecto de diversos metabolitos secundarios sobre la actividad regulatoria de la CaM. A continuación se mencionan los aspectos generales más importantes acerca de la importancia y función de la enzima NAD cinasa.

La enzima NAD cinasa (EC 2.7.1.23), llamada también ATP: NAD 2'-

## II. Antecedentes.

fosfotransferasa, es una enzima ubicua que tiene un papel importante en el metabolismo de la mayoría de los organismos. Esta enzima cataliza la conversión del NAD (dinucleótido de nicotinamida) a NADP (fosfato de dinucleótido de nicotinamida) en presencia de ATP (adenosina trifosfato). El grupo oxidrilo 2' de la ribosa unida a la adenina es el receptor del grupo fosfato en la conversión del NAD al NADP (Figura 6).

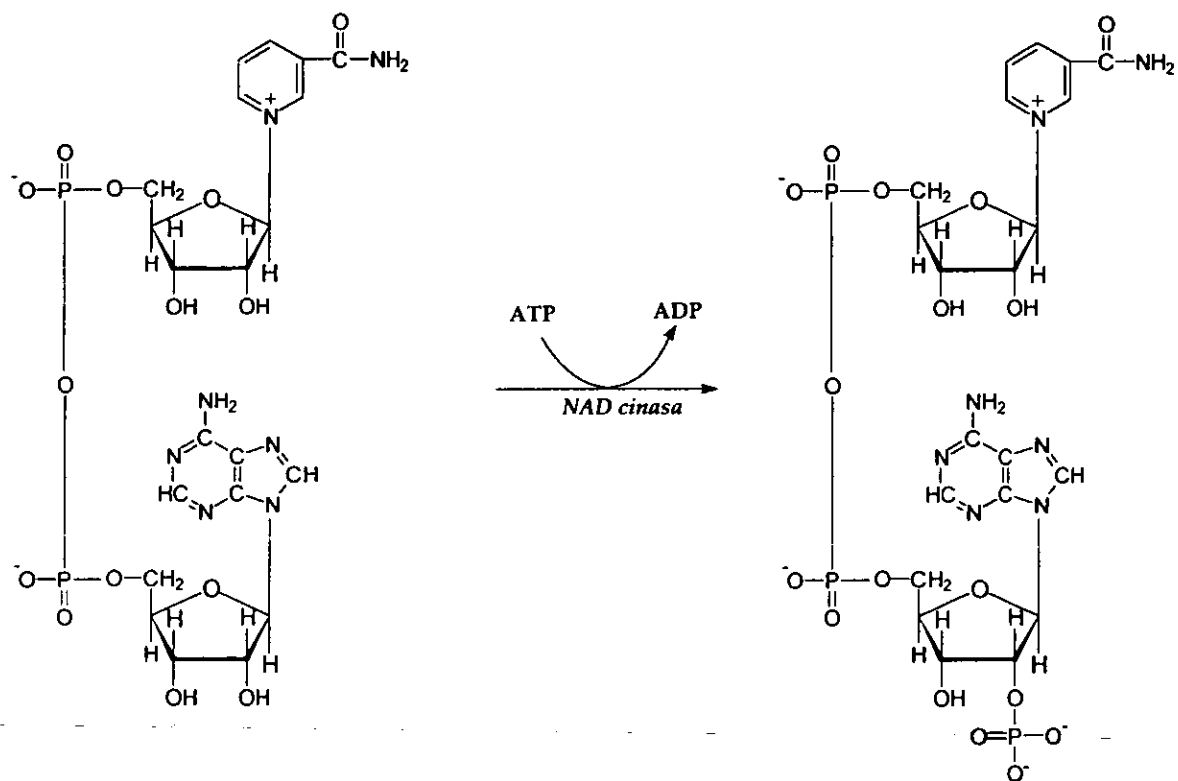


Figura 6. Formación del NADP a partir del NAD.

La enzima NAD cinasa fue descubierta en plantas de chícharo y posteriormente ha sido aislada de diversas especies vegetales. La purificación y la caracterización de la NAD cinasa dependiente de CaM se ha visto entorpecida por la alta inestabilidad de la enzima en el estado puro. Sin embargo, se han obtenido preparaciones de la enzima bastante homogéneas en presencia de Ca<sup>2+</sup> y CaM.



A la fecha no se tiene un conocimiento claro de la función fisiológica de esta enzima en plantas; Robert y colaboradores demostraron que la activación de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM juega un papel importante en la generación de especies activas de oxígeno (superóxidos y peróxidos) que podrían ser de utilidad para combatir la invasión de patógenos (Zielinski, 1998). También se ha encontrado que los niveles de esta enzima se incrementan notablemente durante el desarrollo radicular de las plántulas de chícharo (Allan y Trewavas, 1985). Además se ha comprobado la participación de la enzima en la coordinación de los mecanismos de defensa en plantas transgénicas de tabaco (Harding *et al.*, 1997).

La NAD cinasa es una enzima de gran importancia en los procesos metabólicos, ya que muchas otras enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos requieren NADP como coenzima. El NADP es entonces un componente crítico de numerosas rutas metabólicas. El NADPH proveniente de la reducción del NADP y desempeña también un papel importante en el metabolismo celular, proporcionando electrones y protones en casi todos los pasos intermediarios de las reacciones de reducción, en diferentes rutas biosintéticas. En consecuencia, la NAD cinasa es una enzima de suma importancia en los procesos anabólicos y catabólicos que tienen lugar en los procesos biosintéticos reductores de las células (Muto y Miyachi, 1977; Pou Marie-Anne *et al.*, 1977). Una diferencia notable entre enzima NAD cinasa aislada a partir de las células animales y la enzima obtenida de las células vegetales, con excepción de la NAD cinasa de los estomas, es que en el caso de las primeras, su actividad no se modula por la CaM. De tal forma que la regulación de la actividad de esta enzima por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM es crucial para la regulación del balance NAD/NADP, y en consecuencia, de la homeostasis metabólica en las células vegetales. Esta diferencia cobra aún más importancia con el descubrimiento de distintas isoformas de la CaM en vegetales y las implicaciones de que cada una de estas isoformas regula de manera específica la actividad de las diferentes enzimas dependientes de

## *II. Antecedentes.*

la CaM (Lee *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Así por ejemplo, en un estudio reciente conducido por Lee y colaboradores se identificaron cuatro isoformas distintas de CaM en la soya (SCaM-1, SCaM-2, SCaM-3 y SCaM-4). Estas isoformas presentaron diferentes propiedades electroforéticas, diferente antigenicidad y más importante aún diferentes capacidades para activar las enzimas NAD cinasa y fosfodiesterasa dependientes de CaM. La isoforma SCaM-4 no activó la enzima NAD cinasa pero sí la fosfodiesterasa, en tanto que, la SCaM-1 activó ambas enzimas. Posteriormente, se pudo demostrar mediante el empleo de una serie de CaMs (SCaMs) quiméricas generadas por intercambio de los dominios funcionales de SCaM-1 y SCaM-4 que sólo aquellas conteniendo el dominio I de la SCaM-1 inducía la activación de la enzima NAD cinasa.

A diferencia de otras enzimas dependientes de CaM, la NAD cinasa es sensible a los cambios postransduccionales de la CaM. Así, la trimetilación en el residuo 115 de la lisina de la CaM reduce en una tercera parte la activación de la enzima NAD cinasa de chícharo. Estos resultados apoyan la propuesta de que los cambios postransduccionales de la CaM constituyen un mecanismo selectivo para atenuar la actividad de la NAD cinasa (Coob *et al.*, 1999). Además se ha comprobado que la activación de esta enzima es altamente sensible al cambio de la secuencia de aminoácidos a lo largo de la molécula de la proteína. Una explicación de esta sensibilidad de la NAD cinasa puede ser que la porción flexible de la molécula entre el dominio II y III se encuentra extendido al máximo para efectuar la interacción con la NAD cinasa. En otro estudio realizado por el grupo de Roberts se comprobó que la secuencia glutamina, asparagina y prolina en la hélice ubicada entre los dominios I y II es necesaria para la activación de esta enzima (Coob *et al.*, 1999).

#### 4. METABOLITOS SECUNDARIOS QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA CaM.

La ofiobolina A es un sesterterpenoide producido por hongos fitopatógenos del género *Bipolaris* (*B. oryzae*, *B. oryzaemaydis* y *B. sorghicola*), mismos que producen severos daños en cultivos de maíz, arroz y sorgo. Se piensa que esta fitotoxina y compuestos relacionados juegan un papel importante en la patogénesis producida por los hongos productores. Las plantas infectadas por hongos del género *Bipolaris* presentan lesiones o manchas de dolor café características. La aplicación de las toxinas puras ocasionan los mismos síntomas. Los hongos fitopatógenos del género *Bipolaris* producen dos enfermedades de plantas "the Bengal rice famine" en la India y la " the Southern corn leaf blight" en E.U.A (Leung *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1985; Au y Leung, 1998; Au *et al.*, 2000a; 2000b).

En general, la ofiobolina A y congéneres afectan el crecimiento radicular de arroz y trigo, reducen la germinación del arroz e inducen cambios en la permeabilidad de la membrana del citoplasma, estimulan la liberación de  $\beta$ -cianina, de electrolitos y de glucosa de las raíces, disminuyen la fijación de CO<sub>2</sub> fotosintético, producen cambios en la respiración y estimulan la apertura de los estomas. De manera adicional, la ofiobolina A inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, inhibe la  $\beta$ -1,3 glucan sintetasa e interacciona con las CaMs de maíz y de cerebro de bovino. Este último hallazgo condujo a la propuesta de que la proteína CaM podría constituir uno de los blancos de acción de la fitotoxina (Au *et al.*, 2000a; 2000b).

La interacción de la ofiobolina A con la CaM se demostró a través de la inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPcíclico dependiente de CaM. La concentración de ofiobolina A requerida para inhibir la mitad de la actividad máxima de la enzima fosfodiesterasa en presencia de Ca<sup>2+</sup>-CaM es de 9  $\mu$ M. Cabe destacar que el sesterterpeno no modificó la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de CaM. La interacción directa de la CaM de cerebro de bovino con la ofiobolina A se demostró mediante experimentos de fluorescencia

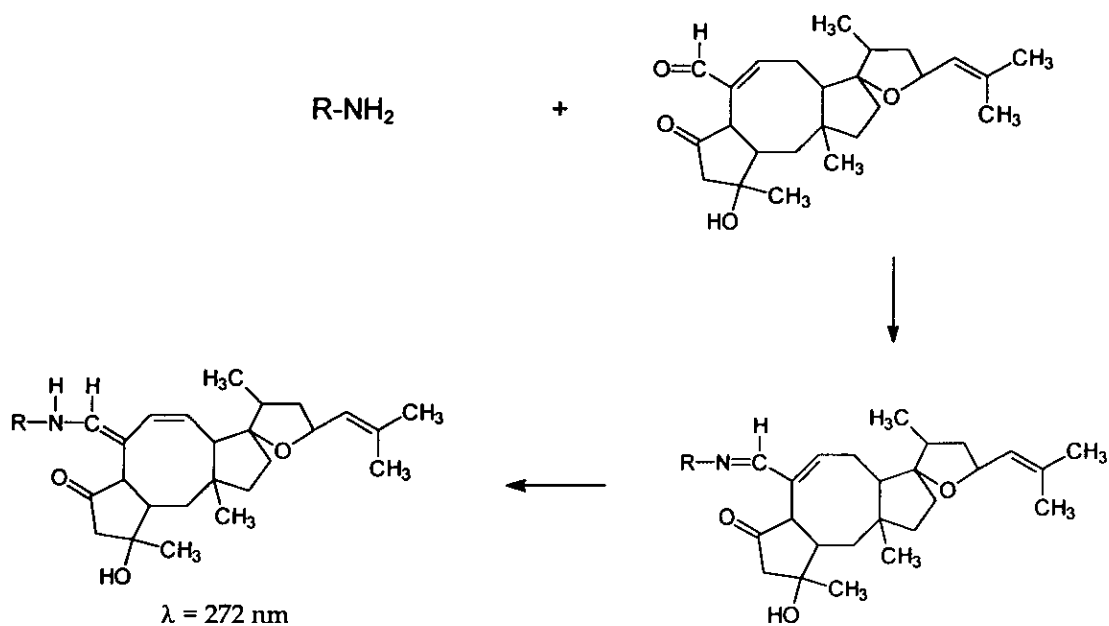
## II. Antecedentes.

encontrándose que esta propiedad, intrínseca a la tirosina, en el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se reducía drásticamente en presencia de la ofiobolina A. La disminución de la fluorescencia fue dependiente del tiempo; después de 30 minutos continuaba descendiendo (Leung *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1985; Au y Leung, 1998; Au *et al.*, 2000a; 2000b).

En otro grupo de experimentos utilizando una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) se demostró que la ofiobolina A retarda la movilidad electroforética de la CaM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El efecto fue menos pronunciado en presencia de EGTA, indicando que la movilidad de la proteína con el sesterterpeno es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados de la electroforesis desnaturalizante indicaron también que la unión *in vitro* de la ofiobolina A y la CaM es covalente (Leung *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1985).

El análisis por espectrometría de UV demostró que la ofiobolina A reacciona con CaM para producir un cromóforo que presenta un máximo de absorción definido a 272 nm. Este máximo de absorción se encontró también en el análisis del producto generado de la reacción del sesterterpeno con la lisina. Estos resultados permitieron proponer que la ofiobolina A reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina presentes en la CaM. El mecanismo de reacción propuesto se ilustra en la Figura 7. Asimismo fue posible demostrar que la CaM tratada con ofiobolina A no se hidroliza en las regiones próximas a los residuos lisina 75 y 77 (Au *et al.*, 2000a; 2000b).

Recientemente, en un estudio de mutagénesis dirigida sobre los residuos de lisina en la CaM, utilizando el método de escisión o intercambio de los residuos de lisina por glutamina o arginina, se demostró que los residuos de las posiciones 75, 77 y 148 de la CaM de cerebro de bovino son los sitios de unión para la ofiobolina A (Au y Leung, 1998; Au *et al.*, 2000a; 2000b).



**Figura 7.** Mecanismo de reacción propuesto para la interacción de la ofiobololina A y el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína CaM. El producto de la reacción es una enamina conjugada, formada por un arreglo tautomérico de la base de Schiff inicial.

Por último, se determinó el efecto *in vivo* de la ofiobololina A en maíz. Este ensayo se llevó a cabo mediante el tratamiento de las raíces de la planta con ofiobololina A, observándose una disminución en la concentración de CaM activa en los extractos obtenidos a partir de las raíces del maíz. Este experimento permitió establecer que el efecto fitotóxico de la ofiobololina A en las raíces y en las semillas de maíz correlaciona muy bien con la inhibición de la camodulina en los ensayos realizados *in vitro*. En ambos casos los efectos inhibitorios fueron dependiente del tiempo e irreversibles (Leung *et al.*, 1985).

## ***II. Antecedentes.***

Mediante el uso de técnicas de fluorescencia y mediante la verificación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de CaM, también fue posible demostrar que algunos flavonoides como la quercetina y compuestos aromáticos del tipo fenilpropanoide interaccionan la CaM e inhiben su habilidad para activar la fosfodiesterasa dependiente de CaM (Nishino *et al.*, 1984; Paliyath y Poovaiah, 1985).

### ***III. HIPÓTESIS.***

La hipótesis del presente trabajo considera que el criterio de selección ecológico, en conjunto con los resultados derivados de las evaluaciones preliminares de fitotoxicidad durante el proceso de selección del microorganismo, constituyen indicadores adecuados para la detección de especies fúngicas que proporcionen nuevos agentes fitotóxicos útiles para el desarrollo de agentes herbicidas de origen natural biodegradables.

## **IV. OBJETIVOS.**

### **1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el potencial herbicida de una serie de metabolitos secundarios obtenidos a partir del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix*, mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de dos especies vegetales y sobre el efecto regulatorio de la CaM en la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM, para así contribuir con el desarrollo de nuevos agentes herbicidas potenciales de origen natural más eficaces y biodegradables.

### **2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

A fin de cumplir con el objetivo primordial planteado, se formularon los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar el potencial de *G. polythrix* como una fuente de principios biodinámicos mediante la realización de ensayos biológicos de competencia directa con diferentes especies de hongos fitopatógenos.



#### *IV. Ojetivos.*

2. Establecer las condiciones óptimas de crecimiento para *G. polythrix*, mediante la realización de fermentaciones en pequeña escala, verificando el desarrollo del microorganismo en diferentes medios de cultivo y diferentes condiciones de incubación.

3. Obtener los extractos orgánicos a partir del medio de cultivo y del micelio de *G. polythrix*.

4. Evaluar cuantitativamente el posible efecto fitotóxico de los extractos fúngicos de *G. polythrix*, determinando el efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

5. Cultivar en mediana escala el hongo y preparar los extractos orgánicos correspondientes.

6. Verificar la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos resultantes de las fermentaciones en mediana escala utilizando el mismo bioensayo indicado en el inciso 4.

7. Aislar los productos naturales responsables de la actividad fitotóxica a partir de los extractos crudos derivados de los cultivos en mediana escala, a través de un estudio químico biodirigido utilizando un método bioautográfico para monitorear la actividad fitotóxica de las fracciones.

8. Determinar cuantitativamente el efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de las fracciones activas sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

9. Evaluar el posible efecto de los compuestos puros sobre la proteína CaM.

10. Evaluar cuantitativamente el efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM.

11. Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.

12. Fomentar la investigación multidisciplinaria de los productos naturales en México.

## ***V. PARTE EXPERIMENTAL.***

### ***1. MATERIAL FÚNGICO.***

El hongo *Guanomyces polythrix* González, Hanlin y Ulloa fue aislado en 1978 a partir de guano de murciélago, obtenido de la zona III de la Cueva del Diablo en Tepoztlán, estado de Morelos. La identidad del microorganismo fue establecida los Drs. María del Carmen González, Miguel Ulloa del Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología UNAM, y por el Dr. Richard T. Hanlin del Departamento de Patología de Plantas, Universidad de Georgia, USA.

El microorganismo, fue liofilizado y conservado en nitrógeno líquido durante 22 años. Muestras de referencia de este nuevo microorganismo se mantienen en el Herbario Nacional [MEXU, (voucher 24486)], Instituto de Biología, UNAM y en la colección micológica del Departamento de Patología de Plantas, Universidad de Georgia, USA [GAM, (voucher 5803)].

### ***2. ENSAYOS BIOLÓGICOS***

#### ***2.1 Ensayos de competencia directa.***

Para realizar el bioensayo de antagonismo directo se utilizaron cajas de Petri estériles que contenían 20 mL de agar de papa-dextrosa. Cada una de las placas se inoculó con el hongo y se incubó durante siete días a 28 °C. La inoculación se

## V. Parte Experimental.

realizó por picadura y estría utilizando sólo un extremo de la caja. Transcurrido el tiempo de incubación, en el extremo restante de la caja de Petri se sembraron cada uno de los microorganismos competidores. De nueva cuenta, las placas se incubaron por siete días a 28 °C. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los resultados obtenidos se expresan de manera cualitativa comparando el crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles de crecimiento que se desarrollaron paralelamente. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar (Gloer y Truckenbrod, 1988; Weber y Gloer, 1988).

Los microorganismos competidores utilizados en este bioensayo fueron cinco especies de hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium* sp. *Phoma* sp. y *Stachybotrys chartarum*. Las cepas utilizadas en este ensayo fueron proporcionadas por el Dr. Miguel Ulloa del Laboratorio de Micología, Instituto de Biología de la UNAM.

### 2.2 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos y compuestos puros aislados a partir de las fracciones activas.

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos y de los compuestos puros se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de dos arvenses, *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Beauv) L. (Gramineae), utilizando el método en caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990; 1995). Las semillas empleadas para las evaluaciones de fitotoxicidad fueron adquiridas en el Valley Seed Service de Fresno, California, E.U.A.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro (Whatman No. 1). Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en diclorometano o en metanol y se prepararon disoluciones con una concentración de 1000, 100 y 10 µg/mL para el caso de los extractos. Para

los compuestos puros se prepararon disoluciones con una concentración de 100, 10 y 1 µg/mL. Posteriormente, 3 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se inició la germinación de 60 semillas (20 por caja) de cada una de las especies de prueba, humedeciendo previamente el papel filtro con 3 mL de agua destilada.

Las cajas de Petri se incubaron a 30 °C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después de 24 hrs para el caso de *Amaranthus hypochondriacus* y 48 hrs para las semillas de *Echinochloa crusgalli*. Paralelamente, se evaluaron controles positivos y negativos. Como control positivo se empleó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, SIGMA), y como control negativo CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>OH. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante la prueba estadística de ANOVA ( $P \leq 0.5$ ). Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad de Finney.

### ***2.3 Bioautografía directa para el monitoreo de la actividad fitotóxica de las fracciones.***

Para monitorear la actividad fitoinhibidora del extracto total y de las fracciones primarias se utilizó un método bioautográfico. Los ensayos correspondientes se efectuaron empleando placas de vidrio de 20 × 5 cm, recubiertas de gel de sílice (gránulos de 0.63-0.2 mm, 230 mesh ASTM, Merck). En cada placa se aplicaron 5.0 µg de las muestras a evaluar y, posteriormente, se desarrollaron con un sistema de elución adecuado empleando los métodos convencionales para cromatografía en capa fina. Concluido el proceso de elución, se permitió la evaporación completa del disolvente y las cromatoplasmas se cubrieron con 20 mL de una suspensión de agar bacteriológico (DIFCO) al 1 %. Una vez solidificada la suspensión se colocaron las semillas de prueba hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie. Las placas se incubaron en una

## ***V. Parte Experimental.***

atmósfera húmeda a 28 °C durante 24 hrs (*A. hypochondriacus*) o 48 hrs (*E. crusgalli*). Transcurrido el periodo de incubación, se observaron las zonas de inhibición y se determinó el factor de retención ( $R_f$ ) correspondiente a la misma (Inoue *et al.*, 1992; Rahalison *et al.*, 1994; 1991). Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra de prueba, eluida en las mismas condiciones y revelada con un agente cromógeno apropiado (sulfato cérico). Como control positivo se empleó el 2,4-D, y todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

### ***2.4 Determinación de la interacción de los compuestos puros con la proteína CaM.***

Todos los reactivos utilizados en las pruebas bioquímicas se adquirieron en SIGMA.

#### ***2.4.1 Electroforesis desnaturalizante.***

La posible interacción entre los compuestos puros y la proteína CaM (espinaca y cerebro de bovino) se determinó de manera preliminar mediante una electroforesis desnaturalizante. En primer lugar, se prepararon mezclas conteniendo 10 µg del compuesto de prueba (10 µL de una disolución de 1 µg/mL en DMSO), 2 µg de CaM de espinaca o de cerebro de bovino y 3 µL de una disolución de CaCl<sub>2</sub> o de EGTA 1 mM. La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 30 µL con agua desionizada. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 90 minutos a 30 °C. Al término de la incubación las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 minutos con la finalidad de facilitar la interacción de los compuestos con la proteína CaM de prueba. A continuación, las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente y, finalmente, se les adicionaron 10 µL de buffer de carga (Liao, *et al.*, 1996). Seguidamente, se llevó a cabo una electroforesis vertical

descendente en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12%) para determinar si la CaM tratada experimentaba algún cambio en movilidad electroforética. La composición de los geles y de las disoluciones utilizadas se indican en Cuadro 6. Es importante mencionar que en todos los casos se utilizó quercetina como control positivo (Nishino *et al.*, 1984). Cada determinación se realizó por triplicado.

#### 2.4.2 Cromatografía de afinidad.

La interacción (covalente vs no covalente) de los compuestos fitotóxicos con la proteína CaM se determinó también mediante una cromatografía de afinidad sobre CaM de cerebro de bovino unida a agarosa (Bonza, *et al.*, 1998) seguida por el análisis espectrofotométrico de los eluatos de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Sebille y Thuaud (1980).

En primer lugar, se registraron de forma independiente los espectros de absorción en el UV-visible de los compuestos de prueba realizando un barrido de absorción en el intervalo comprendido entre 200 a 800 nm. Esta actividad permitió obtener la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ) de cada uno de los compuestos activos. Las muestras utilizadas para este análisis se prepararon disolviendo 1 mg del compuesto en 1 mL de diclorometano o en 1 mL de metanol. A partir de esta disolución, se prepararon las diluciones necesarias para obtener absorciones máximas con una densidad óptica comprendida entre 0.7 y 1.0 nm, utilizando un espectrofotómetro Cintra modelo 5.

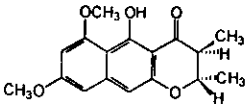
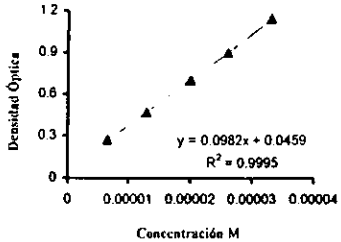
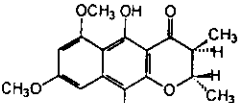
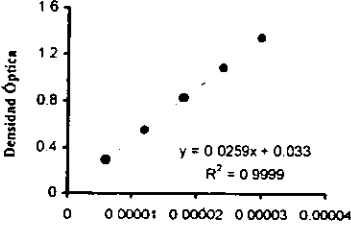
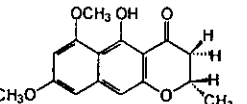
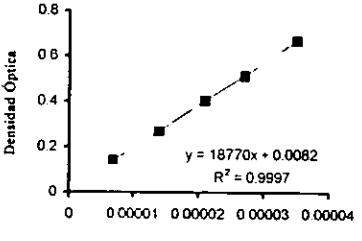
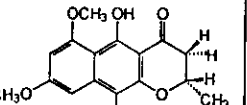
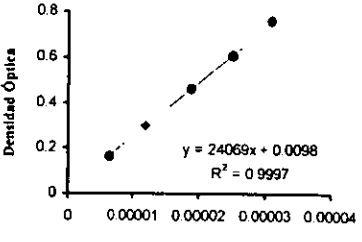
En segundo lugar, se construyeron las curvas estándar utilizando cinco concentraciones de cada metabolito fitotóxico. Para ello 1 mg de cada una de las muestras a evaluar se disolvió en 1 mL del disolvente apropiado ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y se prepararon diluciones con una concentración comprendida ente el intervalo de  $2.0 \times 10^{-5}$  a  $1.2 \times 10^{-4}$  M (Cuadro 7).

**Cuadro 6.** Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%)

GELES Y/O DISOLUCIONES	REACTIVOS	CANTIDAD UTILIZADA
Gel sellador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08 TEMED 100 % APS 10 %	1 mL 2 µL 10 µL
Gel separador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08 TRIS 3M pH 8.8 Agua TEMED 100 % APS 10 %	3.7 ml 1.17 mL 92 µL 4.26 mL 10 µL
Gel apilador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08 TRIS-HCl 1M pH 6.8 SDS 10% Agua TEMED 100 % APS 10 %	625 µL 625 µL 50 µL 3.67 µL 35 µL
Disolución de corrida	Trizma Glicina SDS Agua pH 8.3	6.0 g 28.5 g 2.0 g 2.0 L
Buffer de carga	TRIS-HCl 1M pH 6.8 Glicerol 50% SDS 10% 2-mercaptoetanol Azul de bromofenol 1% Agua	0.6 mL 5.0 mL 2.0 mL 0.5 mL 10.0 mL 0.9 mL
Disolución de tinción	Metanol 20% Ácido acético 0.5 % Azul de Coomassie R250	100.0 mL 25.0 mL 0.2 g

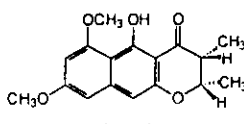
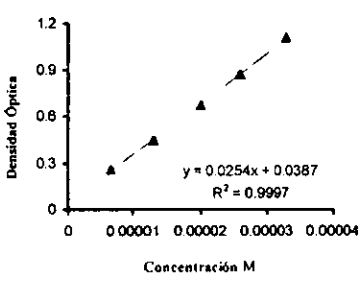
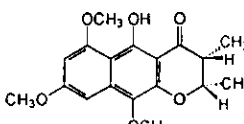
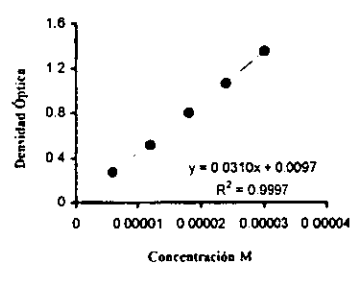
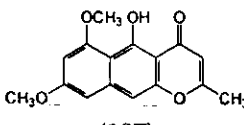
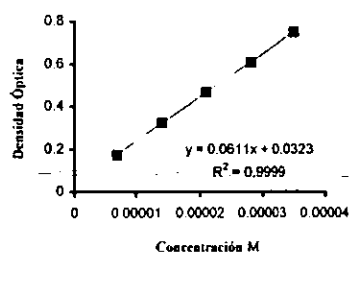
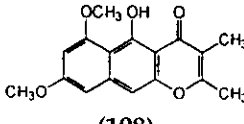
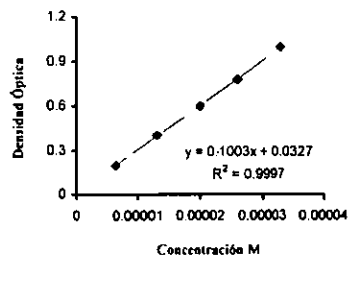


Cuadro 7. Resultados obtenidos en la realización de las curvas estándar de cada uno de los metabolitos fitotóxicos, aislados a partir de *G. polythrix*.

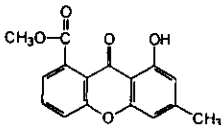
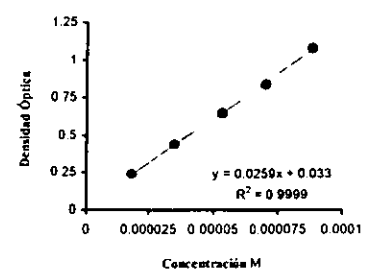
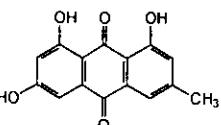
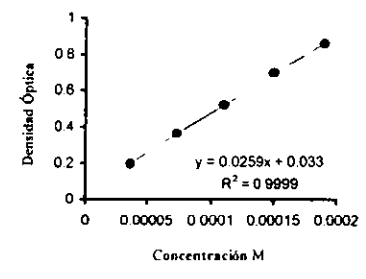
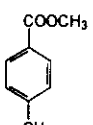
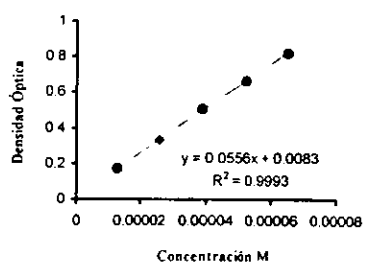
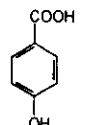
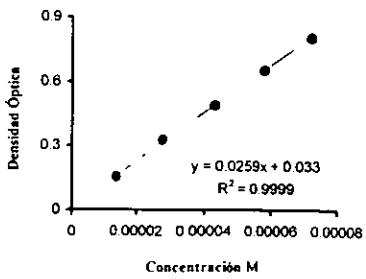
METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN (M)	DENSIDAD ÓPTICA	GRÁFICA
 <p>(101)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 281.0</p>	$6.6 \times 10^{-6}$ $1.3 \times 10^{-5}$ $2.0 \times 10^{-5}$ $2.6 \times 10^{-5}$ $3.3 \times 10^{-5}$	$0.2721 \pm 0.0024$ $0.4698 \pm 0.0036$ $0.6990 \pm 0.0075$ $0.8977 \pm 0.0049$ $1.1431 \pm 0.0031$	
 <p>(102)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 280.5</p>	$6.0 \times 10^{-6}$ $1.2 \times 10^{-5}$ $1.8 \times 10^{-5}$ $2.4 \times 10^{-5}$ $3.0 \times 10^{-5}$	$0.2973 \pm 0.0027$ $0.5494 \pm 0.0081$ $0.8232 \pm 0.0024$ $1.0833 \pm 0.0065$ $1.3396 \pm 0.0071$	
 <p>(103)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 280.5</p>	$6.9 \times 10^{-6}$ $1.4 \times 10^{-5}$ $2.1 \times 10^{-5}$ $2.7 \times 10^{-5}$ $3.5 \times 10^{-5}$	$0.1413 \pm 0.0036$ $0.2475 \pm 0.0084$ $0.4022 \pm 0.0054$ $0.5118 \pm 0.0035$ $0.6684 \pm 0.0028$	
 <p>(104)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 280.5</p>	$6.3 \times 10^{-6}$ $1.2 \times 10^{-5}$ $1.9 \times 10^{-5}$ $2.5 \times 10^{-5}$ $3.2 \times 10^{-5}$	$0.1638 \pm 0.0025$ $0.2993 \pm 0.0051$ $0.4636 \pm 0.0075$ $0.6068 \pm 0.0063$ $0.7612 \pm 0.0021$	

V. Parte Experimental.

**Cuadro 7.** Resultados obtenidos en la realización de las curvas estándar de cada uno de los metabolitos fitotóxicos, aislados a partir de *G. polythrix* (continuación).

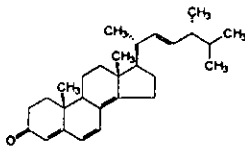
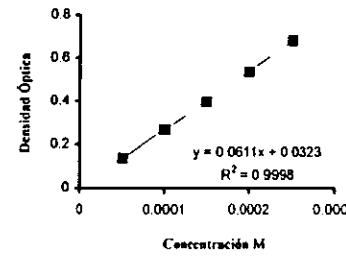
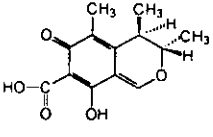
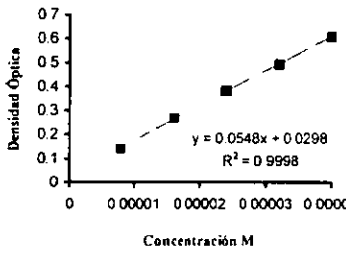
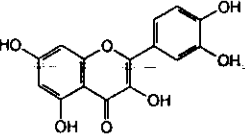
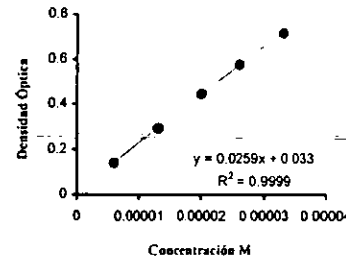
METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN (M)	DENSIDAD ÓPTICA	GRÁFICA
 <p>(105)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 281.0</p>	$6.6 \times 10^{-6}$ $1.3 \times 10^{-5}$ $2.0 \times 10^{-5}$ $2.6 \times 10^{-5}$ $3.3 \times 10^{-5}$	$0.2621 \pm 0.0022$ $0.4489 \pm 0.0031$ $0.6695 \pm 0.0065$ $0.8669 \pm 0.0071$ $1.1081 \pm 0.0080$	
 <p>(106)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 280.5</p>	$6.0 \times 10^{-6}$ $1.2 \times 10^{-5}$ $1.8 \times 10^{-5}$ $2.4 \times 10^{-5}$ $3.0 \times 10^{-5}$	$0.2754 \pm 0.0021$ $0.5199 \pm 0.0011$ $0.8048 \pm 0.0025$ $1.0697 \pm 0.0045$ $1.3598 \pm 0.0058$	
 <p>(107)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 276.0</p>	$7.0 \times 10^{-6}$ $1.4 \times 10^{-5}$ $2.1 \times 10^{-5}$ $2.8 \times 10^{-5}$ $3.5 \times 10^{-5}$	$0.1741 \pm 0.0052$ $0.3225 \pm 0.0085$ $0.4681 \pm 0.0042$ $0.6089 \pm 0.0046$ $0.7523 \pm 0.0074$	
 <p>(108)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 276.5</p>	$6.6 \times 10^{-6}$ $1.3 \times 10^{-5}$ $2.0 \times 10^{-5}$ $2.6 \times 10^{-5}$ $3.3 \times 10^{-5}$	$0.1966 \pm 0.0047$ $0.4024 \pm 0.0061$ $0.6012 \pm 0.0085$ $0.7815 \pm 0.0073$ $0.9940 \pm 0.0058$	

Cuadro 7. Resultados obtenidos en la realización de las curvas estándar de cada uno de los metabolitos fitotóxicos, aislados a partir de *G. polythrix* (continuación).

METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN (M)	DENSIDAD ÓPTICA	GRÁFICA
 (109) $\lambda_{Max}$ 280.5	$1.8 \times 10^{-5}$ $3.5 \times 10^{-5}$ $5.3 \times 10^{-5}$ $7.0 \times 10^{-5}$ $8.8 \times 10^{-5}$	$0.2385 \pm 0.0014$ $0.4374 \pm 0.0025$ $0.6468 \pm 0.0051$ $0.8409 \pm 0.0011$ $1.0792 \pm 0.0031$	
 (110) $\lambda_{Max}$ 264.0	$3.7 \times 10^{-5}$ $7.4 \times 10^{-5}$ $1.1 \times 10^{-4}$ $1.5 \times 10^{-4}$ $1.9 \times 10^{-4}$	$0.2018 \pm 0.0024$ $0.3648 \pm 0.0041$ $0.5190 \pm 0.0087$ $0.6946 \pm 0.0089$ $0.8544 \pm 0.0032$	
 (111) $\lambda_{Max}$ 250.0	$1.3 \times 10^{-5}$ $2.6 \times 10^{-5}$ $3.9 \times 10^{-5}$ $5.2 \times 10^{-5}$ $6.5 \times 10^{-5}$	$0.1723 \pm 0.0074$ $0.3326 \pm 0.0047$ $0.5055 \pm 0.0033$ $0.6623 \pm 0.0021$ $0.8180 \pm 0.0014$	
 (112) $\lambda_{Max}$ 254.0	$1.4 \times 10^{-5}$ $2.8 \times 10^{-5}$ $4.3 \times 10^{-5}$ $5.8 \times 10^{-5}$ $7.2 \times 10^{-5}$	$0.1562 \pm 0.0054$ $0.3376 \pm 0.0091$ $0.4882 \pm 0.0075$ $0.6536 \pm 0.0035$ $0.8049 \pm 0.0028$	

V. Parte Experimental.

**Cuadro 7.** Resultados obtenidos en la realización de las curvas estándar de cada uno de los metabolitos fitotóxicos, aislados a partir de *G. polythrix* (continuación).

METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN (M)	DENSIDAD ÓPTICA	GRÁFICA
 <p>(113)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 280.5</p>	<p><math>5.1 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>1.0 \times 10^{-4}</math></p> <p><math>1.5 \times 10^{-4}</math></p> <p><math>2.0 \times 10^{-4}</math></p> <p><math>2.5 \times 10^{-4}</math></p>	<p><math>0.1371 \pm 0.0028</math></p> <p><math>0.2682 \pm 0.0051</math></p> <p><math>0.3982 \pm 0.0065</math></p> <p><math>0.5387 \pm 0.0021</math></p> <p><math>0.6848 \pm 0.0041</math></p>	 <p>Densidad Óptica</p> <p>Concentración M</p> <p><math>y = 0.0611x + 0.0323</math></p> <p><math>R^2 = 0.9998</math></p>
 <p>(114)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 333.0</p>	<p><math>8.0 \times 10^{-6}</math></p> <p><math>1.6 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>2.4 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>3.2 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>4.0 \times 10^{-5}</math></p>	<p><math>0.1396 \pm 0.0044</math></p> <p><math>0.2690 \pm 0.0090</math></p> <p><math>0.3829 \pm 0.0047</math></p> <p><math>0.4948 \pm 0.0052</math></p> <p><math>0.6086 \pm 0.0061</math></p>	 <p>Densidad Óptica</p> <p>Concentración M</p> <p><math>y = 0.0548x + 0.0298</math></p> <p><math>R^2 = 0.9998</math></p>
 <p>Quercetina (115)</p> <p>(Control Positivo)</p> <p><math>\lambda_{Max}</math> 255.5</p>	<p><math>6.6 \times 10^{-6}</math></p> <p><math>1.3 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>2.0 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>2.6 \times 10^{-5}</math></p> <p><math>3.3 \times 10^{-5}</math></p>	<p><math>0.1409 \pm 0.0054</math></p> <p><math>0.2929 \pm 0.0021</math></p> <p><math>0.4454 \pm 0.0077</math></p> <p><math>0.5767 \pm 0.0089</math></p> <p><math>0.7168 \pm 0.0072</math></p>	 <p>Densidad Óptica</p> <p>Concentración M</p> <p><math>y = 0.0259x + 0.033</math></p> <p><math>R^2 = 0.9999</math></p>

Posteriormente, se determinó la densidad óptica de cada uno de los estándares preparados a partir de los compuestos puros, midiendo su absorbancia a la longitud de onda máxima ( $\lambda_{\max}$ ). En cada caso, se realizaron seis réplicas independientes y los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple. En cada análisis se obtuvieron los siguientes parámetros estadísticos: ordenada al origen ( $b$ ), pendiente de la recta ( $m$ ), coeficiente de correlación ( $r$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ). En el cuadro 7 se resumen las condiciones experimentales establecidas, así como las curvas estándar obtenidas para cada uno de los metabolitos fitotóxicos estudiados.

Una vez construidas las curvas estándar para cada metabolito se realizó el proceso cromatográfico sobre la columna de agarosa-CaM. Para ello se adicionaron 10  $\mu\text{g}$  del compuesto de prueba (a partir de una disolución en DMSO con una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre 200  $\mu\text{L}$  CaM de cerebro de bovino unida a agarosa, previamente equilibrada con disolución amortiguadora I (TRIS-HCl 20 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, DMSO al 2 % a pH 7.0). La mezcla anterior se incubó durante 90 minutos a 30 °C. Al término de la incubación se realizó una cromatografía en columna abierta para cada una de las muestras de prueba. En todos los casos el proceso de elución se efectuó utilizando cinco disoluciones diferentes, las cuales inducen cambios drásticos en las condiciones experimentales, permitiendo así determinar claramente si la interacción entre los metabolitos fitotóxicos y la proteína reguladora CaM es reversible o irreversible. Las disoluciones utilizadas incluyeron: disolución amortiguadora I de cloruro de calcio (TRIS-HCl 20 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, DMSO al 2 % a pH 7.0), disolución amortiguadora II libre de calcio (TRIS-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, DMSO al 2 % a pH 7.0), disolución amortiguadora III de calcio a pH básico (TRIS-HCl 20 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, DMSO al 2 % a pH 8.0), disolución NaCl 1M en DMSO al 2 %) y disolución de urea (6 M en DMSO al 2 %). En todos los casos el proceso de elución se efectuó utilizando cinco volúmenes de 200  $\mu\text{L}$ . Cada una de las fracciones obtenidas se concentró al vacío y se analizó espectrofotométricamente, registrando su densidad óptica a la longitud de onda de

## *V. Parte Experimental.*

máxima absorción determinada previamente para cada uno de los compuestos activos.

Finalmente, el análisis espectrofotométrico de cada una de las alícuotas obtenidas con los diferentes sistemas de elución permitió obtener la concentración de metabolito fitotóxico retenido en la columna de afinidad.

Se utilizó quercetina como control positivo y 3,4-dihidroxi-5-5'-dimetoxibenzilo (Estrada *et al.*, 1999) como control negativo. Este último metabolito no se retiene en la columna de afinidad después de eluir con el buffer de calcio a pH 7.0. En todos los casos se efectuaron tres repeticiones.

### *2.5. Determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM.*

#### *2.5.1 Obtención de la enzima.*

La enzima NAD cinasa fue parcialmente purificada por la Dra. Alicia Gamboa de Buen (Instituto de Ecología) a partir plántulas de chícharo germinadas durante catorce día según el método de Harmon (Harmon *et al.*, 1984). La metodología empleada se describe a continuación:

En un mortero se homogeneizaron 50 g de tejido vegetal, empleando nitrógeno líquido para facilitar la operación de molienda. Al homogenato se adicionó buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 1 mM, PMS 1 mM, benzamida 1 mM, benzamidina-HCl 1mM, ácido amino caproico 5 mM, DTT 1 mM y leupeptina 2 nM a pH 7.5) hasta obtener una concentración final de 2 mL de buffer por gramo de tejido, mezclando suavemente durante cada adición. Todo el proceso de aislamiento se realizó a 4 °C.

A continuación, el homogenato se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 13700g durante 30 minutos. El sobrenadante se mezcló con 10 mL de sulfato de protamina al 0.7 % y se agitó durante 15 minutos. El precipitado obtenido se recolectó por centrifugación a 2700g durante 15 minutos y se

resuspendió en 15 mL de acetato de sodio 0.2 M, 1 mg/mL de pepstatina a pH 6.0. Posteriormente, se centrifugó a 3000g durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y nuevamente el precipitado se resuspendió en 15 mL de acetato de sodio 0.2 M y se centrifugó (3000g) durante 15 minutos.

Los sobrenadantes (30 mL) se combinaron y luego se añadió sulfato de amonio hasta lograr una concentración del 55 %. El precipitado obtenido se centrifugó a 2700g durante 45 minutos. A continuación, el precipitado se resuspendió en 20 mL del buffer de extracción a pH 7.0 y la suspensión se mezcló con un volumen igual de DEAE sefacel, equilibrado previamente con el buffer de extracción a pH 7.0. La mezcla resultante se agitó lentamente durante 30 minutos. Transcurrido el periodo de agitación, la suspensión de DEAE sefacel se colocó en una columna de separación (cromatografía en columna abierta) y se recolectó el líquido remanente; este último contiene la enzima NAD cinasa. La proteína se obtuvo añadiendo sulfato de amonio hasta obtener una concentración del 55 %. El precipitado obtenido se centrifugó a 2700g durante 45 minutos. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 1 mL de buffer de extracción (pH 7.5) y se llevaron a una concentración de 5% en glicerol. Finalmente, se prepararon alícuotas de 20  $\mu$ L y se congelaron en nitrógeno líquido. La actividad de la enzima permanece estable por un periodo de tres meses.

### ***2.5.2 Determinación del contenido total de proteínas en los extractos crudos de enzima NAD cinasa.***

La concentración total de proteínas en los diferentes extractos crudos con actividad de NAD cinasa se obtuvo de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976).

La curva estándar de proteínas se construyó utilizando como patrón de referencia albúmina sérica bovina en un intervalo de concentraciones  $2.0 \times 10^{-3}$  a  $1.4 \times 10^{-2}$   $\mu$ g/mL y azul de Coomassie como agente colorimétrico. La concentración

## V. Parte Experimental.

de proteínas en los extractos crudos se obtuvo utilizando en todos los casos una alícuota de 10  $\mu\text{L}$ .

El cuadro 8 se resumen las condiciones experimentales utilizadas y la curva estándar obtenida. En el Cuadro 9 se indica el contenido de proteínas de los diferentes extractos crudos con actividad de NAD cinasa.

**Cuadro 8.** Resultados obtenidos para la curva estándar (albúmina sérica bovina) realizada para determinar el contenido de proteínas en el extracto crudo de enzima NAD cinasa aislada a partir de plántulas de chícharo.

ALBÚMINA SÉRICA BOVINA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	DENSIDAD ÓPTICA*	CURVA ESTÁNDAR
$2.0 \times 10^{-3}$	$0.1687 \pm 0.0025$	
$4.0 \times 10^{-3}$	$0.2972 \pm 0.0075$	
$6.0 \times 10^{-3}$	$0.4392 \pm 0.0078$	
$8.0 \times 10^{-3}$	$0.5768 \pm 0.0063$	
$1.0 \times 10^{-2}$	$0.7171 \pm 0.0027$	
$1.2 \times 10^{-2}$	$0.8437 \pm 0.0037$	
$1.4 \times 10^{-2}$	$0.9987 \pm 0.0027$	

\* Representa el promedio de seis repeticiones.

**Cuadro 9.** Determinación del contenido de proteínas de los diferentes extractos proteínicos con actividad de NAD cinasa aislados a partir de plántulas de chícharo.

MUESTRA PROBLEMA	DENSIDAD ÓPTICA*	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Extracto crudo 1	$0.8814 \pm 0.0055$	0.0124
Extracto crudo 2	$0.9187 \pm 0.0021$	0.0130
Extracto crudo 3	$0.9025 \pm 0.0033$	0.0121
Extracto crudo 4	$0.9240 \pm 0.0058$	0.0127

\* Representa el promedio de seis repeticiones.



### 2.5.3 Determinación de la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de diferentes concentraciones de CaM.

La actividad de la enzima NAD cinasa se determinó utilizando el método experimental descrito por Harmon y colaboradores (Harmon *et al.*, 1984). Este procedimiento permite medir la actividad de la enzima mediante la utilización de un ensayo acoplado que cuantifica la cantidad de NADPH generado a partir de NADP por catálisis de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y en presencia de glucosa 6-fosfato. La cantidad final de NADPH cuantificado se correlaciona directamente con la cantidad de NADP generado y éste a su vez con la actividad de la enzima NAD cinasa.

A cada una de las muestras a evaluar se adicionó una concentración diferente de CaM de espinaca o de cerebro de bovino [0.5 a 3.0 µg] y cantidades apropiadas de la enzima NAD cinasa (0.010-0.015 µg de proteínas). La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 500 µL con el buffer de reacción I (Tricina 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NAD 2 mM, ATP 3 mM, a pH 8.0). Es importante mencionar que las concentraciones de NAD y de ATP utilizada en el buffer de reacción I son saturantes. Posteriormente, todas las muestras se incubaron durante 20 minutos a 25 °C. Al término de la incubación las muestras fueron sometidas a ebullición durante 2 minutos. A continuación se cuantificó la cantidad de NADP producido durante la incubación utilizando un método espectrofotométrico. La metodología experimental se describe a continuación: Una vez que la mezcla de reacción alcanzó la temperatura ambiente, se adicionaron 500 µL de buffer de reacción II (Tricina 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 1 mM, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.8 mM, benzamida 1 mM, metasulfato de fenazina 0.02 mg/mL, 2,6-dicloroindolifenol 0.03 mg/mL a pH 8.0) y 2 µL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.06 unidades). La concentración de NADPH presente en el medio de reacción se cuantificó espectrofotométricamente mediante la determinación de la variación de la densidad óptica a 600 nm. El análisis mediante regresión lineal simple de cada una de las curvas permite obtener las constantes de rapidez para

## ***V. Parte Experimental.***

cada una de las muestras evaluadas utilizadas. La interpolación de estas constantes en una curva patrón (de NADPH) permite determinar cuantitativamente la concentración de NADP producido y por ende la actividad de la enzima NAD cinasa en cada tratamiento. Cada determinación se realizó por triplicado.

La actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM se determinó empleado el método experimental indicado anteriormente, utilizando la misma cantidad de extracto crudo que para la evaluación de la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de diferentes concentraciones de CaM (0.010-0.015  $\mu\text{g}$  de proteínas).

### ***2.5.4 Obtención de la curva estándar de NADP.***

La curva estándar de NADP se construyó utilizando un método espectrofotométrico registrando la variación en la densidad óptica a 600 nm en función del tiempo. Se emplearon cinco concentraciones de NADP [ $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $5.0 \times 10^{-3}$ ,  $7.5 \times 10^{-3}$ ,  $1.0 \times 10^{-2}$  y  $1.25 \times 10^{-2}$ ] y seis replicas por concentración. A cada muestra se le adicionaron 1000  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción II (Tricina 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EGTA 1 mM, Glucosa-6-fosfato 0.8 mM, benzamida 1 mM, fenazina 0.02 mg/mL, 2,6-dicloroindolfenol 0.03 mg/mL a pH 8.0) y 2  $\mu\text{L}$  de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.06 unidades). La concentración de NADPH presente en el medio de reacción se cuantificó mediante la determinación en la variación de la densidad óptica a 600 nm. En la Figura 8 se representan cada una de las gráficas obtenidas para la construcción de la curva estándar de NADPH. De nueva cuenta, el análisis de regresión lineal simple de las curvas registradas permitió obtener las constantes de rapidez para cada una de las concentraciones utilizadas. Es importante mencionar que las concentraciones de NADP por arriba de 0.0125 mM no son representativas debido a que en estos casos se ha alcanzado la saturación del sistema. Finalmente, la curva estándar de NADP se obtuvo mediante la realización

de una gráfica de rapidez de reacción *vs* las diferentes concentraciones de NADP evaluadas (Figura 9).

**2.5.5 Determinación del efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la enzima NAD cinasa dependiente de CaM.**

El ensayo consiste en incubar diferentes concentraciones de los compuestos de prueba [ $2.0 \times 10^{-5}$ ,  $3.0 \times 10^{-5}$ ,  $6.0 \times 10^{-5}$ ,  $9.0 \times 10^{-5}$  y  $1.2 \times 10^{-4}$ ] (5 mg/mL en DMSO) con  $\text{CaCl}_2$ , CaM en concentraciones saturantes (de espinaca y de cerebro de bovino) y con la mezcla de reacción para determinar la actividad de la enzima NAD cinasa, de acuerdo con el procedimiento experimental descrito en el inciso 2.5.3 y realizando cada determinación por triplicado.

Con base en la información obtenida a partir de la Figura 9, es posible expresar cuantitativamente (mM de NADP/min) cada uno de los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas sobre la actividad del complejo enzimático NAD cinasa-CaM en presencia de los diferentes compuestos fitotóxicos.

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante la prueba estadística de ANOVA ( $P \leq 0.5$ ).

**2.5.6 Determinación del efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM.**

La determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM se verificó utilizando el método experimental indicado en el punto anterior (inciso 2.5.5), en ausencia de la proteína CaM.

## V. Parte Experimental.

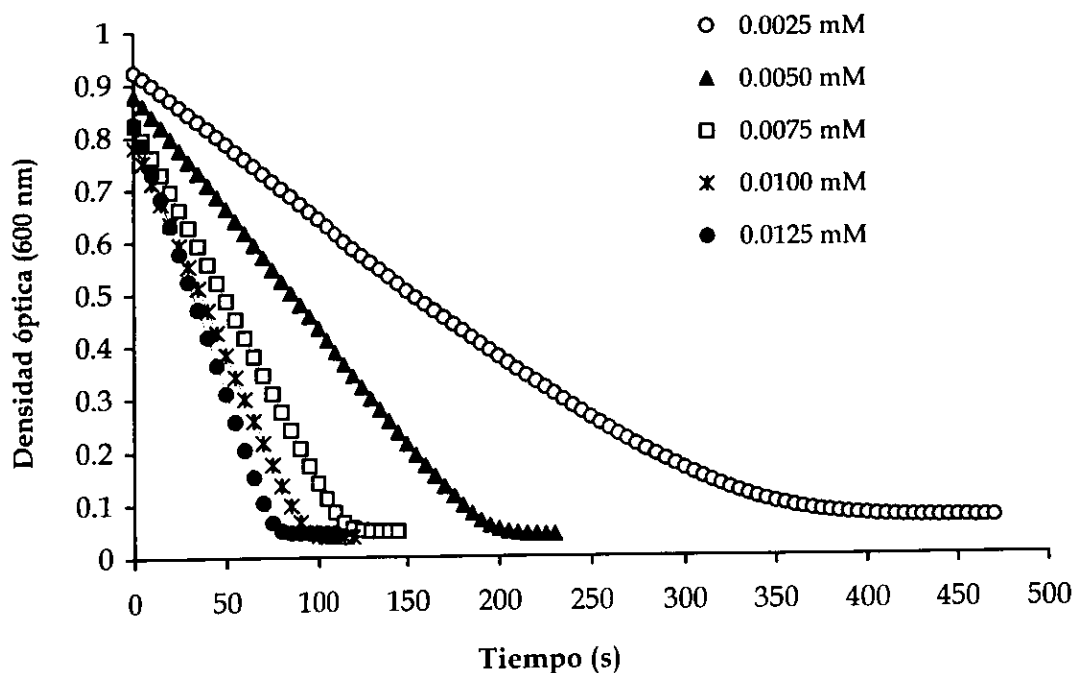


Figura 8. Curva estándar de NADP. Cada punto representan la media de tres réplicas independientes.

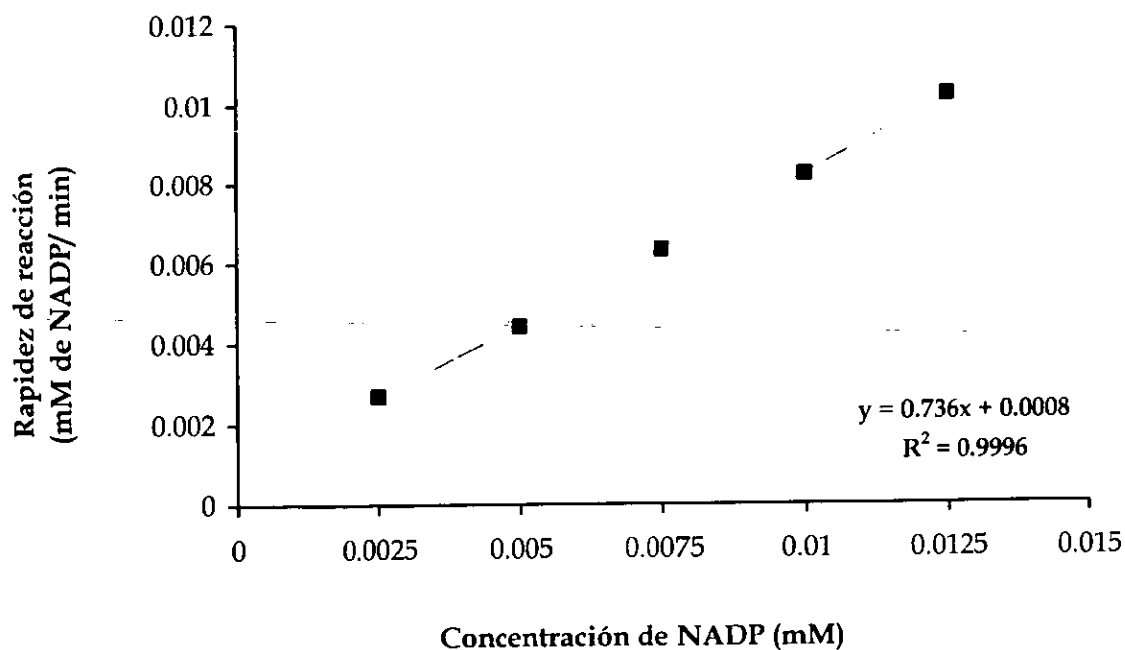


Figura 9. Velocidad de reacción en mM de NADP  $\text{min}^{-1}$  para diferentes concentraciones de NADP.

### 2.5.7 Determinación del efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El efecto de compuestos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se evaluó utilizando una concentración de NADP de  $5.0 \times 10^{-3}$  M y diferentes concentraciones de los metabolitos de prueba [ $2.0 \times 10^{-5}$ ,  $3.0 \times 10^{-5}$ ,  $6.0 \times 10^{-5}$ ,  $9.0 \times 10^{-5}$  y  $1.2 \times 10^{-4}$ ] (5 mg/mL en DMSO), utilizando la metodología experimental descrita en el inciso 2.5.3.

### 3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO COPRÓFILO *GUANOMYCES POLYTHRIX*.

Las condiciones óptimas del cultivo de *G. polythrix* se establecieron realizando fermentaciones en pequeña escala (1 L) y verificando el desarrollo del microorganismo en diferentes medios de cultivo y diferentes periodos de incubación. Posteriormente, se prepararon los extractos a partir de los cultivos obtenidos y se evaluó el potencial fitotóxico de los mismos.

En primer lugar, *G. polythrix* se cultivó en condiciones estáticas, utilizando cinco medios de cultivo diferentes: papa-dextrosa, Saboraud, malta y dextrosa, Czapek Dox y ocho verduras (Cuadro 10). En todos los casos se emplearon dos periodos de incubación (quince y treinta días) y una temperatura de incubación de 28 °C.

Para realizar las fermentaciones se utilizaron matraces Fernbach de 2800 mL conteniendo un litro de medio de cultivo. El inóculo consistió en un cuadro de agar de 1 cm<sup>2</sup> de un cultivo del microorganismo en medio sólido, previamente incubado por un periodo de quince días en agar de papa-dextrosa. Al término del crecimiento, se procedió a la preparación de los extractos microbianos (Gamble *et al.*, 1995).

## V. Parte Experimental.

El producto de la fermentación de cada medio de cultivo se filtró a través de cuatro capas de gasa, separando el medio de cultivo del micelio. El micelio húmedo obtenido durante la incubación (quince y treinta días) se sometió a un proceso de maceración con diclorometano, realizándose tres extracciones con un volumen de un 1.5 L del disolvente, dejando entre cada extracción un periodo de tres días. Al término de la maceración, los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío.

Cuadro 10. Medios de cultivo empleados para el desarrollo de *G. polythrix*.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN
Papa y dextrosa	Infusión de papa 200.0 g Dextrosa 20.0 g Agua destilada 1000 mL
Sabouraud	Peptona de caseína 5.0 g Peptona de carne 5.0 g Dextrosa 20.0 g Agua destilada 1000 mL pH = 5.7
Malta	Extracto de malta 40.0 g Extracto de levadura 5.0 g Agua destilada 1000 mL
Ocho verduras	Jugo de verduras V-8 180 mL Carbonato de calcio 2.0 g Agua destilada 1000 mL pH = 5.5
Czapek Dox	Nitrato de sodio 2.0 g Cloruro de potasio 0.5 g Glicerofosfato de magnesio 0.5 g Sulfato ferroso 0.01 g Sulfato de potasio 0.35 g Sacarosa 30.0 g Agua destilada 1000 mL pH = 6.8

Por otro lado, los extractos del medio de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones empleando también diclorometano como disolvente. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío.

Cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio (10 extractos) y del medio de cultivo generado en las distintas fermentaciones (10 extractos) se analizó por cromatografía en capa delgada, observándose que cada par de extractos (medio de fermentación y micelio) eran cromatográficamente similares, por lo que se decidió combinarlos (mismo medio de cultivo y periodo de incubación) obteniéndose así dos extractos por medio de cultivo y uno por cada periodo de incubación (15 y 30 días). Cada uno de los extractos resultantes se ensayó para la determinar su potencial fitotóxico utilizando el método de la caja de Petri descrito en el inciso 2.2.

Considerando que en condiciones estáticas el mejor rendimiento se obtuvo con el medio de cultivo de papa y dextrosa, se procedió a realizar otra fermentación en este medio bajo condiciones de agitación (200 rpm) y dos periodos de incubación (quince y treinta días). Transcurrido el periodo de incubación se procedió a preparar los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, así como a verificar la actividad fitotóxica de los extractos obtenidos. Ambos procesos se realizaron de acuerdo con los procedimientos experimentales indicados anteriormente.

#### **4. OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA.**

##### **4.1. Cultivo con agitación.**

Para la obtención del cultivo en mediana escala (30 L) con agitación se utilizó la metodología indicada en el punto 3, y las condiciones óptimas de crecimiento establecidas previamente.

## ***V. Parte Experimental.***

La fermentación se realizó en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para ello se utilizaron tres fermentadores de 15 L de capacidad. A cada uno de los fermentadores se le adicionaron 10 L de medio de cultivo de papa y dextrosa y como inóculo el contenido de una caja de Petri con el microorganismo previamente incubado por un periodo de quince días en agar de papa y dextrosa. Cada uno de los fermentadores se incubó durante quince días a 28 °C con una agitación de 200 rpm mediante propelas y un flujo de aire de 8 a 10 L/ min.

El desarrollo del cultivo en mediana escala con agitación y el efecto fitotóxico del medio se monitorearon durante todo el periodo de incubación. El monitoreo se llevó a cabo los días 6, 9 y 12 de la fermentación. Para ello se tomaron alícuotas de 100 mL del cultivo de cada uno de los fermentadores y se prepararon los extractos orgánicos correspondientes. Cabe mencionar que en esta ocasión el medio de cultivo y el micelio se extrajeron de manera conjunta debido a que la muestra a procesar era muy pequeña. La verificación del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos a partir del monitoreo del cultivo en mediana escala con agitación se realizó de la forma indicada en el inciso 2.2

Una vez concluido el proceso de fermentación, el micelio se separó del medio de cultivo mediante centrifugación. Posteriormente, se procedió a preparar los extractos totales del cultivo utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente de extracción. Por último, se verificó la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos resultantes. Ambos procesos se realizaron de acuerdo a los procedimientos descritos en el punto 3.

### ***4.2. Cultivo estático.***

La fermentación en mediana escala (10 L) en condiciones estáticas se realizó en diez matraces Fernbach de 2800 mL. A cada uno de ellos se adicionó un litro de



medio de cultivo de papa-dextrosa y, una vez inoculados con un cuadro de agar de 1 cm<sup>2</sup> de un cultivo sólido del microorganismo, se incubaron estáticamente por un periodo de treinta días a 28 °C. Al término de la incubación se obtuvieron los extractos orgánicos y se verificó su potencial fitotóxico siguiendo los procedimientos experimentales descritos en los incisos 2.2 y 3.

## **5. ESTUDIO QUÍMICO.**

### **5.1 Procedimientos generales de análisis.**

#### **5.1.1 Métodos cromatográficos.**

Los extractos orgánicos obtenidos de las distintas fermentaciones de *G. polythrix* se fraccionaron mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> Merck de 0.25 mm de espesor), varios sistemas de eluyentes (Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH en diversas proporciones) y como agente cromogénico se empleó una disolución de sulfato cérico (12.0 g sulfato cérico, 22.2 mL ácido sulfúrico concentrado y 350.0 g hielo); para obtener el desarrollo del color fue necesario calentar cada cromatoplaca por dos minutos aproximadamente a 110 °C (Ghisalberti, 1993; Stahl, 1969). La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 mm de espesor aplicando en cada cromatoplaca aproximadamente 10 mg de muestra.

## ***V. Parte Experimental.***

### ***5.1.2. Caracterización de los metabolitos activos.***

#### ***5.1.2.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.***

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se rpm describen sin corregir. La rotación óptica se registró en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros de dicroísmo circular (DC) se determinaron en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25 °C en metanol. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RNM  $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) se generaron en un aparato Varian UNITY PLUS 500, el cual se operó a una frecuencia de 500 MHz y de 125 MHz, respectivamente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de los nuevos productos naturales se obtuvieron en un aparato Bruker DM X500. Todos los espectros se registraron en  $\text{CDCl}_3$  y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, en pastilla de KBr y en película. Los espectros en el ultravioleta (UV) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 202. Los espectros de masas se registraron en un aparato JEOL JMS-AX505 HA mediante introducción directa a 70 eV. El análisis de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química, en un difractómetro Nicolet R3m.

### ***5.2. Fraccionamiento biodirigido.***

#### ***5.2.1 Extracto del cultivo con agitación.***

El extracto activo combinado del medio de cultivo y del micelio (7.6 g de un sólido de color café verdoso) se fraccionó mediante una cromatografía en columna

abierta, utilizando 200 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 465 fracciones de 50 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 12 fracciones primarias (FI<sub>A</sub>-FXII<sub>A</sub>). En el Cuadro 11 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas. La actividad fitotóxica se concentró en los grupos de fracciones FIV<sub>A</sub><sup>a</sup> -FVIII<sub>A</sub><sup>a</sup> de acuerdo con los resultados del ensayo bioautográfico.

**Cuadro 11.** Fraccionamiento preliminar del extracto obtenido a partir del cultivo con agitación.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-48	FI <sub>A</sub>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	49-72	FII <sub>A</sub>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	73-100	FIII <sub>A</sub>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	101-135	FIV <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	136-150	FV <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	151-164	FVI <sub>A</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	99:1	165-189	FVII <sub>A</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	190-203	FVIII <sub>A</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	204-265	FIX <sub>A</sub>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	266-327	FX <sub>A</sub>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	328-410	FXI <sub>A</sub>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	411-465	FXII <sub>A</sub>

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FI<sub>A</sub>-FXII<sub>A</sub> = cultivo con agitación.

## **V. Parte Experimental.**

### **5.2.1.1 Separación y purificación de los metabolitos secundarios.**

#### **5.2.1.1.1 Obtención los compuestos (101) y (109).**

El compuesto **101** precipitó de manera espontánea como un sólido cristalino de color amarillo a partir de la fracción primaria activa FIV<sub>A</sub><sup>a</sup> (11.6 mg) [Cuadro 11], el cual se sometió a sucesivas recristalizaciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Como resultado de este proceso se obtuvieron 9.2 mg del compuesto **101** con un p. f. de 165-166 °C.

Por otra parte, el análisis cromatográfico de las aguas madres de la fracción primaria reveló la presencia de un segundo compuesto mayoritario. Con la finalidad de separar este metabolito se realizó una cromatografía preparativa en capa delgada utilizando una elución múltiple con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de procesar las placas de la manera convencional, se obtuvieron 2.3 mg del compuesto **109** como un sólido cristalino de color anaranjado claro, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un p.f. de 197-198 °C.

#### **5.2.1.1.2 Obtención de los compuestos (102)-(106).**

De la fracción activa FV<sub>A</sub><sup>a</sup> (164.2 mg) [Cuadro 11] precipitó un sólido amorfo de color amarillo. El análisis mediante cromatografía en capa fina de este sólido demostró que se trataba de una mezcla de dos constituyentes mayoritarios. La separación de los productos naturales se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El proceso de elución se realizó cinco veces. Como resultado del procedimiento anterior, se obtuvieron 10.5 mg del compuesto **102** en forma de un sólido cristalino de color amarillo intenso, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un p. f. de 153-155 °C. Por otra parte, se obtuvieron 20 mg adicionales del compuesto **101**.

Las aguas madres de la fracción primaria FV<sub>A</sub><sup>a</sup>, constituidas por una mezcla compleja, se sometieron a un fraccionamiento secundario mediante una

cromatografía en columna abierta (111.2 mg de fracción y 15 g de gel de sílice). Se obtuvieron un total de 270 fracciones de 10 mL cada, las cuales se combinaron en diez grupos de fracciones secundarias tomando en cuenta su similitud en composición por cromatografía en capa fina. En el Cuadro 12 se presentan las fracciones combinadas y los sistemas de elución empleados. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante el ensayo de bioautografía directa, encontrándose que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones secundarias FV<sub>A</sub>-5<sup>a</sup> y FV<sub>A</sub>-6<sup>a</sup>.

**Cuadro 12.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FV<sub>A</sub><sup>a</sup>.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-8	FV <sub>A</sub> -1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	9-21	FV <sub>A</sub> -2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	22-40	FV <sub>A</sub> -3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	71-69	FV <sub>A</sub> -4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	70-156	FV <sub>A</sub> -5 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	157-165	FV <sub>A</sub> -6 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	166-178	FV <sub>A</sub> -7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	179-190	FV <sub>A</sub> -8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	191-218	FV <sub>A</sub> -9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	219-243	FV <sub>A</sub> -10
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	244-258	FV <sub>A</sub> -11
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	259-270	FV <sub>A</sub> -12

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FV<sub>A</sub>1-FV<sub>A</sub>-12 = cultivo con agitación.

## ***V. Parte Experimental.***

El análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones activas demostró que la fracción FV<sub>A</sub>-5<sup>a</sup> estaba constituida por cuatro compuestos mayoritarios en tanto que la fracción FV<sub>A</sub>-6<sup>a</sup> contenía dos metabolitos principales. Con la finalidad de separar los constituyentes presentes en las dos fracciones activas, se realizaron varias purificaciones por cromatografía preparativa en capa delgada, empleando elución múltiple (5x) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1).

De la fracción activa FV<sub>A</sub>-5<sup>a</sup>, se obtuvieron 9.0 mg de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona [103] y 5.0 mg de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona [104]. De manera adicional, se obtuvieron 3 mg de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxihidroxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [101] y 4 mg de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxihidroxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [102].

De la fracción activa FV<sub>A</sub>-6<sup>a</sup> se separaron 2.8 mg de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [105] y 2.1 mg de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [106]. Los metabolitos secundarios 103, 104, 105 y 106, aislados a partir las aguas madres de la fracción primaria FV<sub>A</sub>-5<sup>a</sup> se obtuvieron como sólidos cristalinos de color amarillo intenso, solubles en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con puntos de fusión de 175-177, 160-162, 165-166 y 154-156 °C, respectivamente.

### ***5.2.1.1.3 Obtención de los compuestos (107), (108), (111), y (113).***

La fracción primaria activa FVI<sub>A</sub><sup>a</sup> (316.3 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 30 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, diclorometano y metanol en diferentes proporciones. Se obtuvieron 325 fracciones de 20 mL cada una, reuniéndose las que resultaron cromatográficamente similares, para generar ocho grupos de fracciones secundarias. El monitoreo de la actividad fitotóxica, mediante el método bioautográfico, permitió observar que la actividad fitotóxica se encontraba en las fracciones FVI<sub>A</sub>-6<sup>a</sup> y FVI<sub>A</sub>-7<sup>a</sup>. En el Cuadro 13 se

presentan los sistemas de elución utilizados y las fracciones combinadas.

El análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones activas FVI<sub>A</sub>-6<sup>a</sup> y FVI<sub>A</sub>-7<sup>a</sup> mostró que ambas estaban constituidas por dos compuestos mayoritarios. Estas fracciones activas fueron sometidas a sucesivas purificaciones por cromatografía preparativa en capa fina., utilizado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Después de cinco eluciones y de procesar las cromatoplasmas de manera habitual se obtuvieron 7.1 mg de rubrofusarina (107) [Galmarini *et al.*, 1974; Gorst-Allam *et al.*, 1980; Leeper y Staunton 1984] y 7.0 mg de la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108) a partir de la fracción secundaria FVI<sub>A</sub>-6<sup>a</sup>. De la misma forma, de la fracción FVI<sub>A</sub>-7<sup>a</sup> se obtuvieron 6.8 mg de ergosta-4,6,8 [14], 22-teraen-3-ona (113) con un p.f de 197-198 °C (Porter 1975; Seitz y Pausksfelis 1977) y 17.3 mg de metilparabeno (111) con un p.f de 131 °C (Buckingham 1982).

**Cuadro 13.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa FVI<sub>A</sub><sup>a</sup>.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-12	FVI <sub>A</sub> -1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	13-35	FVI <sub>A</sub> -2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	36-84	FVI <sub>A</sub> -3
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	86-91	FVI <sub>A</sub> -4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	92-178	FVI <sub>A</sub> -5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	179-194	FVI <sub>A</sub> -6 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	195-235	FVI <sub>A</sub> -7 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH.	95:5	236-249	FVI <sub>A</sub> -8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	250-265	FVI <sub>A</sub> -9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	266-280	FVI <sub>A</sub> -10
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	281-296	FVI <sub>A</sub> -11
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	297-325	FVI <sub>A</sub> -12

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FVI<sub>A</sub>1-FVI<sub>A</sub>-12 = cultivo con agitación.

## V. Parte Experimental.

### 5.2.1.1.4 Obtención de la emodina (110).

La fracción primaria FVII<sub>A</sub><sup>a</sup> (143.1 mg) se recromatografió en una columna abierta empacada con 20 g de gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 175 fracciones de 10 mL cada una, mismas que fueron analizadas por cromatografía en capa delgada con la finalidad de reunir las que presentaban homogeneidad cromatográfica. El procedimiento anterior permitió obtener 10 grupos de fracciones. La actividad fitotóxica se concentró en la fracción secundaria FVII<sub>A</sub>-7<sup>a</sup>. El Cuadro 14 resume este proceso cromatográfico.

De la fracción FVII<sub>A</sub>-7<sup>a</sup> precipitaron espontáneamente 9.5 mg de emodina (110), con un p. f. de 256-257 °C (Melvin *et al.*, 1988; Melvin y Giménez 1991).

**Cuadro 14.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FVII<sub>A</sub><sup>a</sup>.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-10	FVII <sub>A</sub> -1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	11-24	FVII <sub>A</sub> -2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	25-36	FVII <sub>A</sub> -3
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	37-49	FVII <sub>A</sub> -4
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	50-68	FVII <sub>A</sub> -5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	70-86	FVII <sub>A</sub> -6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	87-104	FVII <sub>A</sub> -7 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	105-135	FVII <sub>A</sub> -8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	136-150	FVII <sub>A</sub> -9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	151-175	FVII <sub>A</sub> -10

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FVII<sub>A</sub>1-FVII<sub>A</sub>-10 = cultivo con agitación.



#### 5.2.1.1.5 Obtención de la citrinina (114).

De la fracción primaria FVIII<sup>A</sup> (262.5 mg) precipitó un sólido cristalino de color café claro, el cual tras sucesivos lavados con una mezcla de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y de una recrystalización de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) generó 55.0 mg de citrinina (114), con un p. f. de 170-173 °C.

El análisis por cromatografía en capa delgada de las aguas madres de la fracción FVIII<sup>A</sup>, permitió detectar la presencia de un compuesto mayoritario. Este compuesto se purificó mediante cromatografía preparativa en capa fina utilizando una a elución múltiple (2 ×) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (97:3). Como resultado del procedimiento anterior se obtuvieron 8.8 mg de ácido-*p*-hidroxi benzoico (112), con un p.f de 138-139 °C (Mathieson y Whalley 1964; Sankawa *et al.*, 1983).

#### 5.2.2 Extracto del cultivo estático.

El extracto activo combinado del medio de fermentación y del micelio (2.5 g) del cultivo estático se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta sobre 50.0 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 450 fracciones de 30 mL cada una, mismas que por similitud cromatográfica en capa fina se reunieron en 12 grupos de fracciones primarias.

De acuerdo con los ensayos de bioautografía directa, los grupos de fracciones del FIV<sup>E</sup> al FVIII<sup>E</sup> presentaron actividad fitotóxica. En el Cuadro 15 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

## V. Parte Experimental.

**Cuadro 15.** Fraccionamiento primario del extracto obtenido a partir del cultivo estático.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-15	FI <sub>E</sub>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	16-40	FII <sub>E</sub>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	41-90	FIII <sub>E</sub>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	91-140	FIV <sub>E</sub> <sup>a</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	141-310	FV <sub>E</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	311-333	FVI <sub>E</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	334-346	FVII <sub>E</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	347-366	FVIII <sub>E</sub> <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	367-370	FIX <sub>E</sub>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	371-408	FX <sub>E</sub>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	409-436	FXI <sub>E</sub>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	437-450	FXII <sub>E</sub>

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FI<sub>E</sub>-FXII<sub>E</sub> = cultivo estático.

### 5.2.2.1 Separación y purificación de los metabolitos secundarios.

#### 5.2.2.1.1 Obtención de los compuestos (102)-(106).

De la fracción primaria activa FV<sub>E</sub><sup>a</sup> (95.7 mg) precipitó un sólido amorfo, de color amarillo; el análisis del mismo mediante cromatografía en capa fina reveló la presencia de una mezcla de compuestos, por lo que se procedió a separarlos utilizando una cromatografía en columna abierta de gel de sílice (10 g). Se recolectaron un total de 180 fracciones de 10 mL cada una. El análisis por cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones permitió reunir las diez grupos de fracciones secundarias (Cuadro 16), concentrándose la actividad fitotóxica en la fracción FV<sub>E</sub>-5<sup>a</sup>.

Cuadro 16. Fraccionamiento secundario de la fracción FV<sub>E</sub><sup>a</sup>.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-12	FV <sub>E</sub> -1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	13-25	FV <sub>E</sub> -2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	26-54	FV <sub>E</sub> -3
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	55-68	FV <sub>E</sub> -4
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	69-88	FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	89-102	FV <sub>E</sub> -6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	102-135	FV <sub>E</sub> -7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	136-145	FV <sub>E</sub> -8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	146-158	FV <sub>E</sub> -9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	156-180	FV <sub>E</sub> -10

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FV<sub>E</sub>-1-FV<sub>E</sub>-10 = cultivo estático.

El análisis por cromatografía en capa delgada de la fracción activa FV<sub>E</sub>-5<sup>a</sup> mostró la presencia de seis compuestos mayoritarios, mismos que se separaron y purificaron mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa fina, empleando una elución múltiple (5 x) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 100% como sistema de elución. Después de procesar las placas de la manera habitual se obtuvieron 9.8 mg del compuesto 101, 5.1 mg del compuesto 102, 4.1 mg del compuesto 103, 3.2 mg del compuesto 104, 5.2 mg del compuesto 105, y 4.6 mg de compuesto 106.

#### 5.2.2.1.2 Obtención de los compuestos (107), (108), (111), y (113).

La fracción primaria FV<sub>I</sub><sup>a</sup> (105.4 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario, empleando de nueva cuenta una cromatografía en columna abierta

## V. Parte Experimental.

empacada con 15 g de gel de sílice. Se obtuvieron 165 fracciones de 10 mL. El análisis cromatográfico en capa delgada de las mismas condujo a su agrupamiento en ocho fracciones secundarias (Cuadro 17). De acuerdo con los ensayos de bioautografía realizados, la fracción secundaria FV<sub>E</sub>-6<sup>a</sup> contenía los principios fitotóxicos.

A partir, de la fracción activa FV<sub>E</sub>-6<sup>a</sup> se obtuvieron los compuestos 107 (3.8 mg), 108 (3.5 mg), 111 (4.0 mg) y 113 (13.5 mg). Estos compuestos se aislaron y purificaron mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa fina, empleando las condiciones cromatográficas descritas en el inciso anterior.

Cuadro 17. Fraccionamiento secundario de la fracción FV<sub>I</sub><sub>E</sub><sup>a</sup>.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-10	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	11-26	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	27-35	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	36-45	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	46-79	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	80-112	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -6 <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	113-145	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	146-165	FV <sub>I</sub> <sub>E</sub> -8

<sup>a</sup>Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>FV<sub>I</sub><sub>E</sub>-1-FV<sub>I</sub><sub>E</sub>-8 = cultivo estático.

#### 5.2.2.1.3 *Obtención del compuesto (109).*

El análisis cromatográfico de la fracción secundaria FV<sub>E</sub>-4<sup>a</sup> permitió detectar la presencia de un compuesto mayoritario, el cual se separó mediante la aplicación de la técnica cromatográfica en capa fina en la modalidad preparativa. Como sistema de elución se utilizó diclorometano. Después de procesar las placas de la manera convencional se obtuvieron 5.2 mg de la 8-hidroxi-6metil-1-metoxicarbonil-xantona (109) como un sólido cristalino de color anaranjado claro, con un p.f de 197-198 °C.

#### 5.2.2.1.4 *Obtención de la emodina (110).*

De la fracción primaria FVII<sub>E</sub><sup>a</sup> cristalizó espontáneamente un sólido de color anaranjado, el cual fue purificado por sucesivas recrystalizaciones de cloroformo para generar 5.2 mg de emodina (110).

#### 5.2.2.1.5 *Obtención de los compuestos (114) y (112).*

Por último, de la fracción primaria FVIII<sub>E</sub><sup>a</sup> (77.6 mg) precipitó un sólido cristalino. El análisis cromatográfico en capa fina indicó que era una mezcla de dos compuestos. Con la finalidad de separar estos compuestos se realizó una cromatografía preparativa en capa delgada. Como eluyente se utilizó una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH 97:3, eluyendo las placas dos veces. A partir de esta cromatografía se obtuvieron 15.2 mg de la citrinina (114) y 5.3 mg del ácido *p*-hidroxi-benzoico (112).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La presente investigación se desarrolló utilizando las estrategias convencionales para el descubrimiento de fitotoxinas fúngicas (Charudattan, 1990; Hoagland, 1990; Duke, 1995; Cramer, 2000; Evidente *et al.*, 2001) y los resultados se dividen en cuatro partes. La primera abarca todos los aspectos relacionados con el proceso de selección primaria del hongo *Guanomyces polythrix* como una fuente potencial de compuestos biodinámicos. La segunda comprende la determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento del hongo en estudio y la evaluación del potencial fitotóxico de los extractos del micelio y del medio de cultivo. La tercera parte se refiere al aislamiento y la caracterización de los principios fitotóxicos. Por último, la cuarta parte se enfoca a la evaluación biológica de los metabolitos aislados mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de dos arvenses. Asimismo se discuten los efectos de las fitotoxinas sobre la proteína reguladora CaM.

### 1. SELECCIÓN PRIMARIA DE *GUANOMYCES POLYTHRIX*.

La selección primaria del hongo se realizó fundamentalmente con base en la consideración de que la especie es nueva, y los organismos novedosos ofrecen generalmente muy buenas perspectivas para el descubrimiento de productos biodinámicos también novedosos.

## VI. Resultados y Discusión.

En segundo lugar, al realizar pruebas de antagonismo fúngico se encontró que esta especie inhibe el crecimiento de una serie de organismos fitopatógenos. Cabe resaltar que este tipo de pruebas que reflejan interacciones microorganismo-microorganismo han constituido un punto de partida importante para la selección de especies fúngicas idóneas para el aislamiento de metabolitos bioactivos, incluyendo aquellos con propiedades fitotóxicas (Gloer, 1995).

Los hongos utilizados en las pruebas de competencia directa fueron: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium* sp., *Phoma* sp. y *Stachybotrys chartarum*. En el Cuadro 18 se presentan las características de los microorganismos utilizados en las pruebas de antagonismo.

**Cuadro 18.** Hongos fitopatógenos utilizados en los bioensayos de antagonismo directo.

ESPECIE	CARACTERÍSTICAS
<i>Alternaria alternata</i>	Causa el marchitamiento y el tizón en cultivos de papa, jitomate, frijol, zanahoria y tabaco.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Causa el marchitamiento y la pudrición de cultivos de jitomate, plátano, maíz, frijol, cebolla, calabaza, espárrago y cacahuete.
<i>Helminthosporium</i> sp	Produce tizones y manchas foliares en cultivos de maíz, arroz, trigo, cebada, avena, caña, manzana y pera.
<i>Phoma</i> sp.	Produce la pudrición y el tizón en cultivos de apio, remolacha, jitomate y pimiento.
<i>Stachybotrys chartarum</i> .	Causa la pudrición de cultivos de trigo, garbanzo, haba, lenteja y en forrajes.

Esta determinación permitió observar claramente que en todos los casos el hongo coprófilo de prueba inhibía el desarrollo de los hongos fitopatógenos utilizados. Estos efectos se determinaron cualitativamente mediante la comparación del crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles de crecimiento que se desarrollaron paralelamente. En el Cuadro 19 se resumen las observaciones referentes a este bioensayo.

**Cuadro 19.** Ensayos de competencia directa entre el hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* y cinco especies diferentes de hongos fitopatógenos.

ESPECIE	INHIBIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL
<i>Alternaria alternata</i>	xxx
<i>Fusarium oxysporum</i>	xx
<i>Helmintosporium</i> sp.	xxx
<i>Phoma</i> sp.	xxxxx
<i>Stachybotrys chartarum</i>	xxx
Control de crecimiento	---

xEfecto escaso    xxEfecto moderado    xxxEfecto considerable    xxxxEfecto intenso    --- Sin efecto

**2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO.**

A continuación se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento del hongo mediante la realización de fermentaciones en pequeña escala, verificando el desarrollo del microorganismo en diferentes medios de cultivo, distintas condiciones de incubación (estática *vs* agitación) y diferentes tiempos de fermentación (15 y 30 días) a 28 °C. Posteriormente, se evaluó cuantitativamente el posible efecto fitotóxico de los extractos (medio de cultivo y micelio) de la especie en estudio mediante la determinación del efecto sobre la germinación y el



## VI. Resultados y Discusión.

crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* mediante el método de la caja de Petri.

Los medios de crecimiento seleccionados (Cuadro 10, sección experimental) para la optimización de las condiciones de cultivo son los más utilizados para realizar las fermentaciones de organismos fúngicos (Wang *et al.*, 1995; Gloer, 1995; Whyte *et al.*, 1996 *inter alia*). De cada una de las distintas fermentaciones se registró la producción de biomasa y se prepararon los extractos orgánicos a partir del micelio y del medio de cultivo, utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente de extracción. En el Cuadro 20 se resumen los resultados obtenidos, observándose diferencias considerables, tanto en la biomasa generada como en los rendimientos de extracto en función del medio de cultivo empleado.

**Cuadro 20.** Comparación de los rendimientos obtenidos en cada uno de los medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	PERÍODO DE INCUBACIÓN (días)	BIOMASA (g)	EXTO. MICELIO (mg/L)	EXTO. MEDIO DE CULTIVO (mg/L )
Papa y dextrosa	15	4.82	237.17	39.87
	30	5.64	539.50	58.15
Sabouraud	15	4.16	29.37	88.73
	30	5.98	281.39	106.18
Malta 0.4%	15	1.43	63.50	45.78
	30	1.63	110.36	48.00
Malta 4%	15	4.72	210.22	53.17
	30	6.48	326.20	68.54
Ocho verduras	15	1.41	51.14	42.16
	30	1.72	73.58	64.69
Czapek Dox	15	0.0	0.0	0.0
	30	0.0	0.0	0.0

En general, la cantidad de micelio y el rendimiento de los extractos son mayores cuando el microorganismo se incubó por un período de treinta días. Sin embargo, cuando se utilizó el medio Czapek Dox no se obtuvo crecimiento de *G. polythrix*. Los rendimientos de los extractos obtenidos para el medio de cultivo son menores a los del micelio, lo cual es un indicio de que la mayor parte de los metabolitos secundarios producidos por el microorganismo no son liberados al medio de cultivo. Los extractos obtenidos al utilizar como medio de cultivo papa-dextrosa fueron los más abundantes, además de ser el medio que se extrae en menor cantidad con el disolvente utilizado. A continuación, cada uno de los extractos obtenidos se analizó por cromatografía en capa fina, observándose similitud en la composición entre los extractos del medio de cultivo y del micelio, por lo que se decidió combinarlos, obteniéndose dos extractos por fermentación, es decir uno por cada período de incubación.

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos resultantes se llevó a cabo mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, utilizando el método en caja de Petri. En el cuadro 21 se presentan los valores de  $CI_{50}$  expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada uno de los extractos evaluados. Los resultados obtenidos indican claramente que los extractos derivados de la fermentación del microorganismo por treinta días son los más fitotóxicos, siendo aún más evidente el potencial herbicida para los extractos generados de la fermentación en papa-dextrosa. De manera adicional, se puede observar que en general los extractos orgánicos muestran un mayor efecto fitotóxico sobre el crecimiento radicular de las dos semillas de prueba en comparación con el efecto provocado sobre la germinación.

Con respecto al proceso de germinación ninguno de los extractos evaluados demostró un efecto fitotóxico significativo para las semillas de *E. crusgalli*, sin embargo, para las semillas de *A. hypochondriacus* se observa que los extractos obtenidos al utilizar como medio de cultivo papa-dextrosa, Saboraud, malta al 4%

## VI. Resultados y Discusión.

y ocho verduras, incubando el hongo por treinta días, inhibieron de manera moderada el proceso de germinación.

**Cuadro 21.** Comparación del efecto fitotóxico de cada uno de los extractos obtenidos.

MEDIO DE CULTIVO	PERÍODO DE INCUBACIÓN (días)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
		CRECIMIENTO RADICULAR CI <sub>50</sub> (µg/mL)	GERMINACIÓN CI <sub>50</sub> (µg/mL)	CRECIMIENTO RADICULAR CI <sub>50</sub> (µg/mL)	GERMINACIÓN CI <sub>50</sub> (µg/mL)
Papa y dextrosa	15	430.94	707.95	845.25	>1000
	30	25.14	165.98	254.26	>1000
Sabouraud	15	489.85	>1000	>1000	>1000
	30	109.64	213.87	849.52	>1000
Malta 0.4%	15	933.25	>1000	>1000	>1000
	30	251.28	777.57	>1000	>1000
Malta 4%	15	503.74	>1000	977.24	>1000
	30	316.36	344.55	458.28	>1000
Ocho verduras	15	504.87	>1000	>1000	>1000
	30	69.28	198.5	512.85	>1000
Czapek Dox	15	---	---	---	---
	30	---	---	---	---

Posteriormente, el hongo se cultivó en pequeña escala en condiciones de agitación utilizando como medio de cultivo papa-dextrosa y se incubó por un período de quince y treinta días a 28 °C con una agitación de 200 rpm. De nueva cuenta, los extractos orgánicos del medio de fermentación y del micelio se prepararon utilizando diclorometano como disolvente.

En el Cuadro 22 se observa que los rendimientos obtenidos de los cultivos en agitación son mayores a los obtenidos para los cultivos estáticos incubados durante los mismos periodos de tiempo (quince y treinta días). Por otra parte, se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los rendimientos

obtenidos al incubar el microorganismo coprófilo en condiciones de agitación por un período de quince o treinta días.

**Cuadro 22.** Comparación de los rendimientos obtenidos para los cultivos estáticos y con agitación.

CONDICIÓN DE CULTIVO	PERÍODO DE INCUBACIÓN (días)	BIOMASA (g)	EXTO. MICELIO (mg/L)	EXTO. MEDIO DE CULTIVO (mg/L)
Estático	15	4.82	273.17	39.87
Estático	30	5.64	539.50	58.15
Agitación	15	6.63	624.28	15.11
Agitación	30	7.05	659.49	15.36

A continuación, se procedió a determinar el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos mediante el método de la caja de Petri. En el cuadro 23 se presentan los valores comparativos de la  $CI_{50}$  expresados en  $\mu\text{g/mL}$  para los extractos de los cultivos en papa-dextrosa estáticos y con agitación. Estos resultados permitieron determinar que el hongo condiciones de agitación es capaz de producir una mayor biomasa y un mejor rendimiento de los extractos fitotóxicos en un período menor de incubación. Además, el efecto fitotóxico de los extractos es similar al obtenido para el extracto del cultivo estático con un período de incubación de 30 días.

## VI. Resultados y Discusión.

### 3. AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS BIODINÁMICOS.

#### 3.1 Cultivo con agitación.

El cultivo en mediana escala con agitación se realizó utilizando como medio de crecimiento papa-dextrosa; una agitación a 200 rpm, un período de incubación de quince días y una temperatura de incubación de 28 °C (Cuadro 24).

**Cuadro 23.** Comparación del efecto fitotóxico de los extractos obtenidos con agitación y estáticamente.

CONDICIÓN DE CULTIVO	PERÍODO DE INCUBACIÓN (días)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
		CRECIMIENTO RADICULAR CI <sub>50</sub> (µg/mL)	GERMINACIÓN CI <sub>50</sub> (µg/mL)	CRECIMIENTO RADICULAR CI <sub>50</sub> (µg/mL)	GERMINACIÓN CI <sub>50</sub> (µg/mL)
Estático	15	430.98	707.95	845.25	>1000
Estático	30	25.14	165.98	254.26	>1000
Agitación	15	30.58	176.23	271.02	>1000
Agitación	30	28.69	170.23	251.50	>1000

**Cuadro 24.** Condiciones óptimas de crecimiento de *Guanomyces polythrix*.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO	
Medio de cultivo	Papa y dextrosa
Temperatura de incubación	28 °C
Período de incubación	15 días
Condiciones de cultivo	Agitación a 200 rpm

Para verificar la reproducibilidad del cultivo en mediana escala con agitación con respecto a los cultivos en pequeña escala, se monitoreó el desarrollo del cultivo analizando su perfil cromatográfico y su potencial fitotóxico durante todo el proceso de fermentación. El desarrollo del cultivo se verificó a los 6, 9 y 12 días de la fermentación. En el Cuadro 25 se observan los rendimientos obtenidos y como era de esperarse los mejores rendimientos (biomasa y extracto) se obtienen a los 12 días.

**Cuadro 25.** Desarrollo del cultivo en mediana escala con agitación.

PERÍODO DE INCUBACIÓN (Días)	BIOMASA (g)	EXTRACTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL MICELIO (mg)
6	3.74	57.90
9	4.28	72.96
12	5.43	87.32

De igual forma se corroboró el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos, utilizando el método en caja de Petri. En el Cuadro 26 se presentan las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$   $\mu\text{g/mL}$ ), las cuales indican claramente que el potencial fitotóxico también incrementó conforme aumentó el periodo de incubación, observándose la mayor actividad en los extractos obtenidos a los 12 días de incubación.

Una vez transcurridos 15 días de fermentación se procedió a la preparación de los extractos orgánicos totales del medio de cultivo y del micelio, utilizando diclorometano como disolvente de extracción. En el Cuadro 27 se indican los rendimientos obtenidos.

Los resultados de la confirmación de la actividad biológica de los extractos

## VI. Resultados y Discusión.

orgánicos totales obtenidos a partir del cultivo en mediana escala con agitación se indican en el Cuadro 26.

**Cuadro 26.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y del micelio generados del cultivo con agitación.

EXTRACTO	PERIODO DE INCUBACIÓN (días)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa cusgalli</i>	
		CRECIMIENTO RADICULAR $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	GERMINACIÓN $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CRECIMIENTO RADICULAR $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	GERMINACIÓN $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Medio de cultivo y Micelio	6	39.17	207.33	>1000	>1000
Medio de cultivo y Micelio	9	22.08	179.76	463.08	>1000
Medio de cultivo y Micelio	12	5.08	142.51	206.19	769.92
Micelio	15	54.33	176.04	384.32	825.71
Medio de cultivo y Micelio	15	60.19	175.20	400.90	860.44

**Cuadro 27.** Rendimientos del cultivo con agitación.

CULTIVO EN MEDIANA ESCALA CON AGITACIÓN	
Biomasa	104.14 g
Extracto del micelio	7.10 g
Extracto del medio de cultivo	479.80 mg

El análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio permitió observar que ambos extractos eran similares por lo que se decidió reunirlos, obteniéndose 7.5 g de un extracto de color café verdoso.

### 3.2 Cultivo estático.

De manera simultánea al establecimiento del cultivo en mediana escala con agitación, se realizó un cultivo estático en mediana escala (10 L). Esta última fermentación se realizó con la finalidad de aislar los componentes minoritarios diferentes que se detectaron en el cultivo estático en pequeña escala.

El cultivo estático se realizó en papa-dextrosa durante 30 días y a una temperatura de 28 °C. En el Cuadro 28 se presentan los rendimientos de los extractos orgánicos resultantes utilizando también diclorometano como disolvente de extracción.

**Cuadro 28.** Rendimientos del cultivo estático.

CULTIVO ESTÁTICO EN MEDIANA ESCALA	
Biomasa	10.65 g
Extracto del micelio	2.10 g
Extracto del medio de cultivo	450 mg

En el Cuadro 29 se resumen los resultados derivados de la determinación del potencial fitotóxico. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para el cultivo correspondiente en pequeña escala.

El perfil cromatográfico de los extractos orgánicos del medio de fermentación y del micelio fue similar, por lo que se decidió combinarlos obteniéndose 2.5 g de un extracto combinado de color café verdoso.



Cuadro 29. Efecto fitotóxico de los extractos del cultivo estático.

EXTRACTO	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
	CRECIMIENTO RADICULAR Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	GERMINACIÓN Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	CRECIMIENTO RADICULAR Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	GERMINACIÓN Cl <sub>50</sub> (µg/ml)
Medio de cultivo y Micelio	39.17	207.33	>1000	>1000
Micelio	54.33	176.04	384.32	825.71

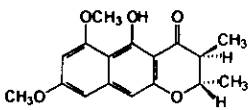
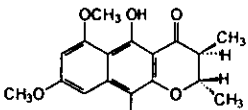
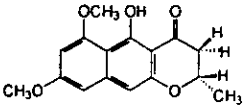
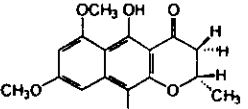
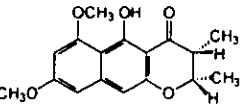
#### 4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO.

Una vez que se demostró el efecto fitotóxico de los extractos, se procedió al aislamiento de los metabolitos secundarios biodinámicos a partir de los extractos derivados de los diferentes cultivos en mediana escala utilizando un procedimiento biodirigido. Como ensayo de monitoreo de la actividad fitotóxica se utilizó el método bioautográfico descrito por Inoue (Inoue *et al.*, 1992).

El fraccionamiento biodirigido de los extractos activos utilizando diversos procedimientos cromatográficos permitió el aislamiento y purificación de 14 metabolitos secundarios, incluyendo siete derivados novedosos de la naftopirona: la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (101), la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (102), la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (103), la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (104), la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (105), la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (106) y la 5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-naftopirona (108), una xantona la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109), y seis compuestos conocidos: la rubrofusarina B (107), la emodina (110), el metilparaben (111), el ácido-*P*-hidroxibenzoico (112), el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (113), y la citrinina (114). En el Cuadro 30 se ilustran las

estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento, las condiciones de cultivo utilizadas para su obtención y las fracciones cromatográficas de donde se aislaron.

**Cuadro 30.** Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo *Guanomyces polythrix*.

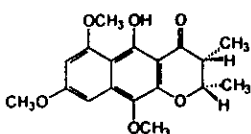
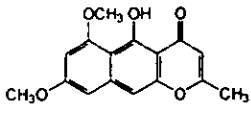
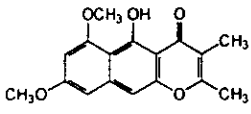
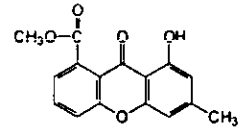
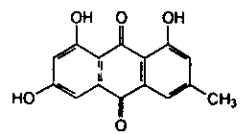
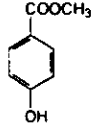
METABOLITO SECUNDARIO	RENDIMIENTO*	FRACCIONES <sup>b</sup>
 <p>(101)</p>	1.05 mg/L	FIV <sub>A</sub> <sup>a</sup> FV <sub>A</sub> -5 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>
 <p>(102)</p>	0.49 mg/L	FIV <sub>A</sub> <sup>a</sup> FV <sub>A</sub> -5 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>
 <p>(103)</p>	0.33 mg/L	FV <sub>A</sub> -5 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>
 <p>(104)</p>	0.21 mg/L	FV <sub>A</sub> -5 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>
 <p>(105)</p>	0.20 mg/L	FV <sub>A</sub> -5 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>

\*Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>F<sub>A</sub> = cultivo con agitación; F<sub>E</sub> = cultivo estático.

VI. Resultados y Discusión.

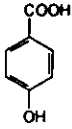
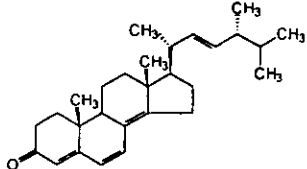
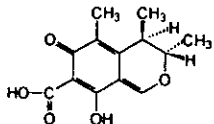
Cuadro 30. Metabolitos secundarios aislados de *Guanomyces polythrix* (continuación).

METABOLITO SECUNDARIO	RENDIMIENTO*	FRACCIONES <sup>b</sup>
 <p>(106)</p>	0.17 mg/L	FV <sub>A</sub> -6 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -5 <sup>a</sup>
 <p>(107)</p>	0.30 mg/L	FVI <sub>A</sub> -6 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -6 <sup>a</sup>
 <p>(108)</p>	0.26 mg/L	FVI <sub>A</sub> -6 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -6 <sup>a</sup>
 <p>(109)</p>	0.19 mg/L	FV <sub>A</sub> -6 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -4 <sup>a</sup>
 <p>(110)</p>	0.37 mg/L	FV <sub>A</sub> -7 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -4 <sup>a</sup>
 <p>(111)</p>	0.53 mg/L	FV <sub>A</sub> -7 <sup>a</sup> FIV <sub>A</sub> <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -6 <sup>a</sup>

\*Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>F<sub>A</sub> = cultivo con agitación; F<sub>E</sub> = cultivo estático.

Cuadro 30. Metabolitos secundarios aislados de *Guanomyces polythrix* (continuación).

METABOLITO SECUNDARIO	RENDIMIENTO*	FRACCIONES <sup>b</sup>
 (112)	0.35 mg/L	FVII <sub>A</sub> <sup>a</sup> FIV <sub>A</sub> <sup>a</sup> FVIII <sub>E</sub> <sup>a</sup>
 (113)	0.51 mg/L	FVI <sub>A</sub> -7 <sup>a</sup> FV <sub>E</sub> -6 <sup>a</sup>
 (114)	1.76 mg/L	FVIII <sub>A</sub> -7 <sup>a</sup> FVIII <sub>E</sub> <sup>a</sup>

\*Fracciones fitotóxicas.

<sup>b</sup>F<sub>A</sub> = cultivo con agitación; F<sub>E</sub> = cultivo estático.

### 5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ACTIVOS.

La caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quiroópticos convencionales. En dos de los artículos derivados de la presente investigación, y que se anexan en el Apéndice II, se discute en detalle la elucidación estructural de los compuestos aislados. Por lo tanto, a continuación tan sólo se presentan los aspectos más relevantes de la determinación de las estructuras de los metabolitos novedosos.

## VI. Resultados y Discusión.

### 5.1 Caracterización de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [101] y de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [105].

Las 2,3-dihidronaftopironas novedosas, 101 y 105, se obtuvieron como sólidos cristalinos de color amarillo intenso solubles en diclorometano. En los Cuadros 31-36 se incluyen sus constantes físicas y espectroscópicas.

Los espectros en el infrarrojo (IR) de estos compuestos presentan bandas de absorción asociadas con su carácter aromático ( $\nu_{\max}$ .  $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ ) y con la presencia de grupos hidroxilo ( $\nu_{\max}$ .  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ ) y carbonilo de  $\gamma$ -pirona ( $\nu_{\max}$ .  $\sim 1638\text{ cm}^{-1}$ ) [Cuadro 32]. La fórmula molecular de los dos productos se estableció como  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$  mediante espectrometría de masas de alta resolución. Esta fórmula permite calcular un índice de insaturación de nueve.

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ) y bidimensionales (HMQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que los dos productos naturales contienen un núcleo de dihidronaftopirona (Gunatilaka, *et al.*, 1984; Messana, *et al.*, 1991; Khan, *et al.*, 1996). A continuación se discute en detalle las características principales de los espectros:

a) Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectros 2 y 10; Apéndice I) presentan señales para 17 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas (Cuadro 32).

b) En la región aromática de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (Espectros 1 y 9 Apéndice I) se observan dos protones aromáticos *meta* acoplados en  $\delta_{\text{H}} \sim 6.25$  ( $J = 2.5\text{ Hz}$ ) y  $\sim 6.50$  ( $J = 2.5\text{ Hz}$ ) y un protón aromático aislado en  $\delta_{\text{H}} \sim 6.50$ . Estas tres señales presentan correlación en los espectros HMQC con tres metinos de carácter aromático en  $\delta_{\text{C}} \sim 96.0$ ,  $\sim 98.0$  y  $\sim 101.0$ , respectivamente.

c) En  $\delta_{\text{H}} \sim 14.30$  muestran una señal simple debido a la presencia de un grupo hidroxilo quelatado. Esta observación permitió proponer a priori que este grupo debía encontrarse en C-5.

d) A campo alto, los espectros de RMN- $^1\text{H}$  presentan dos dobles centrados en  $\delta_{\text{H}} \sim 1.20$  y  $\sim 1.50$ , asignables a dos grupos metilo de carácter alifático los cuales correlacionan con las señales en  $\sim \delta_{\text{C}} 10.4$  y  $\sim 19.8$  en los espectros de correlación heteronuclear HMQC. También se observan dos señales dobles de cuádruples centrados en  $\delta_{\text{H}} \sim 2.65$  y  $\sim 4.20$  que integran cada uno para un hidrógeno, asignables a los metinos C-2 y C-3 del núcleo base y que se encuentran geminales a los grupos metilo evidenciados anteriormente (Cuadro 33). Cada una de estas señales presenta una correlación en los espectros HMQC con los carbonos alifáticos en  $\delta_{\text{C}} \sim 46.4$  y  $\sim 78.0$ , respectivamente.

e) En  $\delta_{\text{H}} \sim 3.88$  y  $\sim 3.96$  se observan dos singuletes atribuibles a dos grupos metoxilo; cada uno de ellos presenta una correlación con los carbonos en  $\delta_{\text{C}} \sim 55.30$  y  $\sim 56.00$ , respectivamente en el espectro HMQC (Cuadro 33).

f) Finalmente, los carbonos restantes observados en los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  se asignaron con base en el análisis del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en su modalidad DEPT a un grupo carbonilo ( $\delta_{\text{C}} \sim 200.1$ ) y siete carbonos cuaternarios en  $\delta_{\text{C}} \sim 103.0$ ,  $\sim 107.2$ ,  $\sim 143.3$ ,  $\sim 156.0$ ,  $\sim 161.2$ ,  $\sim 162.4$  y  $\sim 165.1$ . De acuerdo con los desplazamientos químicos observados, cuatro de estos carbonos se encuentran unidos a funciones oxigenadas (Cuadro 34).

El análisis de las constantes de acoplamiento de los hidrógenos asignados a las posiciones C-2 y C-3 permitió establecer que en el compuesto **101** éstos presentan una relación *trans*-diaxial [H-2 ( $J_1 = 6.5$  Hz;  $J_2 = 10.5$  Hz) y H-3 ( $J_1 = 7.0$  Hz;  $J_2 = 10.5$  Hz)]. En cambio, en el metabolito **105**, estos hidrógenos tienen una disposición *cis* [H-2 ( $J_1 = 6.5$  Hz;  $J_2 = 3.5$  Hz) y H-3 ( $J_1 = 7.5$  Hz;  $J_2 = 3.5$  Hz)]. En la Figura 10 se presentan los desplazamientos químicos y la multiplicidad observada para los hidrógenos de las posiciones H-2 y H-3 de los productos naturales **101** y **105**.

El análisis detallado de los espectros de correlación homonuclear (COSY y NOESY) y heteronuclear (HMBC) permitió determinar la ubicación de los grupos

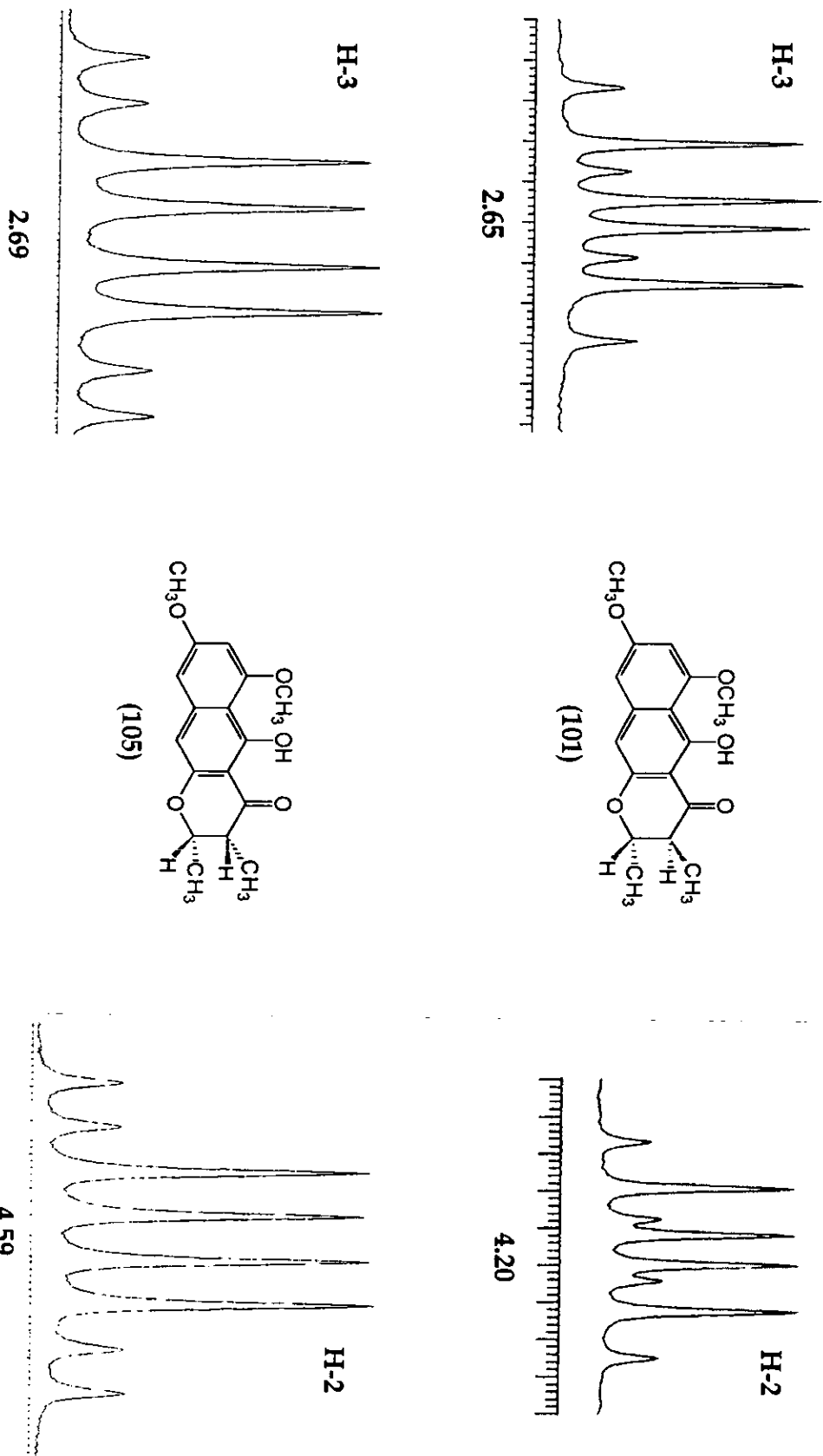
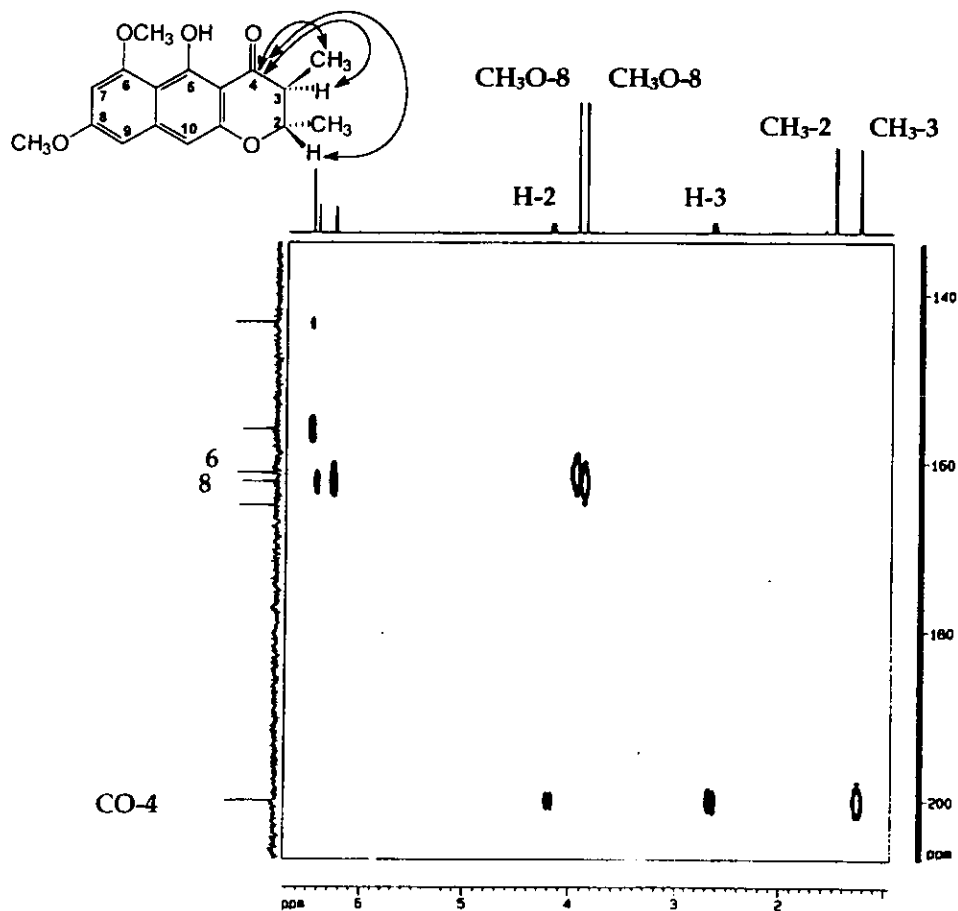


Figura 10 . Desplazamientos químicos y multiplicidad comparativa de los protones H-2 y H-3 de las dihidronafopironas 101 y 105.

funcionales en el núcleo de naftopirona. Las conclusiones más importantes se resumen a continuación (Cuadros 35 y 36).

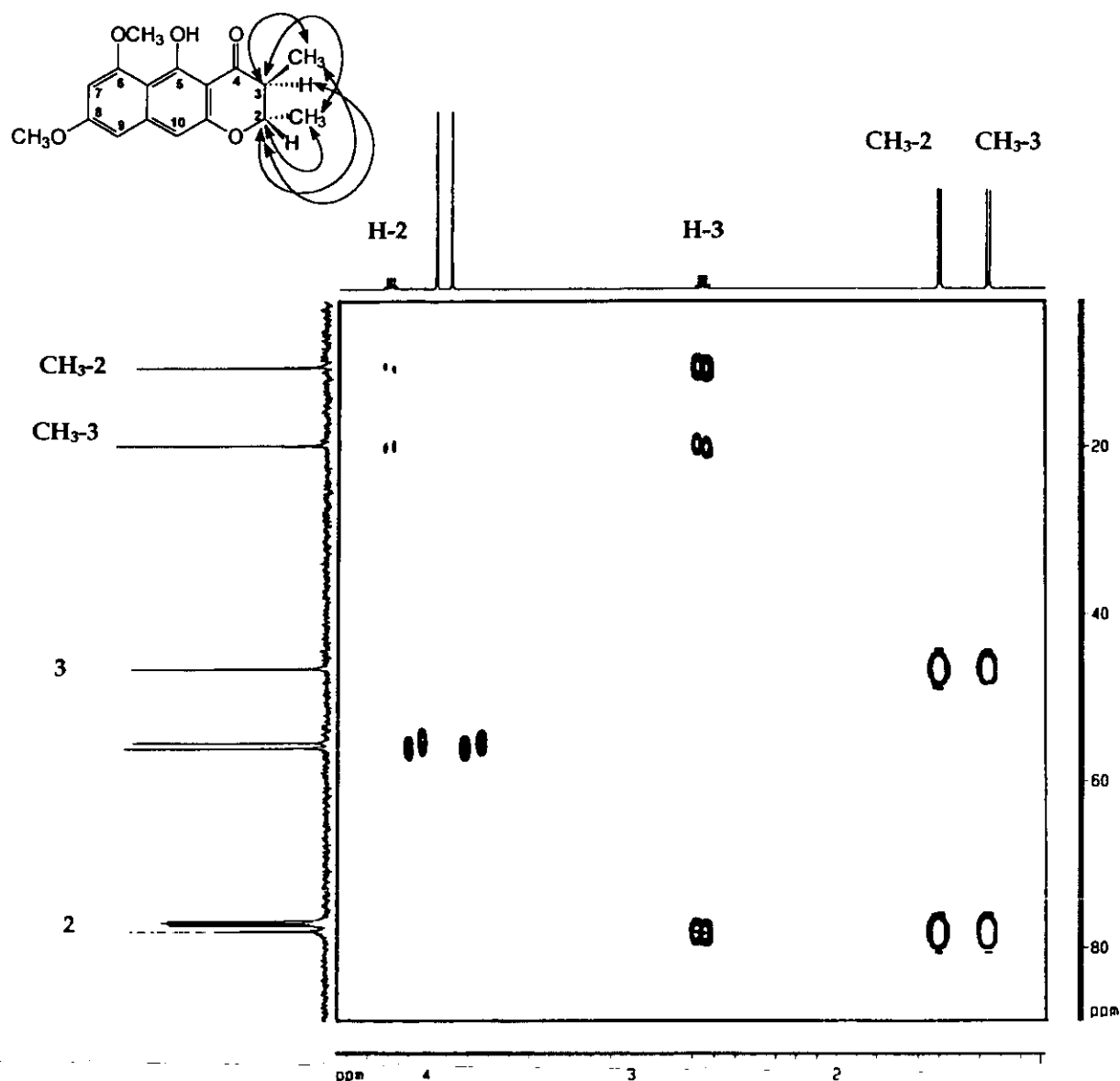
a) En los espectros HMBC de los compuestos **101** y **105** el carbono del carbonilo en  $\delta_C \sim 200.4$  correlaciona con los protones del metilo en C-3 ( $\delta_H$  1.24), así como con los hidrógenos H-2 ( $\delta_H \sim 4.40$ ) y H-3 ( $\delta_H \sim 2.66$ ) [Figura 11; Compuesto **101**]. Así mismo las señales asignadas a los metinos en  $\delta_C \sim 76.0$  (C-2) y  $\sim 45.5$  (C-3) correlacionan con metilos CH<sub>3</sub>-2 ( $\delta_H \sim 1.45$ ) y CH<sub>3</sub>-3 ( $\delta_H \sim 1.24$ ). De manera adicional, el metino en  $\delta_C \sim 76.0$  (C-2) correlaciona con el múltiplete en  $\delta_H \sim 2.66$  (H-3) [Figura 12; Compuesto **101**]. El grupo de correlaciones recién descritas permite ubicar a los metilos en las posiciones C-2 ( $\delta_H \sim 1.50$ ) y C-3 ( $\delta_H \sim 1.20$ ).



**Figura 11.** Correlaciones de C-4 con H-2, H-3 y CH<sub>3</sub>-3 en el espectro de HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidro-naftopirona [101].



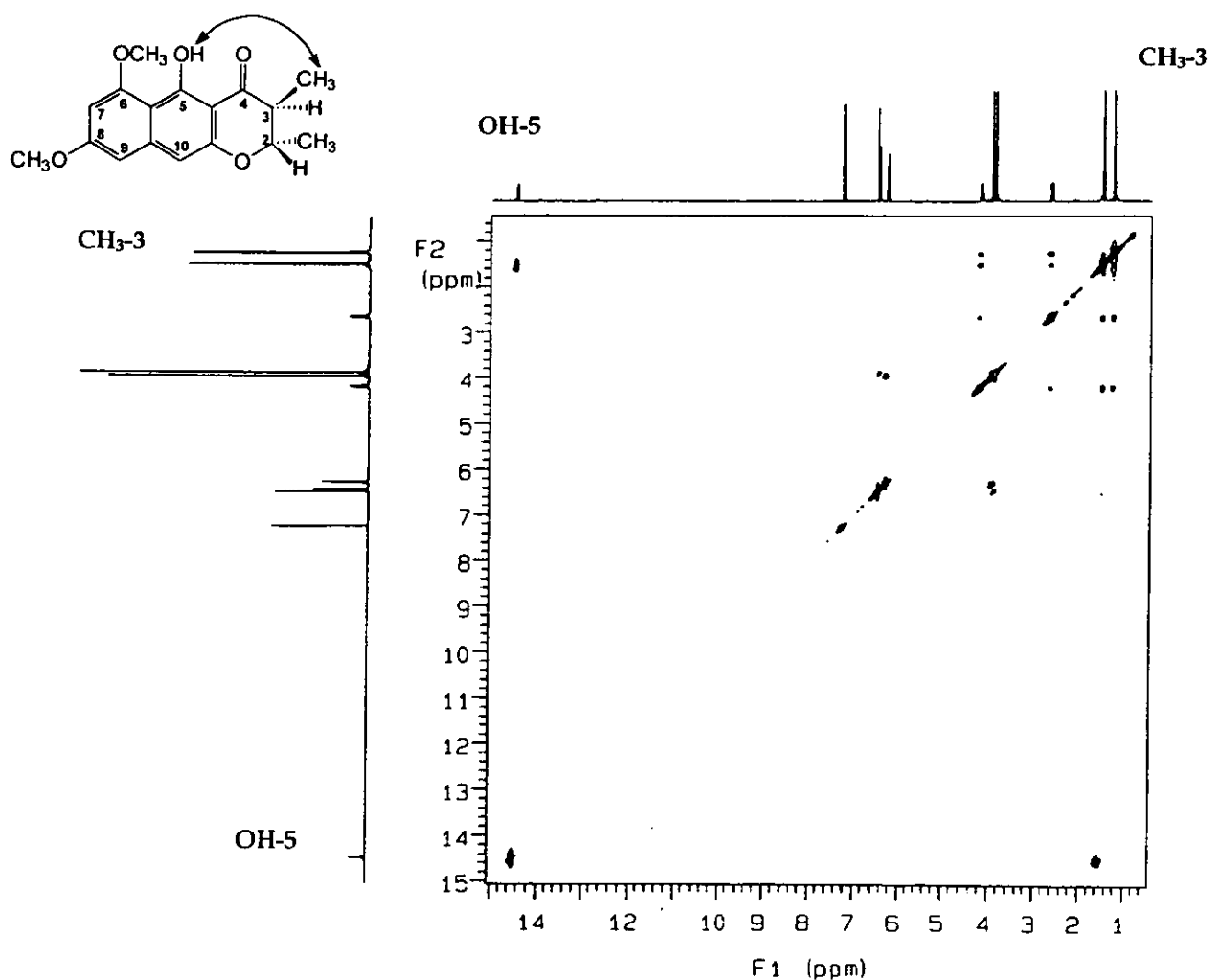
## VI. Resultados y Discusión.



**Figura 12.** Correlaciones de C-2/H-3, CH<sub>3</sub>-2, CH<sub>3</sub>-3 y C-3/CH<sub>3</sub>-3, CH<sub>3</sub>-2 en el espectro de HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [101].

Las correlaciones observadas en los espectros NOESY para H-2 y H-3 (H-2/CH<sub>3</sub>-3 y para H-3/ CH<sub>3</sub>-2) permiten corroborar esta propuesta (Cuadro 35).

b) Los espectros HMBC (Cuadro 36) de los productos naturales **101** y **105** muestran que los carbonos en  $\delta_C \sim 107.20$  (C-4a),  $\sim 103.00$  (C-5a) y  $\sim 165.5$  (C-5) correlacionan con el hidrógeno en  $\delta_H \sim 14.45$ , asignado a un grupo hidroxilo en C-5. De manera adicional, en los espectros NOESY (Figura 13; Compuesto **101**) se observa una clara interacción entre el hidroxilo ( $\delta_H \sim 14.45$ ) y el grupo metilo en C-3 ( $\delta_H \sim 1.26$ ). Estas correlaciones proporcionan una evidencia adicional para la ubicación del grupo hidroxilo en C-5.



**Figura 13.** Correlación homonuclear de los protones CH<sub>3</sub>-3 y OH-5 en el espectro NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [**101**].

## VI. Resultados y Discusión.

c) Los carbonos cuaternarios en  $\delta_C \sim 98.3$  (C-9),  $\sim 103.3$  (C-4a), y  $\sim 107.5$  (C-5a), muestran una correlación a larga distancia con el hidrógeno aromático en  $\delta_H \sim 6.50$  (H-10) [Figura 14; Compuesto 101]. Estas correlaciones, así como la observada en el espectro NOESY entre H-9/H-10, entre H-7/CH<sub>3</sub>O-6 y H-9/CH<sub>3</sub>O-8 (Figura 13; Compuesto 101) permiten ubicar a los grupos metoxilo en C-6 y C-8.

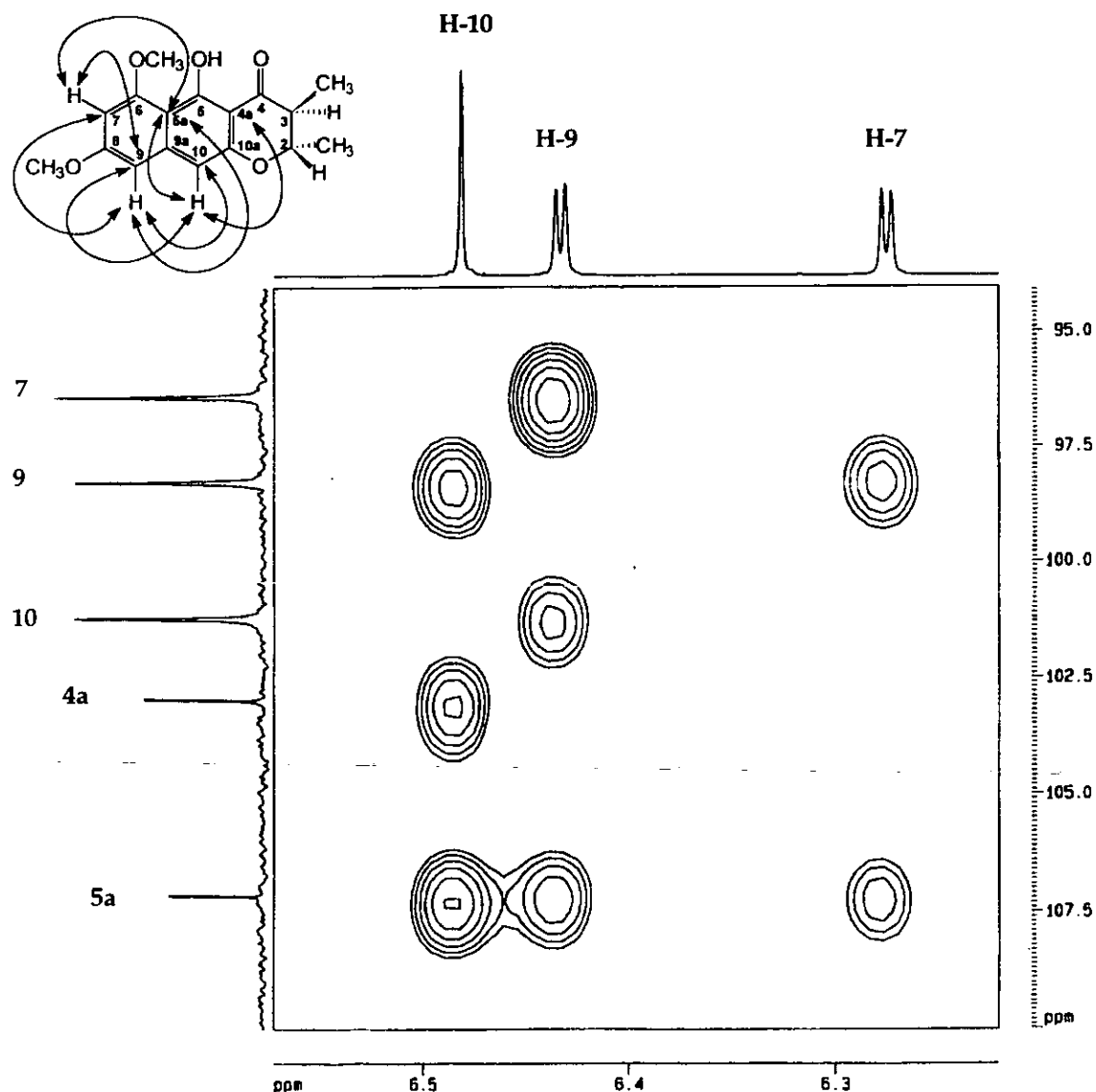
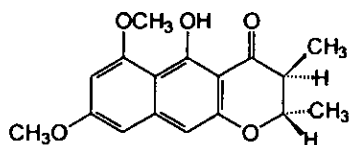


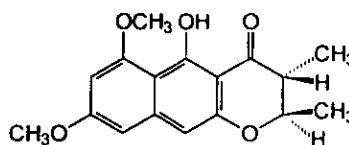
Figura 14. Correlaciones de C-5a, C-9/H-7; C-5a C-7, C-10/H-9 y C-4a, C-5a, C-9/10, en el espectro de HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [101].

d) Las correlaciones restantes observadas en el espectro HMBC y que se resumen en la Figura 14 y en el Cuadro 36 apoyan esta última propuesta.

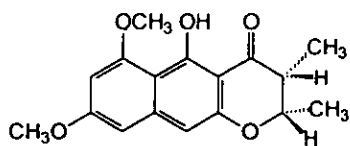
Con base en la información anterior, es factible proponer *a priori* dos posibilidades diastereoisoméricas para cada compuesto: estructuras A y B para el compuesto 101, y estructuras C y D para el compuesto 105.



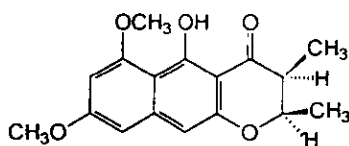
A



B



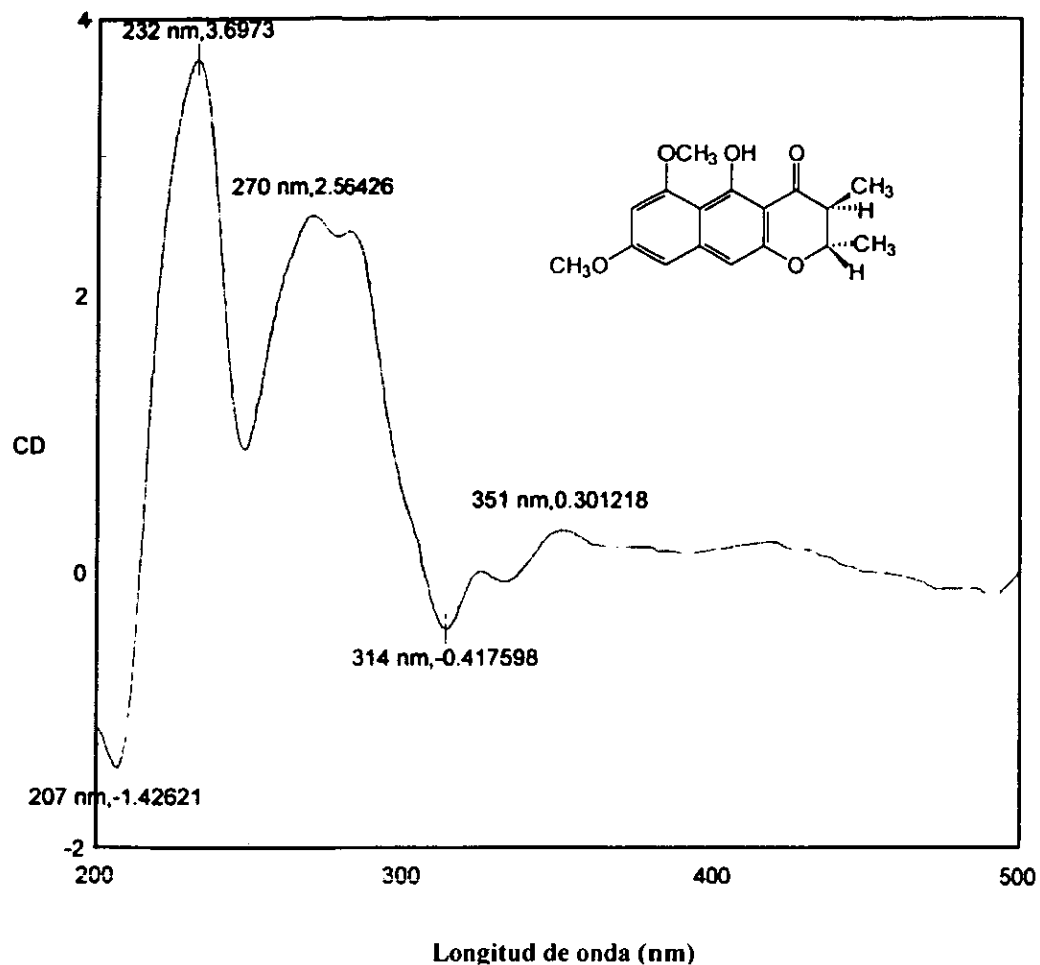
C



D

Para discernir entre A-B y C-D se registró el espectro de dicroísmo circular. Estos experimentos permitieron observar en los dos casos un efecto Cotton negativo en  $\sim 314$  nm (Figura 15). Estos resultados se compararon con el efecto Cotton reportado para varias flavanonas y 3-hidroxi-flavanonas (Gaffield, 1970). Las flavanonas de configuración 2*S* presentan un efecto Cotton positivo  $\sim 330$  nm. Las de configuración 2*R* presentan un efecto Cotton negativo en la misma región (Khan, *et al.*, 1996; Gaffield, 1970). Estas observaciones permiten asignar la configuración 2*S*,3*S* en el compuesto 101, y 2*S*,3*R* en el compuesto 105, y descartar así las posibilidades estructurales B y D.

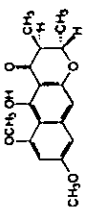
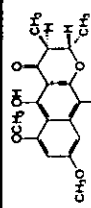
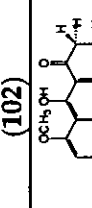
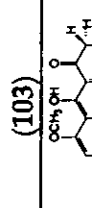
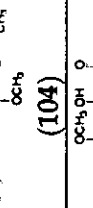
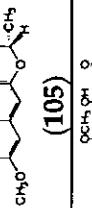
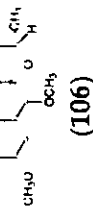
## VI. Resultados y Discusión.



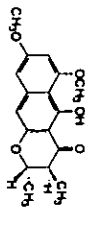
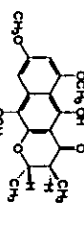
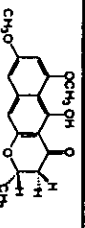
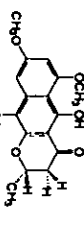
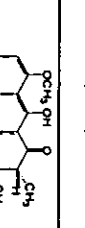
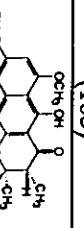
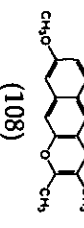
**Figura 15.** Espectro de dicroísmo circular de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [101].

Con base en el análisis detallado presentado anteriormente, se proponen como estructuras para los compuestos **101** y **105** la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona y la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona, respectivamente.

Cuadro 31. Constantes físicas de los compuestos 101, 102, 103, 104, 106, 105 y 108.

METABOLITO	P.f	$[\alpha]_D$ (c 1 mg/mL MeOH);	P.M.	F.M.
 <p>(101)</p>	165-167 °C	+ 128°	m/z 302	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>
 <p>(102)</p>	153-155 °C	+ 150°	m/z 332	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
 <p>(103)</p>	175-177 °C	+ 87.5°	m/z 288	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
 <p>(104)</p>	160-162 °C	+ 145.8°	m/z 318	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
 <p>(105)</p>	165-166 °C	+ 128°	m/z 302	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>
 <p>(106)</p>	154-156 °C	+ 150°	m/z 332	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
 <p>(108)</p>	195-197 °C	-----	m/z 300	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>

Cuadro 32. Constantes espectroscópicas de UV, IR, DC y espectrométricas (EM-IE  $m/z$ ) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105, 106 y 108.

METABOLITO	UV (CH <sub>3</sub> OH) $\lambda_{max}$ (log $\epsilon$ )	DC (CH <sub>3</sub> OH) $\Delta\epsilon$	IR $\nu_{max}$ (KBr)	EM-IE ( $m/z$ )
 (101)	409.5 (3.85), 320 (3.97), 277.5 (4.54), 252 (4.19), 235 (4.43), 214 (4.26), 209 (4.27) nm.	-1.5 x 10 <sup>4</sup> (314) nm	3500, 1638, 1610 cm <sup>-1</sup>	302 [M <sup>+</sup> (100)], 246 (90), 218 (12), 203 (6), 190 (19); HRMS $m/z$ 302.1159 (cal. C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> , 302.1154).
 (102)	411 (3.34), 320 (3.46), 277.5 (4.07), 252 (3.71), 235 (3.96), 214 (4.28), 209 (4.29) nm.	-1.6 x 10 <sup>4</sup> (314) nm	3500, 1638, 1610 cm <sup>-1</sup>	332 [M <sup>+</sup> (98)], 317 (90), 261 (100), 233 (66), 218 (14); HRMS $m/z$ 332.1255 (cal. C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> , 332.1259).
 (103)	401.5 (4.10), 331 (4.23), 318 (4.19), 278 (4.83), 232 (4.69), 223 (4.16), 247 (4.46) nm.	-1.5 x 10 <sup>4</sup> (312) nm	3500, 1639, 1611 cm <sup>-1</sup>	288 [M <sup>+</sup> (100)], 246 (50), 218 (10), 190 (20); HRMS $m/z$ 288.0992 (cal. C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> , 288.0997).
 (104)	413 (3.14), 332 (3.17), 320.5 (3.24), 277 (3.85), 235.5 (3.74), 214 (3.52), 207 (3.55) nm.	-1.5 x 10 <sup>4</sup> (313) nm	3490, 1640, 1610 cm <sup>-1</sup>	218 [M <sup>+</sup> (100)], 246 (50), 218 (10), 190 (20); EIMS $m/z$ 318 [M <sup>+</sup> (98)], 303 (90), 261 (100), 233 (45), 218 (20); HRMS $m/z$ 318.1108 (cal. C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> , 318.1103).
 (105)	409.5 (3.85), 320 (3.97), 277.5 (4.54), 252 (4.19), 235 (4.43), 214 (4.26), 209 (4.27) nm.	-1.5 x 10 <sup>4</sup> (314) nm	3500, 1638, 1610 cm <sup>-1</sup>	302 [M <sup>+</sup> (100)], 246 (90), 218 (12), 203 (6), 190 (19); HRMS $m/z$ 302.330 (cal. C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> , 302.322)
 (106)	411 (3.34), 320 (3.46), 277.5 (4.07), 252 (3.71), 235 (3.96), 214 (4.28), 209 (4.29) nm.	-1.6 x 10 <sup>4</sup> (314) nm	3500, 1638, 1610 cm <sup>-1</sup>	332 [M <sup>+</sup> (98)], 317 (90), 261 (100), 233 (66), 218 (14); HRMS $m/z$ 332.351 (cal. C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> , 332.348).
 (108)	398.5 (3.47), 274 (3.64), 237.5 (3.18), 224.5 (3.4) nm.	-----	3148, 1732, 1650 cm <sup>-1</sup>	300 [M <sup>+</sup> (100)], 282 (25), 271 (65), 254 (15), 229 (12), HRMS $m/z$ 300.0994 (cal. C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> , 300.0997).

Cuadro 33. Datos espectroscópicos de RMN-1H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.

POSICIÓN	1H (δ, mult., J en Hz)					
	101	102	103	104	105	106
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	4.20 (dq, 6.5, 10.5)	4.28 (dq, 6.5, 10.0)	4.58 (dq, 11.0, 6.25, 3.5)	4.60 (dq, 10.5, 6.5, 4.25)	4.59 (dq, 6.5, 3.5)	4.66 (dq, 3.0, 6.5)
3	2.65 (dq, 7.0, 10.5)	2.68 (dq, 7.0, 10.0)	2.73 <sub>a</sub> (dd 17.0, 3.5) 2.81 <sub>b</sub> (dd 17.0, 11.0)	2.75 <sub>a</sub> (dd 17.0, 4.25) 2.80 <sub>b</sub> (dd 17.0, 10.5)	2.69 (dq, 7.5, 3.5)	2.75 (dq, 3.5, 7.0)
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7	6.27 (d, 2.5)	6.34 (d, 2.5)	6.30 (d, 2.5)	6.35 (d, 2.5)	6.29 (d, 2.5)	6.34 (d, 2.0)
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
9	6.43 (d, 2.5)	6.91 (d, 2.5)	6.45 (d, 2.5)	6.92 (d, 2.5)	6.55 (d, 2.5)	6.91 (d, 2.0)
9a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	6.48 (s)	-----	6.52 (s)	-----	6.50 (s)	-----
10a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CH <sub>3</sub> -2	1.50 (d, 6.5)	1.57 (d, 6.5)	1.51 (d, 6.5)	1.57 (d, 6.5)	1.40 (d, 6.5)	1.45 (d, 6.5)
CH <sub>3</sub> -3	1.26 (d, 7.0)	1.28 (d, 7.0)	-----	-----	1.22 (d, 7.5)	1.24 (d, 7.0)
OCH <sub>3</sub> -6	3.96 (s)	3.97 (s)	3.97 (s)	3.97 (s)	3.96 (s)	3.97 (s)
OCH <sub>3</sub> -8	3.88 (s)	3.94 (s)	3.89 (s)	3.95 (s)	3.89 (s)	3.95 (s)
OCH <sub>3</sub> -10	-----	3.89 (s)	-----	3.89 (s)	-----	3.88 (s)
OH-5	14.49 (s)	14.30 (s)	14.46 (s)	14.21 (s)	14.41 (s)	14.23 (s)



Cuadro 34. Datos espectroscópicos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.

POSICIÓN	<sup>13</sup> C					
	101	102	103	104	105	106
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	78.0	78.3	73.2	73.4	75.3	75.7
3	46.4	46.5	43.9	44.0	44.9	45.0
4	200.1	200.1	197.6	197.6	201.8	201.7
4a	103.0	102.6	103.1	103.4	103.5	102.8
5	165.1	161.6	165.3	161.8	165.5	161.7
5a	107.2	106.9	107.4	107.1	107.7	107.1
6	161.3	161.2	161.5	161.4	161.3	161.5
7	96.4	92.6	96.6	92.8	96.4	92.6
8	162.3	162.7	162.5	162.9	162.4	162.7
9	98.3	96.8	98.5	96.9	98.3	96.8
9a	143.3	131.8	143.5	132.0	143.3	132.0
10	101.2	162.7	101.4	162.9	101.3	162.7
10a	156.0	138.3	156.2	138.4	155.8	138.3
CH <sub>3</sub> -2	19.7	19.8	21.2	21.0	16.4	16.4
CH <sub>3</sub> -3	10.4	10.8	-----	-----	9.6	9.6
OCH <sub>3</sub> -6	56.0	56.1	56.1	56.1	56.0	56.1
OCH <sub>3</sub> -8	55.3	55.5	55.4	55.5	55.4	55.5
OCH <sub>3</sub> -10	-----	60.6	-----	60.7	-----	60.6
OH-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Cuadro 35. Correlaciones observadas en los espectros NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.

		NOESY					
POSICIÓN (H)	101	102	103	104	105	106	
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
2	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -3	-----	-----	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -3	
3	CH <sub>3</sub> -2	CH <sub>3</sub> -2	-----	-----	CH <sub>3</sub> -2	CH <sub>3</sub> -2	
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
4a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
5a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
7	OCH <sub>3</sub> -6	OCH <sub>3</sub> -6	OCH <sub>3</sub> -6	OCH <sub>3</sub> -6	OCH <sub>3</sub> -6	OCH <sub>3</sub> -6	
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
9	H-10, OCH <sub>3</sub> -8	OCH <sub>3</sub> -8, OCH <sub>3</sub> -10	H-10, OCH <sub>3</sub> -8	OCH <sub>3</sub> -8, OCH <sub>3</sub> -10	H-10, OCH <sub>3</sub> -8	OCH <sub>3</sub> -8, OCH <sub>3</sub> -10	
9a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
10	H-9	-----	H-9	-----	H-9	-----	
10a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CH <sub>3</sub> -2	H-3, CH <sub>3</sub> -3	H-3, CH <sub>3</sub> -3	H <sub>a</sub> -3, H <sub>b</sub> -3	H <sub>a</sub> -3, H <sub>b</sub> -3	H-3, CH <sub>3</sub> -3	H-3, CH <sub>3</sub> -3	
CH <sub>3</sub> -3	H-2, CH <sub>3</sub> -2, OH-5	H-2, CH <sub>3</sub> -2, OH-5	-----	-----	H-2, CH <sub>3</sub> -2, OH-5	H-2, CH <sub>3</sub> -2, OH-5	
OCH <sub>3</sub> -6	H-7	H-7	H-7	H-7	H-7	H-7	
OCH <sub>3</sub> -8	H-9	H-9	H-9	H-9	H-9	H-9	
OCH <sub>3</sub> -10	-----	H-9	-----	H-9	-----	H-9	
OH-5	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -3	-----	-----	CH <sub>3</sub> -3	CH <sub>3</sub> -3	

Cuadro 36. Correlaciones observadas en los espectros HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los compuestos 101, 102, 103, 104, 105 y 106.

POSICIÓN (C)	HMBC					
	101	102	103	104	105	106
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	H-3, CH <sub>3</sub> -2	H-3, CH <sub>3</sub> -2	H-3 <sub>a</sub> , H-3 <sub>b</sub> , H-2-CH <sub>3</sub>	H-3 <sub>a</sub> , H-3 <sub>b</sub> , H-2-CH <sub>3</sub>	H-3, CH <sub>3</sub> -2	H-3, CH <sub>3</sub> -2
3	H-2, CH <sub>3</sub> -3	H-2, CH <sub>3</sub> -3	H-2, H-2-CH <sub>3</sub>	H-2, H-2-CH <sub>3</sub>	H-2, CH <sub>3</sub> -3	H-2, CH <sub>3</sub> -3
4	H-2, H-3, CH <sub>3</sub> -3	H-2, H-3, CH <sub>3</sub> -3	H-2, H-3 <sub>a</sub> , H-3 <sub>b</sub>	H-2, H-3 <sub>a</sub> , H-3 <sub>b</sub>	H-2, H-3, CH <sub>3</sub> -3	H-2, H-3, CH <sub>3</sub> -3
4a	H-3, OH-5, H-10	H-3, OH-5	H-3 <sub>a</sub> , H-3 <sub>b</sub> , OH-5, H-10	H-3 <sub>a</sub> , H-3 <sub>b</sub> , OH-5	H-3, OH-5, H-10	H-3, OH-5
5	OH-5	OH-5	OH-5	OH-5	OH-5	OH-5
5a	OH-5, H-7, H-9, H-10	OH-5, H-7, H-9	OH-5, H-7, H-9, H-10	OH-5, H-7, H-9	OH-5, H-7, H-9, H-10	OH-5, H-7, H-9
6	H-7, OCH <sub>3</sub> -6	H-7, OCH <sub>3</sub> -6	H-7, OCH <sub>3</sub> -6	H-7, OCH <sub>3</sub> -6	H-7, OCH <sub>3</sub> -6	H-7, OCH <sub>3</sub> -6
7	H-9	H-9	H-9	H-9	H-9	H-9
8	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9
9	H-7, H-10	H-7	H-7, 10	H-7	H-7, H-10	H-7
9a	H-9, H-10	H-9	H-9, H-10	H-9	H-9, H-10	H-9
10	H-9	H-9	H-9	H-9	H-9	H-9
10a	H-2, H-10	H-2	H-2, H-10	H-2	H-2, H-10	H-2
CH <sub>3</sub> -2	H-2, H-3	H-2, H-3	H-2, H-3	H-2, H-3	H-2, H-3	H-2, H-3
CH <sub>3</sub> -3	H-3, H-2	H-3, H-2	-----	-----	H-3, H-2	H-3, H-2
OCH <sub>3</sub> -6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCH <sub>3</sub> -8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OCH <sub>3</sub> -10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OH-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----

**5.2 Caracterización de la (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [102] y de la (+)-(2*S*,3*R*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona [106].**

Las 2,3-dihidronaftopironas **102** y **106** se obtuvieron como sólidos cristalinos de color amarillo solubles en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En los Cuadros 31-36 se indican sus constantes físicas y espectroscópicas. El análisis detallado de sus constantes espectrométricas y espectroscópicas permiten establecer que los productos naturales **102** y **106** son muy similares a la (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**101**) y a la (+)-(2*S*,3*R*)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**105**), respectivamente. En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (Espectros 3 y 11; Apéndice I) se observan como única diferencia la desaparición de la señal simple asignada al hidrógeno aromático H-10 ( $\delta_H \sim 6.50$ ) en los compuestos **101** y **105**. En su lugar se aprecia la presencia de una señal en  $\delta_H \sim 3.89$ , asignable a un grupo metoxilo adicional. Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C (Espectros 4 y 12; Apéndice I) presentan por consiguiente un átomo de carbono adicional en  $\delta_C \sim 60.6$  asignado al grupo metoxilo evidenciado en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H.

La configuración absoluta de los centros quirales en C-2 y C-3 se estableció como 2*S* y 3*S* para el compuesto **102** y como 2*S* y 3*R* para el compuesto **106**, con base en el efecto Cotton negativo ( $\sim 314$  nm) observado en los espectros de dicroísmo circular de ambos compuestos. Con base en la información anterior, se propone como estructura del compuesto **102** la de la (+)-(2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona y para el metabolito **106** la de (+)-(2*S*,3*R*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronaftopirona.

Las propuestas estructurales se comprobaron mediante el análisis de las correlaciones observadas en los espectros HMBC y NOESY, mismas que se resumen en los cuadros 35 y 36, respectivamente.

Cabe destacar que las correlaciones H-7 ( $\delta_H \sim 6.37$ )/CH<sub>3</sub>O-6 ( $\delta_H \sim 3.97$ , *s*), H-9 ( $\delta_H \sim 6.91$ )/ CH<sub>3</sub>O-8 ( $\delta_H \sim 3.94$ , *s*) y CH<sub>3</sub>O-10 ( $\delta_H \sim 3.89$ , *s*) observadas en los espectros

## VI. Resultados y Discusión.

NOESY, así como la interacción entre el hidrógeno H-9 y el carbono cuaternario asignado a la posición C-10 ( $\delta_C \sim 162.7$ ) en los espectros HMBC, permiten confirmar la ubicación de los grupos metoxilo en los compuestos **102** y **106**.

### 5.3 Caracterización de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona [103] y de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona [104].

Los metabolitos **103** y **104** se obtuvieron como sólidos cristalinos de color amarillo, solubles en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En los Cuadros 31-36 se presentan sus constantes físicas y espectroscópicas. De nueva cuenta, el análisis exhaustivo de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas indicadas en los Cuadros 32 y 34 permitieron establecer que las dihidronaftopironas **103** y **104** corresponden a los análogos desmetilados en la posición C-3 de las dihidronaftopironas **101** y **105**, respectivamente.

Esta propuesta estructural se confirmó principalmente con base en el estudio de los espectros de RMN (Espectros 5-8 ;Apéndice I). Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de los metabolitos **103** y **104** presentaron un sistema AB en  $\delta_{\text{Ha}} \sim 2.74$  ( $J_1 \sim 17.0$  Hz;  $J_2 \sim 4.0$  Hz,) y  $\delta_{\text{Hb}} \sim 2.80$  ( $J_1 \sim 17.0$  Hz;  $J_2 \sim 11.0$  Hz) asignable a un grupo metileno (H-3a, H-3b)  $\beta$  a la función oxigenada de la  $\gamma$ -pirona, en lugar de las señales correspondientes al metino y al metilo en C-3. Este grupo de señales mostraron una correlación con la absorción del metileno en  $\delta_C \sim 44.0$  en el espectro HMQC (Cuadro 35). En  $\delta_H \sim 4.60$  ( $J_1 \sim 10.5$  Hz;  $J_2 \sim 6.25$  Hz;  $J_3 \sim 4.0$  Hz) se observa una señal doble de cuádruples dobles, que integra para un hidrógeno, asignable al metino C-2 (Cuadro 33). Estas señal presenta una correlación en el espectros HMQC con el carbono alifático en  $\delta_C \sim 73.3$ . En la Figura 16 se presenta la multiplicidad comparativa para las señales correspondientes a los hidrógenos de la porción  $\gamma$  y pirona de los productos **101** y **103**.

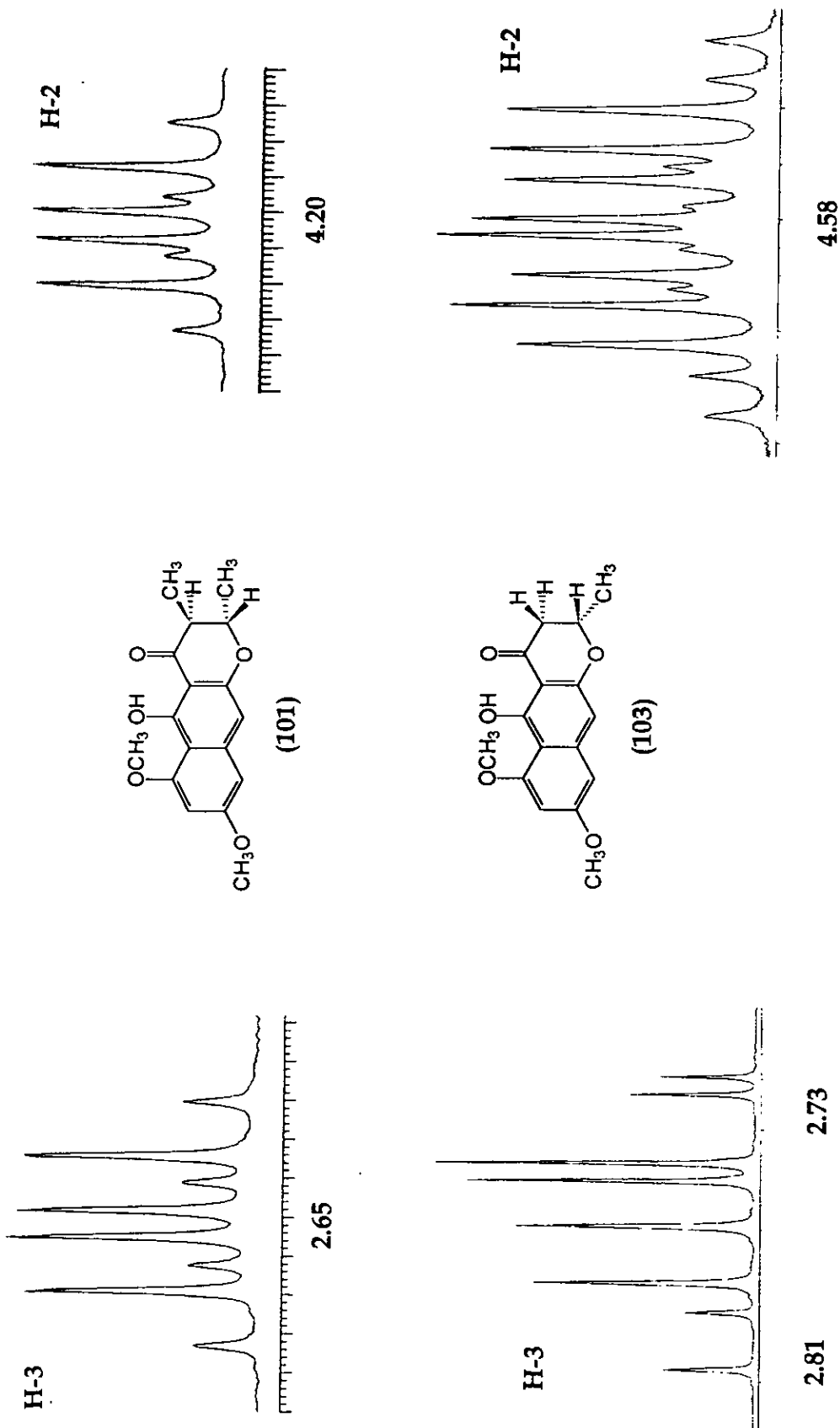


Figura 16. Multiplicidad comparativa para las señales asignadas a los hidrógenos de las posiciones 2 y 3 de las moléculas 101 y 103.

## VI. Resultados y Discusión.

Los compuestos **104** y **103** presentaron también un efecto Cotton negativo en ~314 nm, en el espectro de dicroísmo circular. En consecuencia, la configuración absoluta en C-2 se designó como S. Con base en estas evidencias, la estructura del compuesto **103** corresponde a la de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona y la del metabolito **104** a la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona.

### 5.4 Caracterización de la 5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetilnaftopirona (108).

El producto natural **108** se aisló como un sólido cristalino de color amarillo, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un punto de fusión de 195-197 °C. La fórmula molecular de este compuesto se estableció por espectrometría de masas como C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub> (Cuadro 31), la cual permite un índice de insaturación de diez.

En el Cuadro 31 se presentan las constantes físicas y en los Cuadros 32 y 37 la constantes espectroscópicas de UV, IR y espectrométricas (EM-IE) del metabolito fitotóxico **108**. El análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 13 y 14 Cuadro 37) permitió establecer que el producto natural **108** es el 2,3-dehidro derivado de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (**101**). La evidencia más importante que apoya esta propuesta fue la presencia en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C de dos señales vinílicas en δ<sub>C</sub> 167.4 y 119.2, en lugar de los metinos en δ<sub>C</sub> 78.0 y 46.4 del compuesto **101**. Asimismo, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H no presentó las señales dobles de cuádruples de H-2 y H-3 observados en el espectro del compuesto **101**. Por último, cabe resaltar que las señales de los metilos se encontraron desplazadas paramagnéticamente en δ<sub>H</sub> 2.39 y 2.03 en armonía con la disposición de estos grupos sobre carbonos vinílicos.

Estas evidencias aunadas a la información proporcionada por los espectros bidimensionales (COSY, NOESY y HMBC) [Cuadro 37] permitieron identificar al producto natural **108** como la 5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetilnaftopirona.

Cuadro 37. Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetilnaftopirona (108).

POSICIÓN	<sup>13</sup> C (δ)	<sup>1</sup> H (δ, mult., J en Hz)	NOESY	HMBC
1	----	----	----	----
2	167.4	----	----	CH <sub>3</sub> -2
3	119.2	----	----	CH <sub>3</sub> -3
4	184.1	----	----	CH <sub>3</sub> -3
4a	104.2	----	----	OH-5, H-10
5	160.6	----	----	OH-5
5a	108.4	----	----	OH-5, H-7, H-9, H-10
6	161.5	6.37 d, J = 2.4 Hz	----	H-7, OCH <sub>3</sub> -6
7	97.2	----	H-9, OCH <sub>3</sub> -6	H-9
8	162.6	6.57 d, J = 2.4 Hz	----	H-7, OCH <sub>3</sub> -8, H-9
9	97.8	----	H-7, H-10, OCH <sub>3</sub> -8	H-7
9a	141.1	----	----	H-9, H-10
10	101.0	6.93 s	H-9	H-9
10a	153.3	----	----	----
CH <sub>3</sub> -2	23.1	2.39 s	CH <sub>3</sub> -2, CH <sub>3</sub> -3	----
CH <sub>3</sub> -3	20.7	2.03 s	CH <sub>3</sub> -2, CH <sub>3</sub> -3	----
OCH <sub>3</sub> -6	56.1	4.00 s	H-7	----
OCH <sub>3</sub> -8	55.4	3.92 s	H-9	----
OH-5	----	15.22 s	CH <sub>3</sub> -3	----

### 5.5 Caracterización de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).

El compuesto 109 se aisló como un sólido cristalino de color naranja claro, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un punto de fusión de 197-198 °C. El espectro en el UV presenta absorciones intensas en λ<sub>max</sub> 256, 233 y 207 nm características de un núcleo xantona. Por otra parte, el espectro en el IR presentó como característica relevante la absorción para un grupo carbonilo conjugado en 1732 cm<sup>-1</sup>. Su fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas. El espectro de masa presentó un ión molecular en una relación de masa carga de 284 y permitió establecer una fórmula molecular de C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> (Cuadro 38).



## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 38.** Constantes espectroscópicas de IR, de UV y espectrométricas de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).

IR $\nu_{\max}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$	EM-IE $m/z$ (INTENSIDAD RELATIVA)	UV (CH <sub>3</sub> OH) $\lambda_{\max}$ nm
3148, 1732, 1650	284 [M <sup>+</sup> (48)], 252 (100), 223 (14), 139 (8), 127 (8), 77 (9).	233, 256, 289, 300, 360.

El análisis de los espectros de RMN (Cuadro 39) permitió establecer que el producto natural presenta el núcleo estructural de una xantona (Tetsuro *et al.*, 1992; Munekezu *et al.*, 1996; Hideaki *et al.*, 1986). Los espectros evidencian además la presencia de un hidroxilo quelatado, un metilo sobre anillo aromático y un grupo carboximetilo (de un metil éster de un ácido aromático).

Así, el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 16; Apéndice I) presenta señales para 16 átomos de carbonos. De estas señales, dos corresponden a grupos carbonilo ( $\delta_c$  169.66 y 180.44), cinco a metinos aromáticos ( $\delta_c$  107.38, 111.73, 119.39, 122.50 y 134.75), seis a carbonos cuaternarios aromáticos ( $\delta_c$  155.69, 106.99, 117.59, 156.00, 119.40 y 149.40) y las últimas dos señales corresponden a un grupo metilo sobre anillo aromático ( $\delta_c$  22.62) y a un grupo éster metílico ( $\delta_c$  53.09). Cabe mencionar que la discriminación entre metilos, metilenos y metinos se realizó mediante el análisis del espectro DEPT (Cuadro 39).

Los datos generados por el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Cuadro 39, Espectro 15; Apéndice I) confirman la presencia de cinco hidrógenos aromáticos, un grupo hidroxilo quelatado ( $\delta_H$  12.15 s), un grupo metil éster ( $\delta_H$  4.03 s) y de un metilo sobre anillo aromático ( $\delta_H$  2.43 s). Tres de los hidrógenos aromáticos conforman un sistema ABC ( $\delta_H$  7.30 dd,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz; 7.74 dd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 7.5$  Hz; 7.52 dd,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz). Los otros dos aparecen en  $\delta_H$  6.64 (q) y 6.75 (q). La

multiplicidad observada en cada caso indica que estos hidrógenos se encuentran *orto* a un grupo metilo (acoplamiento bencílico).

**Cuadro 39.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).

POSICIÓN	<sup>13</sup> C (δ)	<sup>1</sup> H (δ, mult., J en Hz)	NOESY	HMBC
1	156.0	---	---	H-3
2	122.5	7.30 <i>dd</i> , J = 7.0 Hz; J = 1.0 Hz	H-3	----
3	134.8	7.74 <i>dd</i> , J = 8.2 Hz; J = 7.5 Hz	H-2, H-4	----
4	119.4	7.52 <i>dd</i> , J = 8.7 Hz; J = 1.0 Hz	H-3	H-2
4a	133.6	----	----	H-3
5	107.4	6.64 <i>q</i>	H-7	H-7, CH <sub>3</sub> -6
5a	155.7	----	----	H-5
6	149.4	----	----	CH <sub>3</sub> -6
7	111.7	6.75 <i>q</i>	H-5	H-5, CH <sub>3</sub> -6
8	161.5	----	----	H-7
8a	107.0	----	----	H-5
9	180.4	----	----	H-5
9a	117.6	----	----	H-2, H-4
CH <sub>3</sub> -6	22.6	2.43 <i>s</i>	H-5, H-7	----
OH-8	---	12.15 <i>s</i>	----	----
CH <sub>3</sub> OCO-5	53.1	4.03 <i>s</i>	----	----
CH <sub>3</sub> OOC-5	169.7	----	----	H-2

Para establecer la disposición de los grupos funcionales y asignar los carbonos cuaternarios, se procedió a realizar el análisis de los espectros de RMN de correlación homonuclear (COSY y NOESY) y heteronuclear (HMBC).

En el Cuadro 39 y en la Figura 17 se indican las correlaciones más relevantes observadas en el espectro HMBC. Así, las correlaciones observadas para la señales en δ<sub>c</sub> 156.00 (C-1) [C-1/H-3], δ<sub>c</sub> 119.4 (C-4) [C-4/H-2], δ<sub>c</sub> 119.40 (C-4a) [C-4a/H-3] y δ<sub>c</sub> 117.6 (C-9a) [C-9a/H-2, H-4] permiten ubicar al carboxi metilo en la posición C-1. Por otro lado, las correlaciones observadas en δ<sub>c</sub> 107.38 (C-5) [C-5/H-7, CH<sub>3</sub>-6],

## VI. Resultados y Discusión.

en  $\delta_c$  111.73 (C-7) [C-7/H-5, CH<sub>3</sub>-6], en  $\delta_c$  161.45 (C-8) [C-8/H-7] y en  $\delta_c$  106.99 (C-8a) [C-8a/H-5], permiten ubicar al grupo hidroxilo en C-8 y al metilo en C-6. Las interacciones CH<sub>3</sub>-6/H-7, CH<sub>3</sub>-6/H-5 observadas en el espectro NOESY apoyan esta última propuesta.

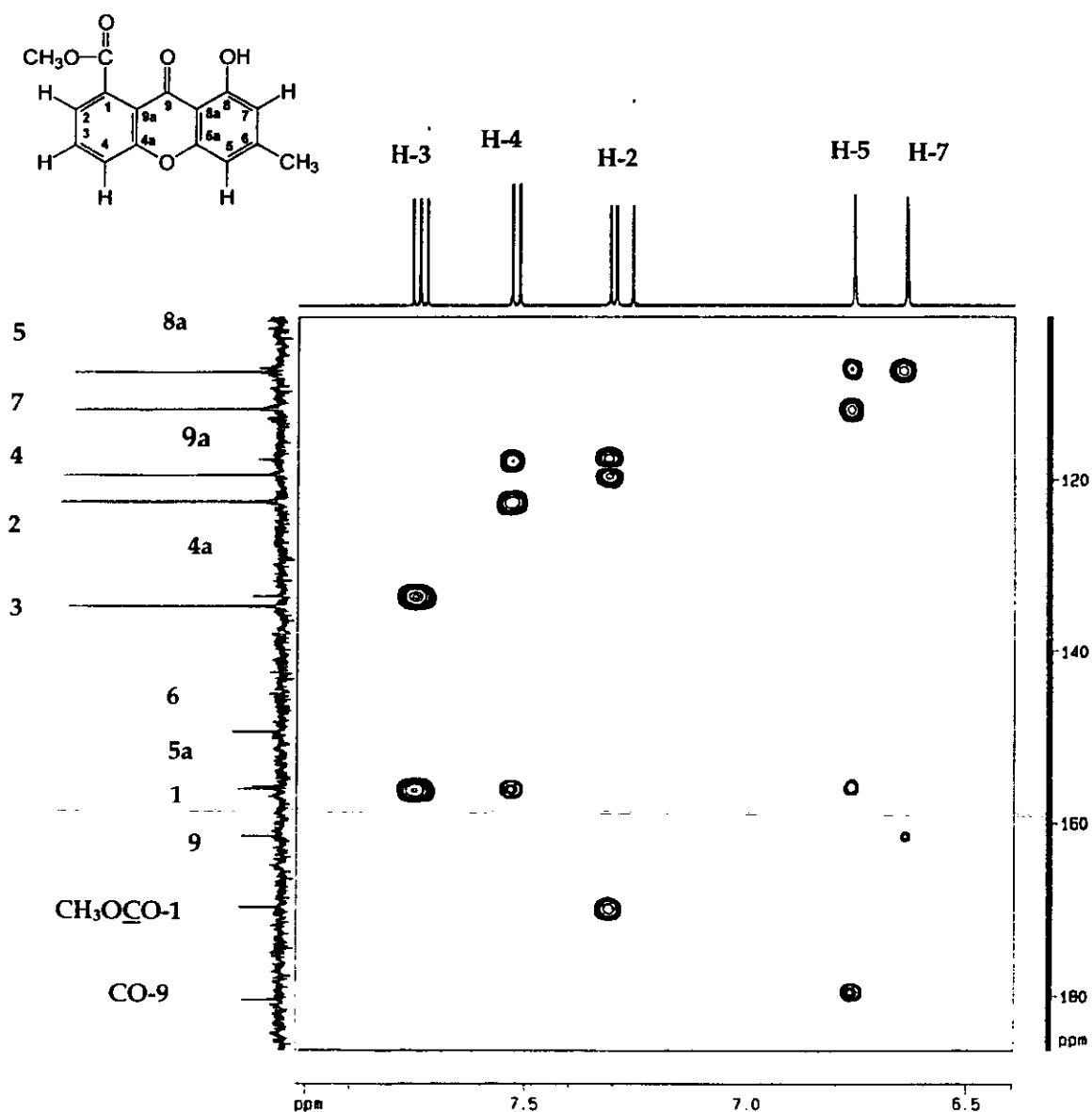


Figura 17. Espectro de HMBC (500, MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).

Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del compuesto **109** se estableció como la de la 8-hidroxi-1-metoxycarbonil-6-metilxantona.

La estructura de la xantona se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En la Figura 18 se muestra una vista estereoscópica de este compuesto.

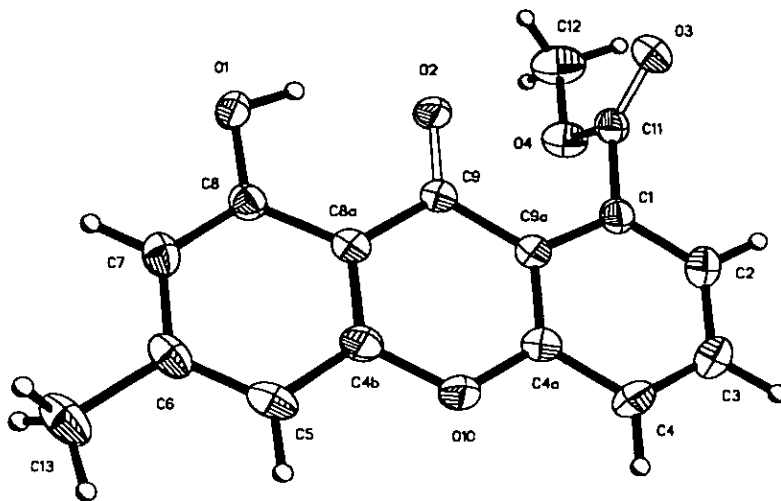


Figura 18. Vista estereoscópica de la 1-hidroxi-8-metoxycarbonil-3-metilxantona (**109**).

5.6 Caracterización de la rubrofusarina B (**107**), la emodina (**110**), el metilparaben (**111**), el ácido-4-hidroxibenzoico (**112**), el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**113**) y la citrinina (**114**).

La rubrofusarina B (**107**) [Galmarini *et al.*, 1974; Gorst-Allam *et al.*, 1980; Leeper y Staunton 1984], la emodina (**110**) [Melvin *et al.*, 1988; Melvin y Giménez 1991], el metilparaben (**111**) [ Buckingham 1982], el ácido-4-hidroxibenzoico (**112**) [Buckingham 1982], el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**113**) [Porter 1975; Seitz y Pausksfelis 1977] y la citrinina (**114**) [Mathieson y Whalley 1964; Sankawa *et al.*, 1983] se caracterizaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura.

**6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.**

De acuerdo con los objetivos planteados y con la estrategia experimental establecida para el desarrollo de la presente investigación, se realizaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el potencial fitotóxico de los compuestos aislados. Para ello se evaluó el efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular, utilizando semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y de *Echinochloa crusgalli*; estas especies son representantes de arvenses dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente.

Por otra parte, con la finalidad de explorar un posible blanco de acción de las fitotoxinas en el metabolismo y/o fisiología vegetal se analizó el efecto de los compuestos activos sobre la proteína reguladora CaM. En primer lugar, se investigó si las fitotoxinas alteraban la movilidad electroforética de las CaMs de espinaca y de cerebro de bovino (SIGMA), mediante una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%), o si se retenían en una columna de afinidad sobre CaM de cerebro de bovino unida a agarosa de cerebro de bovino (SIGMA). Por último, se analizó si los compuestos afectaban las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM, utilizando como enzima blanco la NAD cinasa dependiente de CaM.

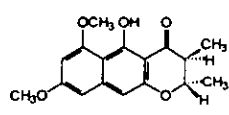
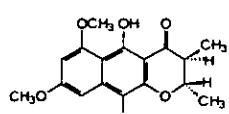
**6.1. Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico.**

Los ensayos de fitotoxicidad se realizaron utilizando tres concentraciones (1, 10 y 100 µg/mL) de los productos naturales de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 2.2 de la sección experimental. Como control positivo se utilizó el ácido-2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D).

En el Cuadro 40 se indica el efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las dos malezas de prueba, *Amaranthus hypochondriacus*

y de *Echinochloa crusgalli*. Los resultados se expresaron en términos de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$  M). En general, todos los compuestos evaluados demostraron una actividad fitotóxica significativa y dependiente de la concentración sobre el crecimiento radicular de las dos malezas (Cuadro 40) observándose, en algunos casos una  $CI_{50}$  calculada menor a la del control positivo (2,4-D). Los compuestos 103, 104, 106-108 y 111-114 son los más activos para las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, en tanto que, los compuestos 102, 104, 106, 107, 109 y 110 demostraron un efecto fitotóxico mayor para las semillas de *Echinochloa crusgalli*. El compuesto 109 fue el único que demostró un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*. Con respecto al proceso de germinación, de manera general, los compuestos puros no presentaron un efecto significativo a la máxima concentración evaluada (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

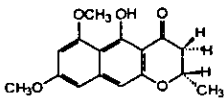
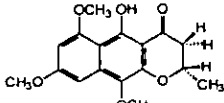
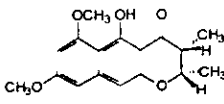
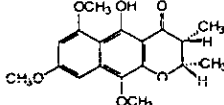
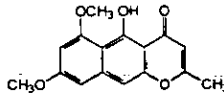
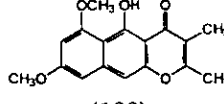
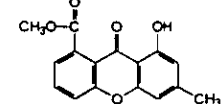
Cuadro 40. Efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de *Guanomyces polythrix*.

METABOLITO	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
	CRECIMIENTO RADICULAR $CI_{50}$ (M)	GERMINACIÓN $CI_{50}$ (M)	CRECIMIENTO RADICULAR $CI_{50}$ (M)	GERMINACIÓN $CI_{50}$ (M)
 <p>(101)</p>	$1.0 \times 10^{-4} \pm 1.4$	$2.4 \times 10^{-4} \pm 1.5$	$1.2 \times 10^{-4} \pm 1.7$	$3.0 \times 10^{-4} \pm 2.2$
 <p>(102)</p>	$6.5 \times 10^{-4} \pm 1.5$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 1.2$	$6.1 \times 10^{-5} \pm 1.1$	$2.7 \times 10^{-4} \pm 1.8$

$\pm$  desviación estándar calculada a partir del crecimiento radicular y de la germinación de las semillas utilizadas.

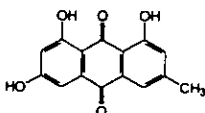
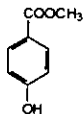
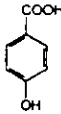
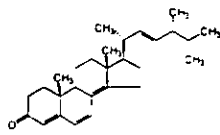
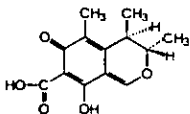
## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 40.** Efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de *Guanomyces polythrix* (continuación).

METABOLITO	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
	CRECIMIENTO RADICULAR CI <sub>50</sub> (M)	GERMINACIÓN CI <sub>50</sub> (M)	CRECIMIENTO RADICULAR CI <sub>50</sub> (M)	GERMINACIÓN CI <sub>50</sub> (M)
 <p>(103)</p>	2.3 X 10 <sup>-5</sup> ± 2.4	>3.4 X 10 <sup>-4</sup> ± 2.2	8.7 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.7	>3.4 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.5
 <p>(104)</p>	1.3 X 10 <sup>-5</sup> ± 1.3	>3.1 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.8	4.0 X 10 <sup>-5</sup> ± 1.9	>3.1 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.4
 <p>(105)</p>	1.1 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.0	2.5 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.7	1.3 X 10 <sup>-4</sup> ± 2.2	>3.3 X 10 <sup>-4</sup> ± 0.9
 <p>(106)</p>	7.7 X 10 <sup>-5</sup> ± 1.9	>3.0 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.4	7.0 X 10 <sup>-5</sup> ± 2.1	>3.0 X 10 <sup>-4</sup> ± 0.9
 <p>(107)</p>	1.3 X 10 <sup>-5</sup> ± 1.7	>3.5 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.2	2.0 X 10 <sup>-5</sup> ± 1.6	>3.5 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.1
 <p>(108)</p>	8.0 X 10 <sup>-5</sup> ± 1.4	>3.3 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.5	1.7 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.8	>3.3 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.0
 <p>(109)</p>	1.5 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.7	>3.3 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.8	9.8 X 10 <sup>-6</sup> ± 1.9	>3.5 X 10 <sup>-4</sup> ± 1.2

± desviación estándar calculada a partir del crecimiento radicular y de la germinación de las semillas utilizadas.

Cuadro 40. Efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de *Guanomyces polythrix* (continuación).

METABOLITO	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
	CRECIMIENTO RADICULAR $CI_{50}$ (M)	GERMINACIÓN $CI_{50}$ (M)	CRECIMIENTO RADICULAR $CI_{50}$ (M)	GERMINACIÓN $CI_{50}$ (M)
 (110)	$1.3 \times 10^{-4} \pm 1.8$	$>3.7 \times 10^{-4} \pm 2.1$	$2.0 \times 10^{-5} \pm 2.5$	$>3.7 \times 10^{-4} \pm 1.9$
 (111)	$5.5 \times 10^{-5} \pm 1.7$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 1.8$	$6.3 \times 10^{-4} \pm 1.4$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 1.9$
 (112)	$1.7 \times 10^{-5} \pm 2.5$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 1.7$	$2.3 \times 10^{-4} \pm 1.5$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 2.0$
 (113)	$8.0 \times 10^{-5} \pm 1.4$	$>2.5 \times 10^{-4} \pm 1.5$	$1.7 \times 10^{-4} \pm 1.2$	$>2.5 \times 10^{-4} \pm 1.8$
 (114)	$2.3 \times 10^{-5} \pm 1.4$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 1.9$	$6.3 \times 10^{-4} \pm 2.4$	$>3.0 \times 10^{-4} \pm 2.1$
2,4-D	$1.8 \times 10^{-4} \pm 1.2$	$>2.3 \times 10^{-2} \pm 1.7$	$8.8 \times 10^{-4} \pm 2.2$	$>2.3 \times 10^{-2} \pm 2.3$

$\pm$  desviación estándar calculada a partir del crecimiento radicular y de la germinación de las semillas utilizadas.



### 6.2. Interacción de los principios fitotóxicos puros con CaMs de espinaca y de cerebro de bovino.

La posible interacción de las fitotoxinas con la proteína CaM (de espinaca y de cerebro de bovino) se exploró, en primer lugar, mediante una electroforesis vertical descendente en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 12%). La interacción de los compuestos fitotóxicos con la CaM altera la conformación de la proteína, provocando por consiguiente cambios en su movilidad electroforética (Leung, *et al.*, 1985).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en presencia de  $\text{CaCl}_2$  o de EGTA [(ácido tetraacético etilen glicol-bis  $\beta$ -aminoetil éter)-*N,N,N',N'*] un agente quelante de calcio, utilizando quercetina como un control positivo (Nishino *et al.*, 1984). La interacción de los compuestos fitotóxicos 101-108 con la proteína CaM (espinaca y de cerebro de bovino) se presenta en los electroforetogramas que se ilustran en las Figuras 19 y 20, y la interacción de los metabolitos 109-114 en los electroforetogramas de las Figuras 21 y 22. En general, todos los compuestos modifican la movilidad electroforética de la CaM en ausencia y en presencia de calcio. Los compuestos 102 y 106 retardaron notablemente la movilidad de ambos tipos de proteína (de espinaca y de cerebro de bovino). El incremento o el retardo en la movilidad de la proteína CaM provocado por las restantes fitotoxinas fue más evidente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En general, los metabolitos fitotóxicos aceleran la movilidad de la proteína en ausencia de calcio (Leung *et al.*, 1984).

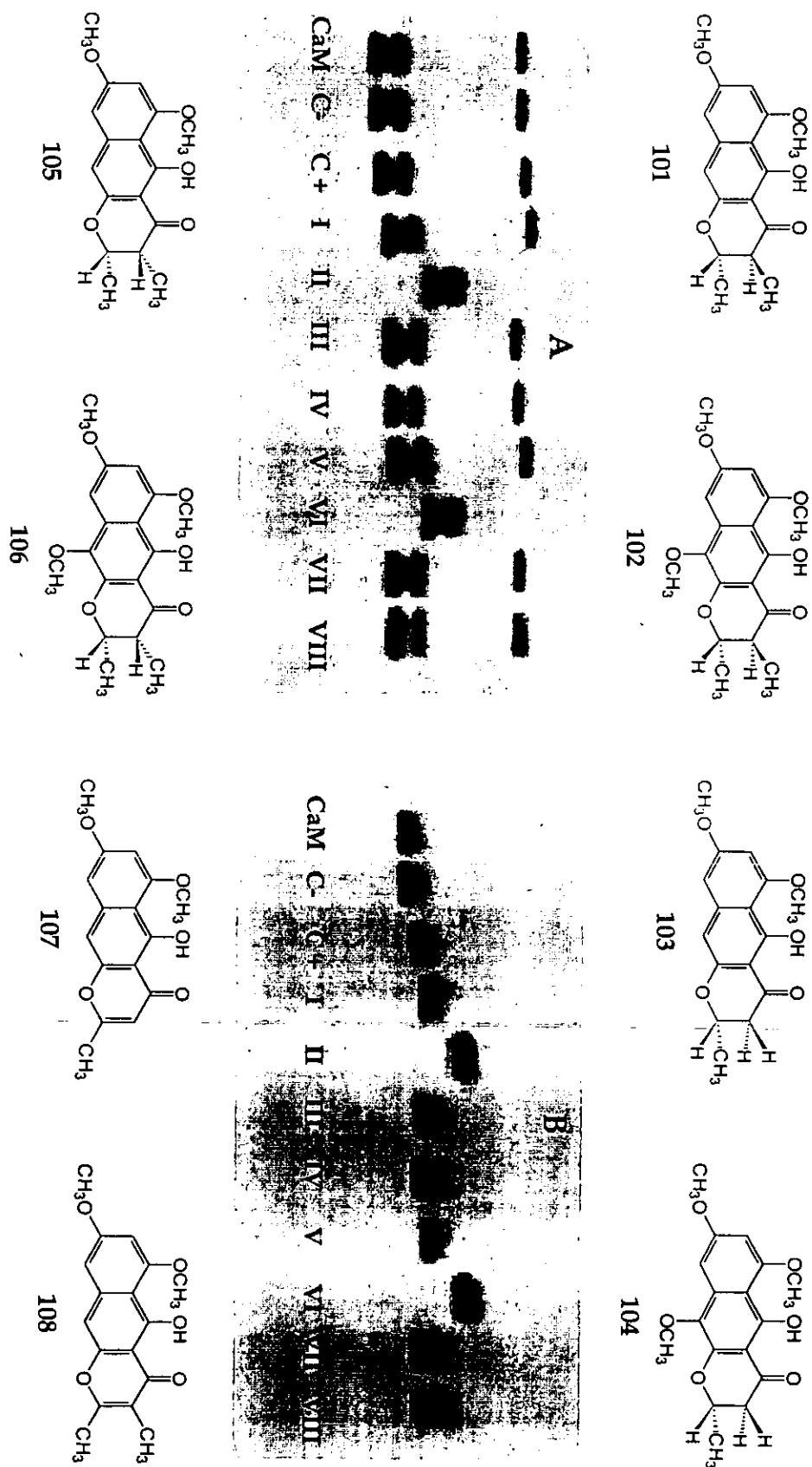
Posteriormente, se realizó una cromatografía de afinidad sobre CaM de cerebro de bovino unida a agarosa. Este análisis permitió corroborar el tipo de unión (reversible *vs* no reversible) entre las fitotoxinas y la CaM, aunque las condiciones desnaturizantes de la electroforesis permiten proponer *a priori* que la mayoría de las fitotoxinas ensayadas interaccionan de manera no reversible con las CaMs de cerebro de bovino y de espinaca. La cantidad de compuesto retenido en la columna se determinó mediante el análisis espectrofotométrico de los eluatos obtenidos en diferentes condiciones tanto no desnaturizantes (disoluciones

amortiguadoras I y II) como desnaturalizantes (disolución amortiguadora III, NaCl y urea). En la sección experimental se indica la composición de los eluyentes.

En todas las determinaciones, la cantidad de la fitotoxina liberada de la columna se determinó espectrofotométricamente interpolando la densidad óptica registrada para los distintos eluatos en las curvas estándar construidas con cada uno de los productos naturales (Cuadro 7; sección experimental). Los resultados de esta determinación se resumen en los Cuadros 41 y 42. En general, todos los compuestos en estudio fueron retenidos en la columna de afinidad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo anterior sugiere que, en principio, la interacción entre la CaM de cerebro de bovino y los diferentes compuestos fitotóxicos es a excepción del compuesto 114 es 100 % irreversible en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condiciones experimentales desnaturalizantes, los metabolitos 101-108, 110 y 113 se retienen en la columna, indicando que la interacción con la proteína es no reversible. Ninguno de estos productos se liberó de la columna de afinidad bajo condiciones de elución desnaturalizantes (pH básico y urea) [Cuadros 41 y 42].

La interacción de los compuestos 109, 111, 112 y la quercetina (control positivo), no es 100 % irreversible. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (disolución amortiguadora de EGTA, condición experimental no desnaturalizante) los metabolitos son parcialmente liberados de la columna de afinidad. Además, se puede observar que estos compuestos presentan una unión con la proteína reguladora CaM de tipo reversible, ya que fueron liberados totalmente de la columna de afinidad después de utilizar como eluyente urea 6 M (condición experimental altamente desnaturalizante). Por último, el compuesto 114 presenta una interacción parcialmente covalente con la proteína CaM. Únicamente se liberaron 4  $\mu\text{g}$  del metabolito fitotóxico de la columna de afinidad bajo todas las condiciones experimentales empleadas.

## VI. Resultados y Discusión.



**Figura 19.** Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 µg de calmodulina y 2 µL de CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + (0.033 µg/mL querretina en DMSO), I (101), II (102), III (103), IV (104), V (105), VI (106), VII (107) y VIII (108). En todos los casos se aplicaron 0.033 µg/mL de compuesto en DMSO.

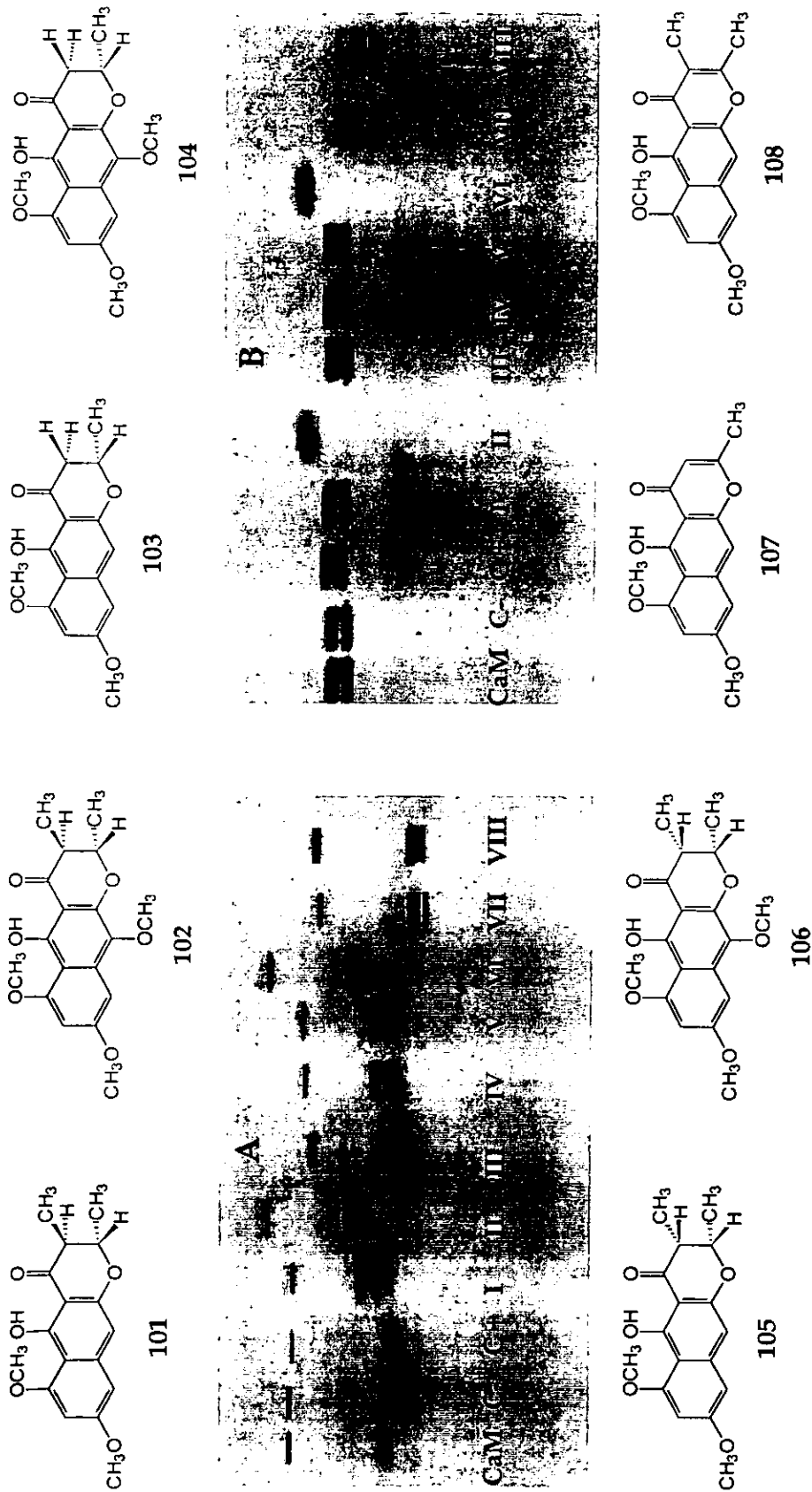
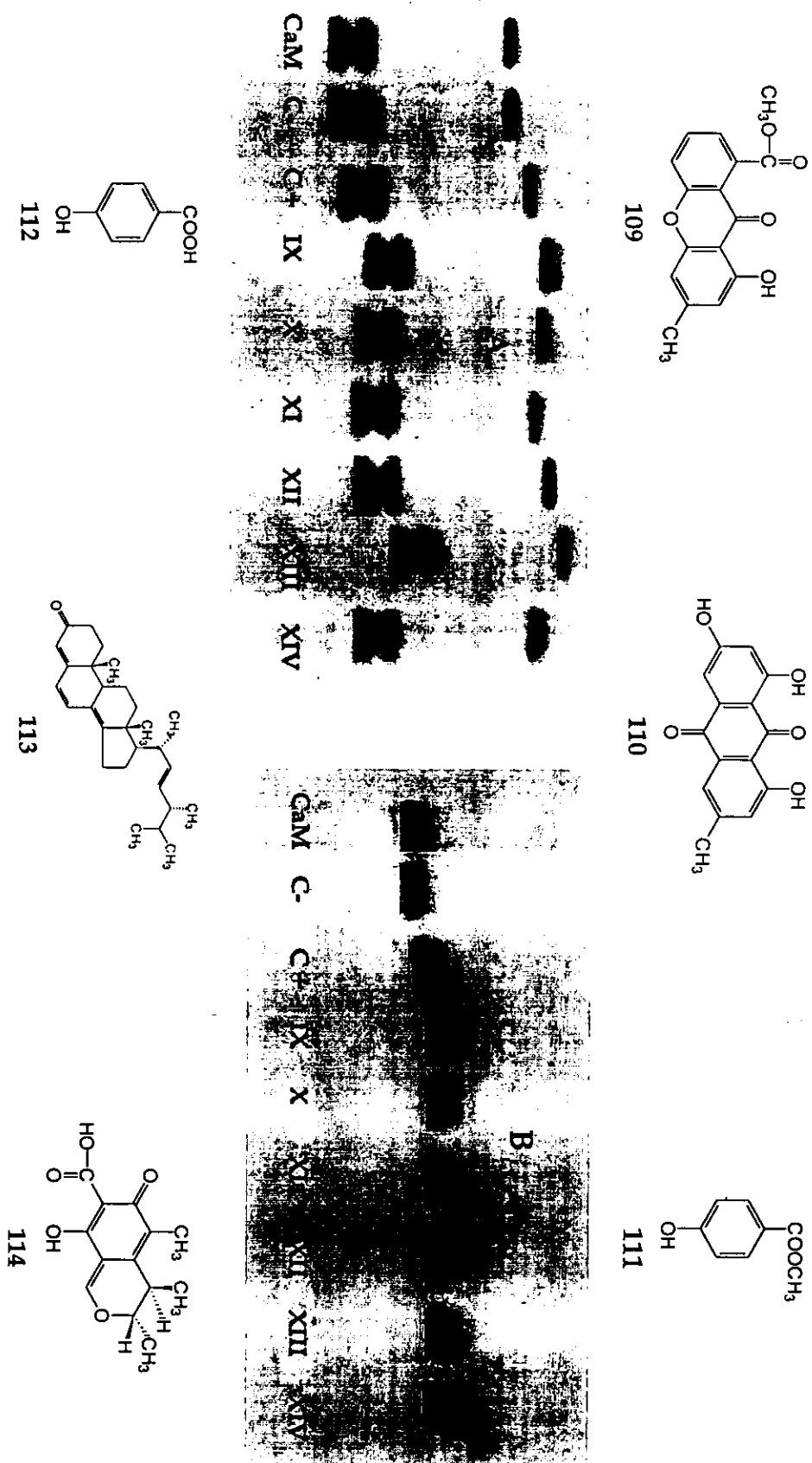


Figura 20. Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 µg de calmodulina y 2 µL de EGTA 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + (0.033 µg/mL quercetina en DMSO), I (101), II (102), III (103), IV (104), V (105), VI (106), VII (107) y VIII (108). En todos los casos se aplicaron 0.033 µg/mL de compuesto en DMSO.

## VI. Resultados y Discusión.

Figura 21. Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2  $\mu\text{g}$  de calmodulina y 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + (0.033  $\mu\text{g}/\text{mL}$  quercetina en DMSO), IX (109), X (110), XI (111), XII (112), XIII (113) y XVI (114). En todos los casos se aplicaron 0.033  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de compuesto en DMSO.



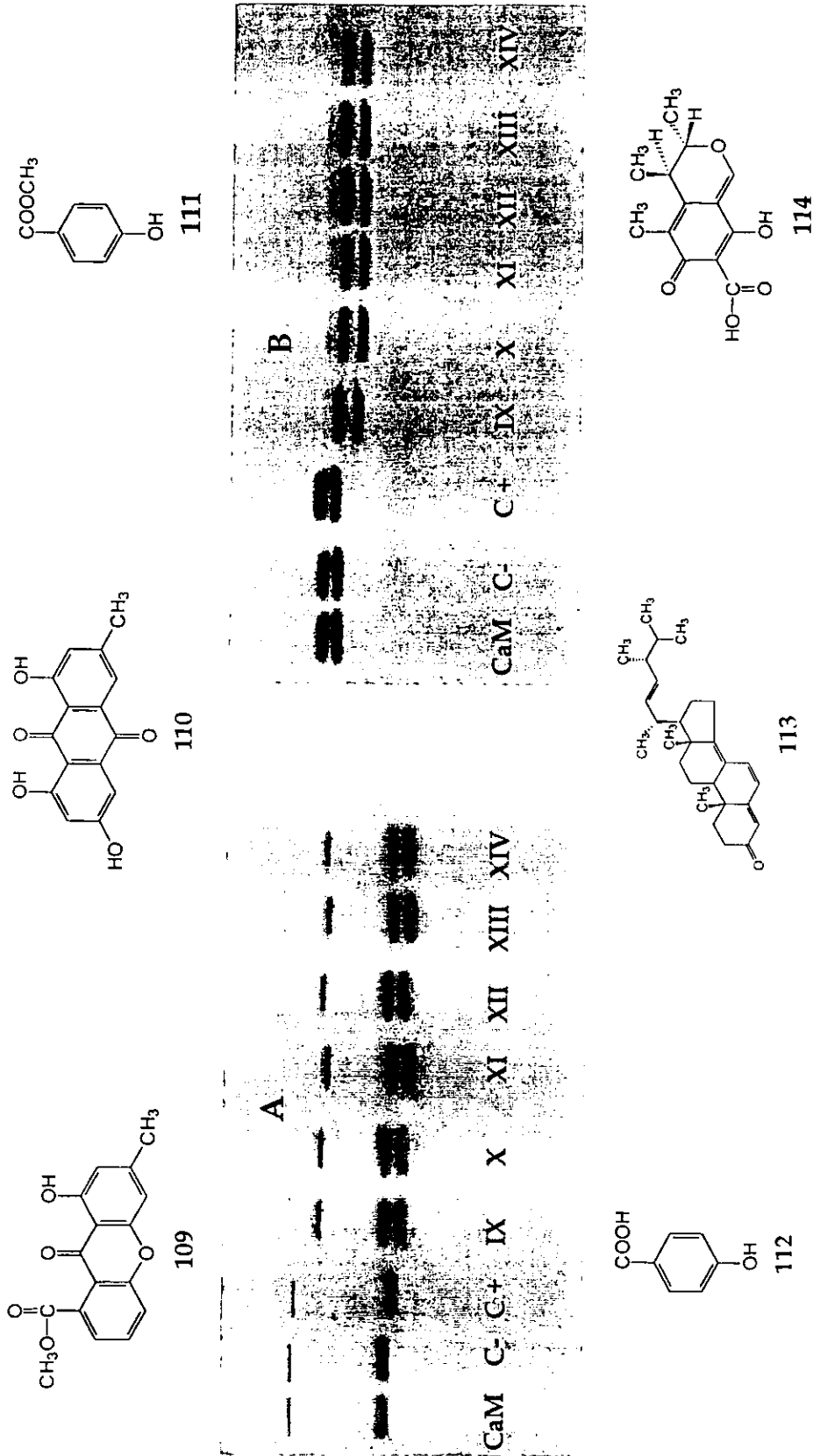
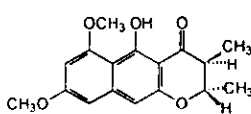
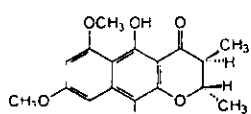
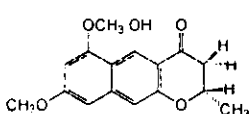
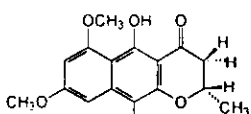
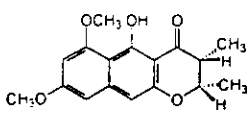


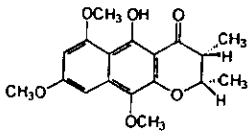
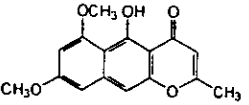
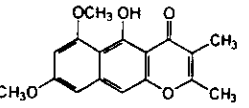
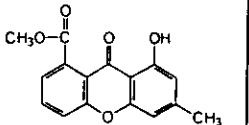
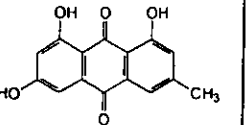
Figura 22. Electroforesis (SDS-PAGE 12%) en presencia de calmodulina de espinaca (A) y de cerebro de bovino (B) : 2 μg de calmodulina y 2 μL de EGTA 1 mM. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 °C. CaM (calmodulina), C- (DMSO), C + (0.033 μg/mL quercetina en DMSO), IX (109), X (110), XI (111), XII (112), XIII (113) y XVI (114). En todos los casos se aplicaron 0.033 μg/mL de compuesto en DMSO.

VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 41.** Cantidad de metabolito fitotóxico retenido en la columna de afinidad (agarosa-CaM de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales.

METABOLITO FITOTÓXICO	MICROGRAMOS DE COMPUESTO FITOTÓXICO RETENIDOS EN LA COLUMNA DE AGAROSA-CAM				
	DISOLUCIÓN I TRIS-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH=7.0	DISOLUCIÓN II TRIS-HCl 20 mM 1 mM EGTA pH=7.0	DISOLUCIÓN III TRIS-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH=8.0	DISOLUCIÓN IV NaCl 1M	DISOLUCIÓN V Urea 6M
 <p>(101)</p>	10.0 ± 0.0056	10.0 ± 0.0021	10.0 ± 0.0045	10.0 ± 0.0014	10.0 ± 0.0041
 <p>(102)</p>	10.0 ± 0.0089	10.0 ± 0.0033	10.0 ± 0.0074	10.0 ± 0.0022	10.0 ± 0.0021
 <p>(103)</p>	10.0 ± 0.0026	10.0 ± 0.0054	10.0 ± 0.0042	10.0 ± 0.0021	10.0 ± 0.0024
 <p>(104)</p>	10.0 ± 0.0051	10.0 ± 0.0048	10.0 ± 0.0041	10.0 ± 0.0081	10.0 ± 0.0021
 <p>(105)</p>	10.0 ± 0.0045	10.0 ± 0.0024	10.0 ± 0.0030	10.0 ± 0.0040	10.0 ± 0.0075

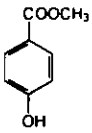
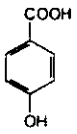
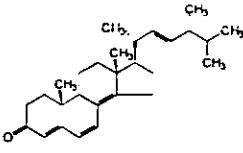
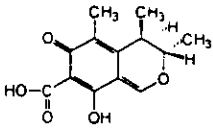
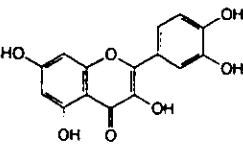
**Cuadro 41.** Cantidad de metabolito fitotóxico retenido en la columna de afinidad (agarosa-CaM de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales (continuación).

METABOLITO FITOTÓXICO	MICROGRAMOS DE COMPUESTO FITOTÓXICO RETENIDOS EN LA COLUMNA DE AGAROSA-CAM				
	DISOLUCIÓN I TRIS-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH=7.0	DISOLUCIÓN II TRIS-HCl 20 mM 1 mM EGTA pH=7.0	DISOLUCIÓN III TRIS-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH=8.0	DISOLUCIÓN IV NaCl 1M	DISOLUCIÓN V Urea 6M
 <p>(106)</p>	10.0 ± 0.0058	10.0 ± 0.0016	10.0 ± 0.0025	10.0 ± 0.0078	10.0 ± 0.0028
 <p>(107)</p>	10.0 ± 0.0019	10.0 ± 0.0089	10.0 ± 0.0049	10.0 ± 0.0047	10.0 ± 0.0084
 <p>(108)</p>	10.0 ± 0.0056	10.0 ± 0.0074	10.0 ± 0.0023	10.0 ± 0.0045	10.0 ± 0.0052
 <p>(109)</p>	10.0 ± 0.0059	2.8 ± 0.0058	2.8 ± 0.0019	0.0 ± 0.0021	0.0 ± 0.0045
 <p>(110)</p>	10.0 ± 0.0027	10.0 ± 0.0026	10.0 ± 0.0026	10.0 ± 0.0087	10.0 ± 0.0012

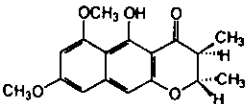
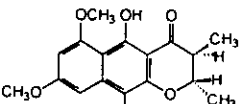
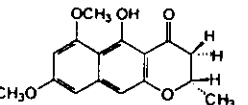
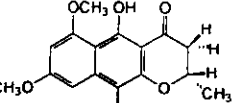
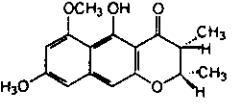


## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 41.** Cantidad de metabolito fitotóxico retenido en la columna de afinidad (agarosa-CaM de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales (continuación).

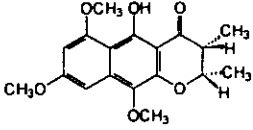
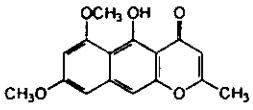
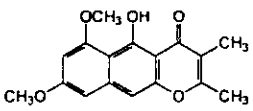
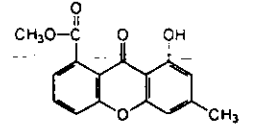
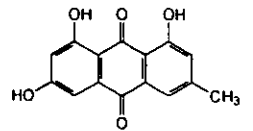
METABOLITO FITOTÓXICO	MICROGRAMOS DE COMPUESTO FITOTÓXICO RETENIDOS EN LA COLUMNA DE AGAROSA-CAM				
	DISOLUCIÓN I TRIS-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH=7.0	DISOLUCIÓN II TRIS-HCl 20 mM 1 mM EGTA pH=7.0	DISOLUCIÓN III TRIS-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH=8.0	DISOLUCIÓN IV NaCl 1M	DISOLUCIÓN V Urea 6M
 <p>(111)</p>	10.0 ± 0.0046	6.9 ± 0.0024	6.9 ± 0.0021	6.9 ± 0.0033	0.0 ± 0.0038
 <p>(112)</p>	10.0 ± 0.0088	7.1 ± 0.0018	7.1 ± 0.0022	7.1 ± 0.0038	0.0 ± 0.0050
 <p>(113)</p>	10.0 ± 0.0023	10.0 ± 0.0056	10.0 ± 0.0080	10.0 ± 0.0054	10.0 ± 0.0021
 <p>(114)</p>	6.0 ± 0.0074	6.0 ± 0.0052	6.0 ± 0.0074	6.0 ± 0.0045	6.0 ± 0.0027
 <p>Quercetina (115) (Control positivo)</p>	10.0 ± 0.0051	6.2 ± 0.0038	6.2 ± 0.0058	6.2 ± 0.0074	0.0 ± 0.0022

**Cuadro 42.** Cantidad total de fitotoxina retenida o liberada de la columna de afinidad (agarosa-CaM de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales.

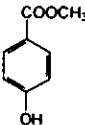
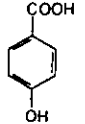
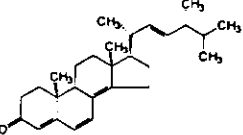
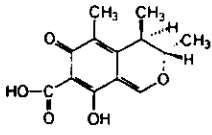
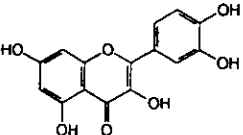
METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN TOTAL RETENIDA EN LA COLUMNA	CONCENTRACIÓN TOTAL LIBERADA DE LA COLUMNA	TIPO DE INTERACCIÓN
 <p>(101)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(102)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(103)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(104)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(105)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible

## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 42.** Cantidad total de fitotoxina retenida o liberada de la columna de afinidad (agarosa-CaM de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales (continuación).

METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN TOTAL RETENIDA EN LA COLUMNA	CONCENTRACIÓN TOTAL LIBERADA DE LA COLUMNA	TIPO DE INTERACCIÓN
 <p>(106)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(107)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(108)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(109)</p>	0.0 µg	10 µg	100 % Reversible
 <p>(110)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible

**Cuadro 42.** Cantidad total de fitotoxina retenida o liberada de la columna de afinidad (agarosa-CaM de cerebro de bovino) después de eluir en diferentes condiciones experimentales (continuación).

METABOLITO FITOTÓXICO	CONCENTRACIÓN TOTAL RETENIDA EN LA COLUMNA	CONCENTRACIÓN TOTAL LIBERADA DE LA COLUMNA	TIPO DE INTERACCIÓN
 <p>(111)</p>	0.0 µg	10 µg	100 % Reversible
 <p>(112)</p>	0.0 µg	10 µg	100 % Reversible
 <p>(113)</p>	10 µg	0.0 µg	100 % Irreversible
 <p>(114)</p>	6.0 µg	4.0 µg	60 % Irreversible
 <p>Quercetina (115) (Control Positivo)</p>	0.0 µg	10 µg	100 % Reversible

## VI. Resultados y Discusión.

### 6.3 Determinación del efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM.

Los experimentos anteriores permitieron establecer que las fitotoxinas interaccionan con CaM. Sin embargo, los mismos no indican si esta interacción afecta las propiedades reguladoras enzimáticas de la CaM.

Para determinar si las fitotoxinas afectan la habilidad de la CaM para interaccionar con sus proteínas blanco, se determinó el efecto de los productos naturales sobre la actividad moduladora de la CaM empleando como enzima de prueba a la NAD cinasa dependiente de CaM (complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-NAD cinasa) purificada parcialmente de chícharo. Esta enzima se seleccionó como proteína blanco debido a que es modulada por CaM sólo en vegetales Lee *et al.*, 1995, 1999, 2000; Liao *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998). Por otro lado, el hallazgo reciente de que esta enzima es activada exclusivamente por algunas de las isoformas de la CaM *in vitro* la hacen un blanco altamente específico para agentes herbicidas potenciales (Lee *et al.*, 1995, 1999, 2000; Liao *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998).

La estrategia experimental utilizada para determinar si los metabolitos fúngicos afectan las propiedades reguladoras de la CaM fue estandarizada como parte del desarrollo del presente trabajo. El procedimiento comprende cuatro fases:

- a) Purificación parcial de la enzima NAD cinasa a partir de plántulas de chícharo.
- b) Determinación de la viabilidad del preparado enzimático en presencia de diferentes concentraciones de CaM (de espinaca y de cerebro de bovino).
- c) Determinación del efecto de las fitotoxinas sobre las actividades de las enzimas NAD cinasa en ausencia de CaM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esta última enzima se emplea en un ensayo enzimático acoplado para determinar la actividad de la enzima NAD cinasa.
- d) Evaluación de la habilidad de las fitotoxinas para inhibir el efecto modulador enzimático de la CaM.

A continuación se describen en detalle los resultados obtenidos en cada una de ellas.

### **6.3.1 Purificación parcial de la enzima NAD cinasa.**

El crudo proteínico conteniendo la actividad de la enzima NAD cinasa, libre de CaM endógena, se obtuvo de acuerdo con el método de Harmon (Harmon *et al.*, 1984) a partir de plántulas de chícharo germinadas durante 14 días. La cantidad de proteínas totales se cuantificó de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando 10  $\mu$ L de extracto. La densidad óptica obtenida se interpoló en una curva estándar de albúmina sérica bovina (Cuadro 8 sección experimental). En el Cuadro 9 (sección experimental) se indica el contenido proteínico de cada uno de los extractos semi purificados con actividad de NAD cinasa utilizados en este bioensayo.

### **6.3.2 Viabilidad de la preparación enzimática.**

Una vez que se cuantificó el contenido de proteínas se procedió a verificar la viabilidad del extracto enzimático, utilizando diferentes concentraciones de CaM de espinaca o de cerebro de bovino (0.5-3.0  $\mu$ g de proteína), en presencia de concentraciones saturantes de NAD y ATP.

La actividad de la enzima se correlaciona con la velocidad de formación del NADP. La velocidad de formación del NADP se determina midiendo la velocidad de su conversión en NADPH por acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de glucosa-6-fosfato. A su vez, la velocidad de formación del NADPH se cuantificó midiendo la disminución de la absorbancia a 600 nm en función del tiempo en presencia de dos colorantes redox, el 2,6-

## VI. Resultados y Discusión.

dicloroindolfenol y el metasulfato de fenazina. La velocidad de formación de NADPH es proporcional a la cantidad de NADP (NADPH) presente en el medio de reacción. En la Figura 23 se resumen las reacciones enzimáticas acopladas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima NAD cinasa y en la Figura 24 se presenta un ejemplo de las curvas obtenidas al cuantificar espectrofotométricamente la concentración de NADPH presente en el medio de la reacción, en presencia de diversas concentraciones de CaM de espinaca.

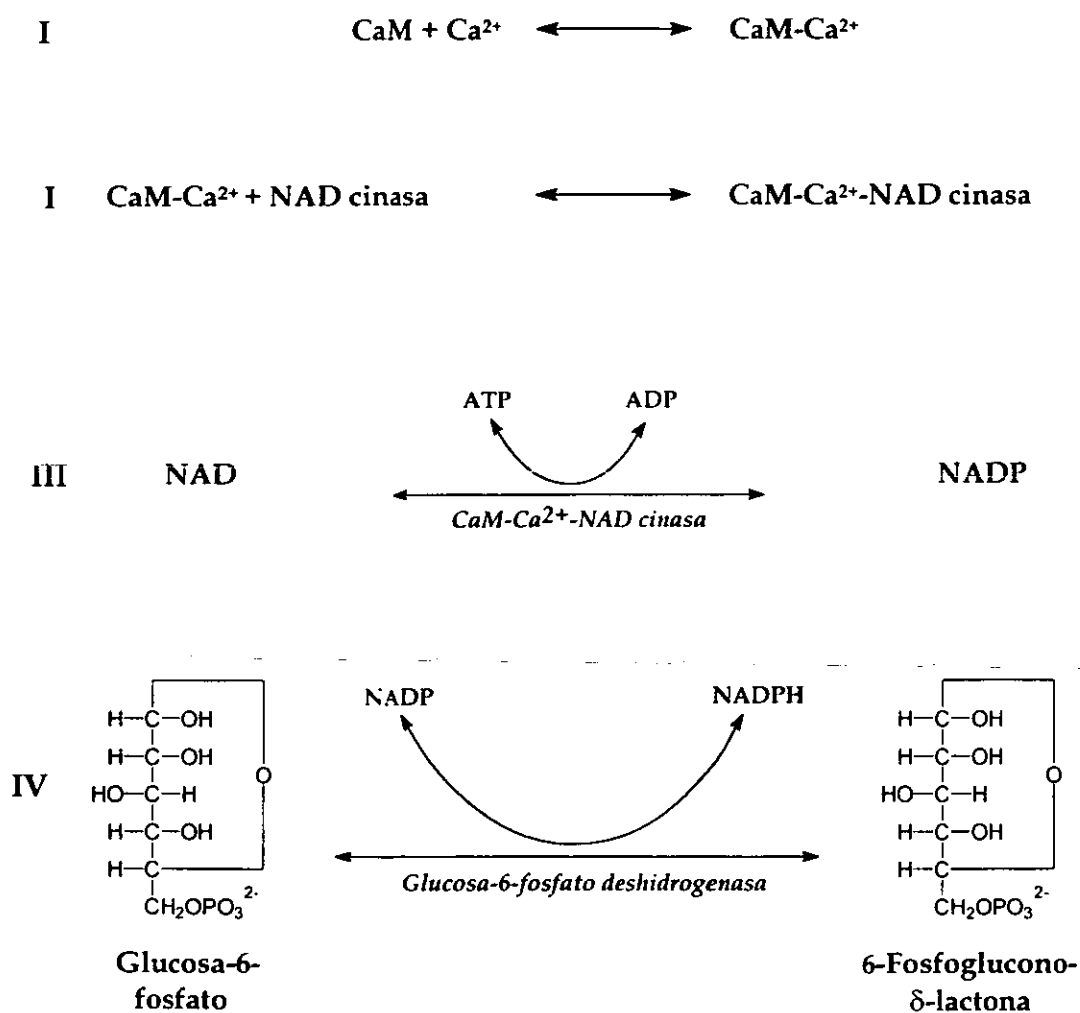
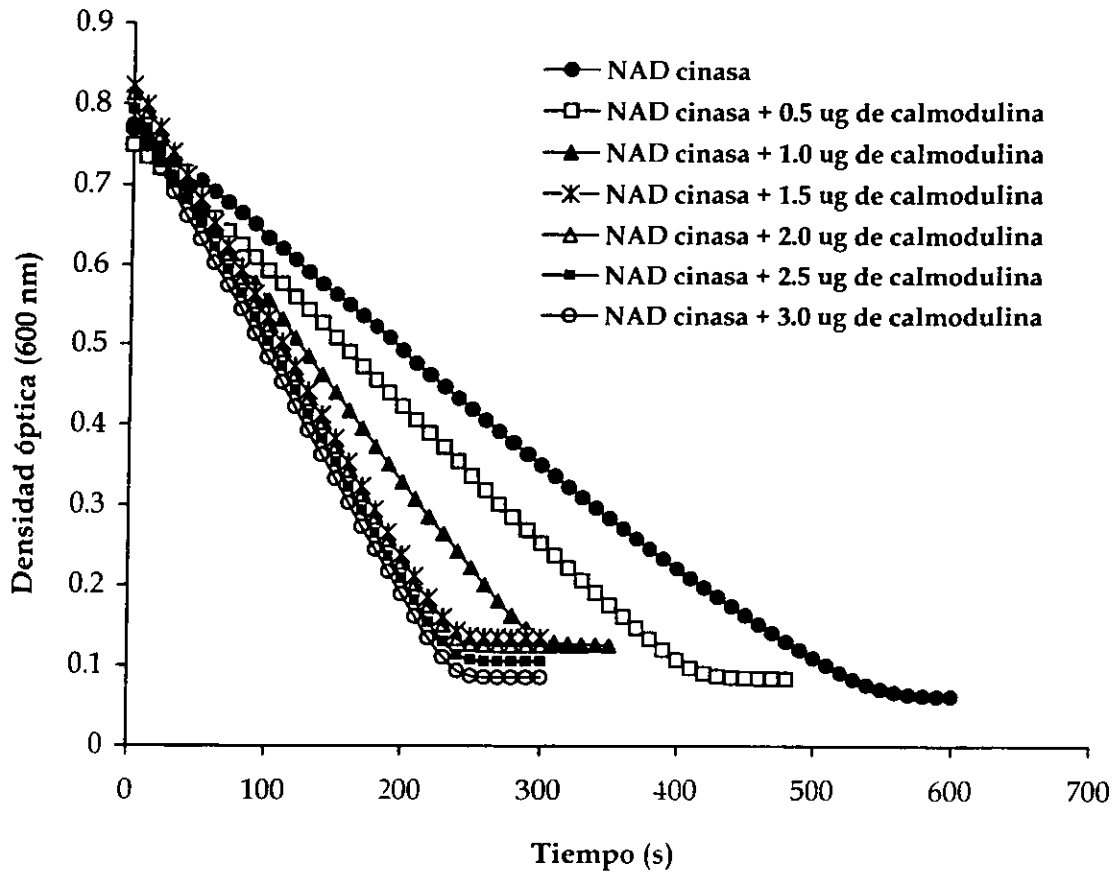


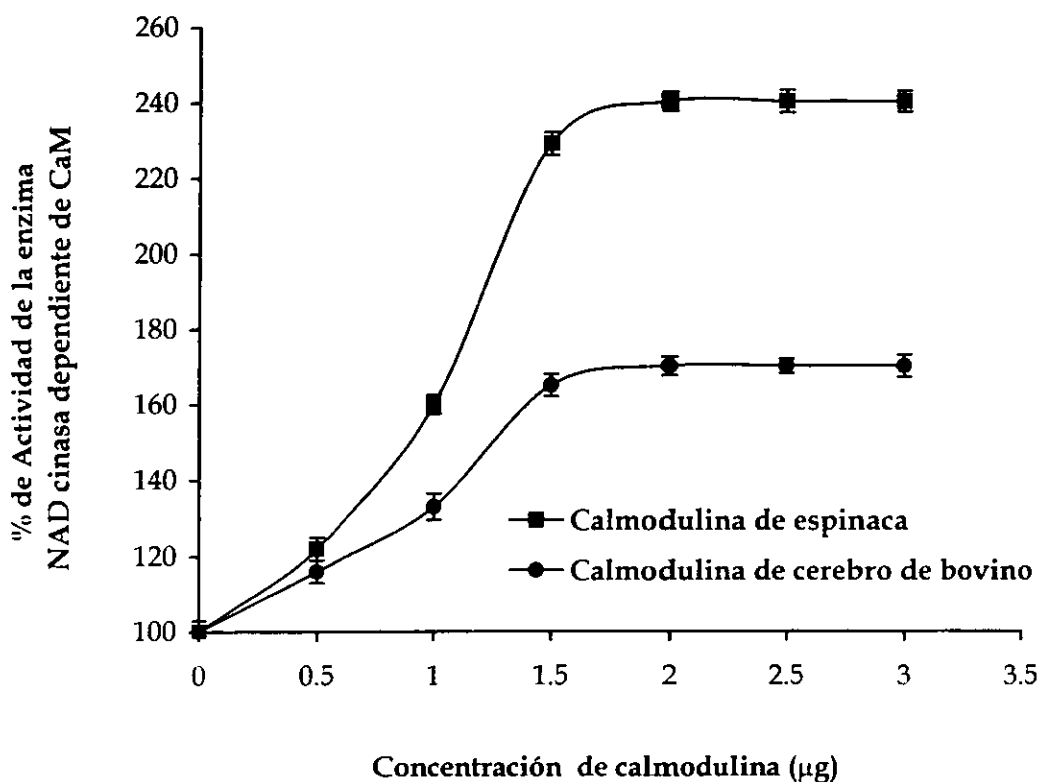
Figura 23. Reacciones bioquímicas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM.



**Figura 24.** Efecto de la concentración de CaM de espinaca, sobre la actividad de la enzima NAD cinasa de chícharo. Cada punto representan la media de tres réplicas independientes.

La interpolación de la constante de rapidez obtenida en cada caso en una curva patrón de NADP (Figuras 8 y 9; Sección experimental), permitió determinar cuantitativamente la concentración de NADPH (NADP) generado y, por ende, la actividad de la enzima NAD cinasa en cada tratamiento (mM de NADP/min). En la Figura 25 se muestran los porcentajes de activación de la enzima NAD cinasa en presencia de diferentes concentraciones de CaM de espinaca o de cerebro de bovino. La proteína vegetal estimuló en un 230 % la actividad de la enzima NAD cinasa, en tanto que, la CaM de cerebro de bovino en un 160 %.



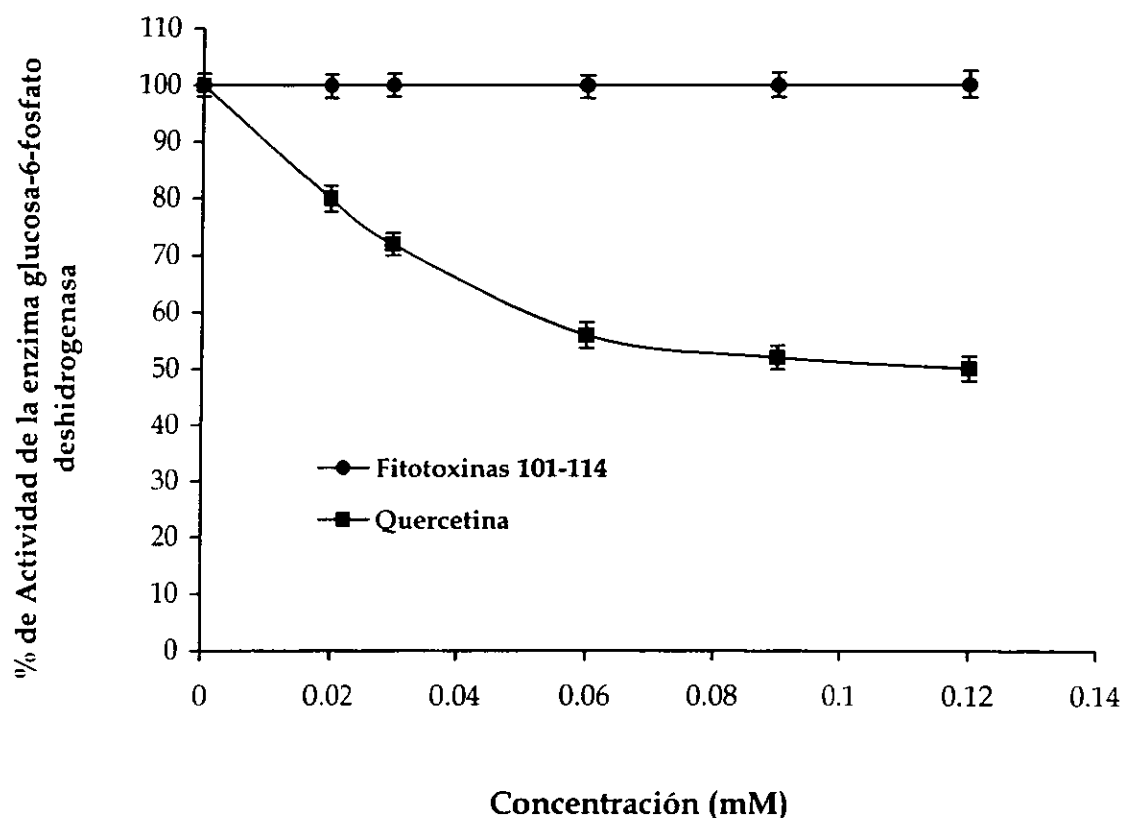


**Figura 25.** Actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia de diferentes concentraciones de CaM de espinaca o de cerebro de bovino y ATP (3 mM) y NAD (2mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

### **6.3.3 Efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de las enzimas NAD cinasa en ausencia de CaM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.**

El efecto de las diferentes fitotoxinas sobre las actividades de las enzimas NAD cinasa en ausencia de CaM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se determinó con la finalidad de descartar un efecto directo de la fitotoxinas sobre ambas enzimas.

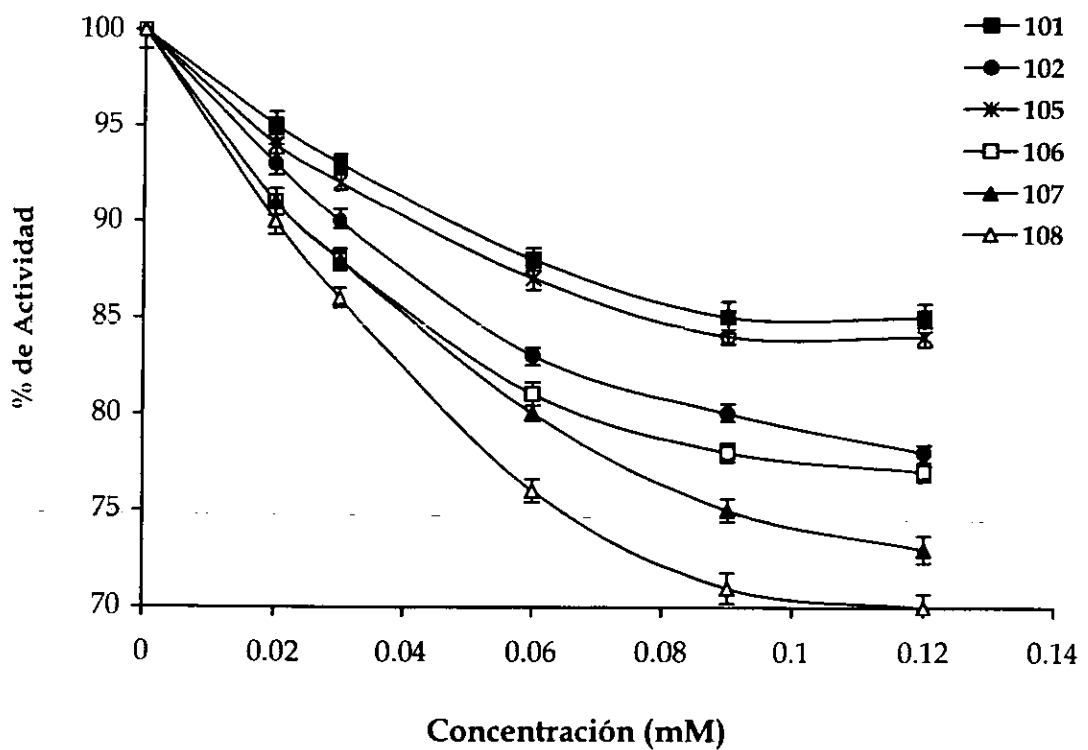
Los resultados de estas evaluaciones indicaron que ninguna de las fitotoxinas afecta la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La quercetina utilizada como un control positivo en los experimentos de electroforesis inhibe en un 50 % la actividad de este enzima a la máxima concentración de prueba utilizada ( $1.2 \times 10^{-4}$  M). En la Figura 26 se representan los resultados de esta evaluación.



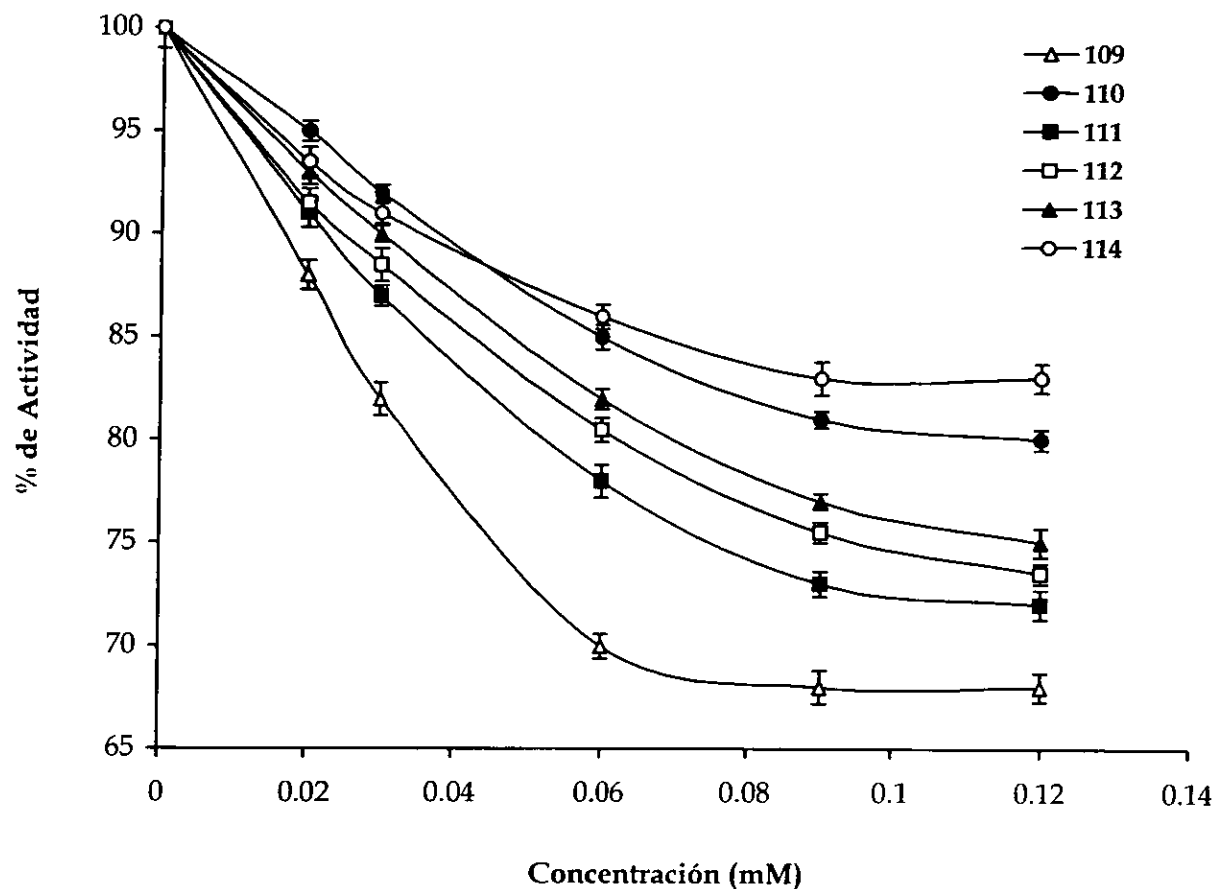
**Figura 26.** Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 101-114 o de quercetina. Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

## VI. Resultados y Discusión.

En las Figuras 27 y 28 se presentan los porcentajes de actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM y en presencia de los compuesto fitotóxicos evaluados. A excepción de las 2,3-dihidronaftopironas 103 y 104, las fitotoxinas restantes no interfieren significativamente con la actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM, observándose en general una inhibición de 20 a 30 % a la máxima concentración estudiada ( $1.2 \times 10^{-4}$  M). En los Cuadros 43 y 44 se indican los porcentajes de inhibición alcanzados por los metabolitos fitotóxicos sobre la actividad de las enzimas estudiadas a la máxima concentración utilizada y los valores de  $CI_{50}$  (M), respectivamente.



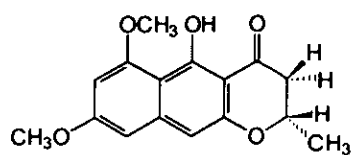
**Figura 27.** Actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos fitotóxicos 101, 102, y 105-108 y concentraciones saturantes ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.



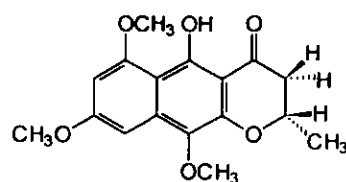
**Figura 28.** Actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos fitotóxicos 109-114 y concentraciones saturantes ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

Con respecto al efecto de los metabolitos fitotóxicos 103 y 104 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM, en la Figura 29 se observa que estas 2,3-dihidronaftopironas inhiben drásticamente la actividad de la cinasa alcanzando en ambos casos un 100 % de inhibición. La dihidronaftopirona 104 ( $CI_{50}$  0.026 mM), con un grupo metoxilo adicional en la posición C-10, es mucho más activa que el compuesto 103 ( $CI_{50}$  0.048mM).

## VI. Resultados y Discusión.

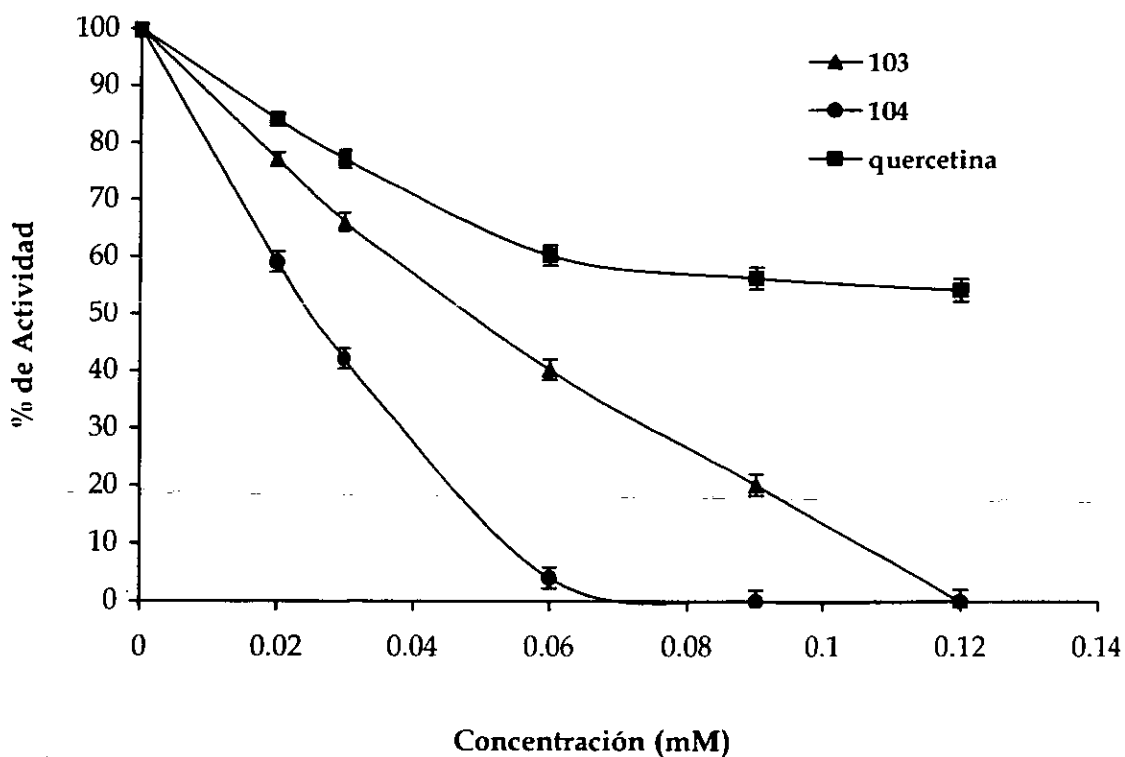


(103)



(104)

Por otra parte, en la Figura 29 también se presenta el efecto de la quercetina la cual inhibe en 46 % la actividad de la cinasa a una concentración de  $1.2 \times 10^{-4}$  M.



**Figura 29.** Actividad de la enzima NAD en ausencia de CaM y en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **103**, **104** o de quercetina y de concentraciones saturantes de ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

**6.3.4 Efecto de las fitotoxinas sobre la habilidad de la CaM para activar la enzima NAD cinasa dependiente de CaM.**

El análisis del efecto de las fitotoxinas sobre la actividad de la NAD cinasa en presencia de CaM de espinaca o cerebro de bovino permitió clasificar a las fitotoxinas en cuatro grupos. El primero incluye a los compuestos que demostraron un efecto inhibitorio selectivo sobre la activación de la NAD cinasa en presencia de CaM de espinaca. Este grupo está representado por los compuestos 101, 102, 105 y 106. El segundo grupo, está integrado por las fitotoxinas 109, 110 y 113, que presentaron un efecto inhibitorio indistinto sobre la capacidad de la CaM (vegetal o animal) para activar la NAD cinasa. En el tercer grupo se ubican los metabolitos fitotóxicos 107, 108, 111 y 112, que demostraron un efecto inhibitorio sobre la activación de la cinasa en presencia de CaM de espinaca y un efecto estimulante sobre la actividad de la enzima en presencia de CaM de cerebro de bovino. Por último, el cuarto grupo incluye a la citrinina (114), que no presentó un efecto inhibitorio significativo sobre la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia de ambos tipos de CaM.

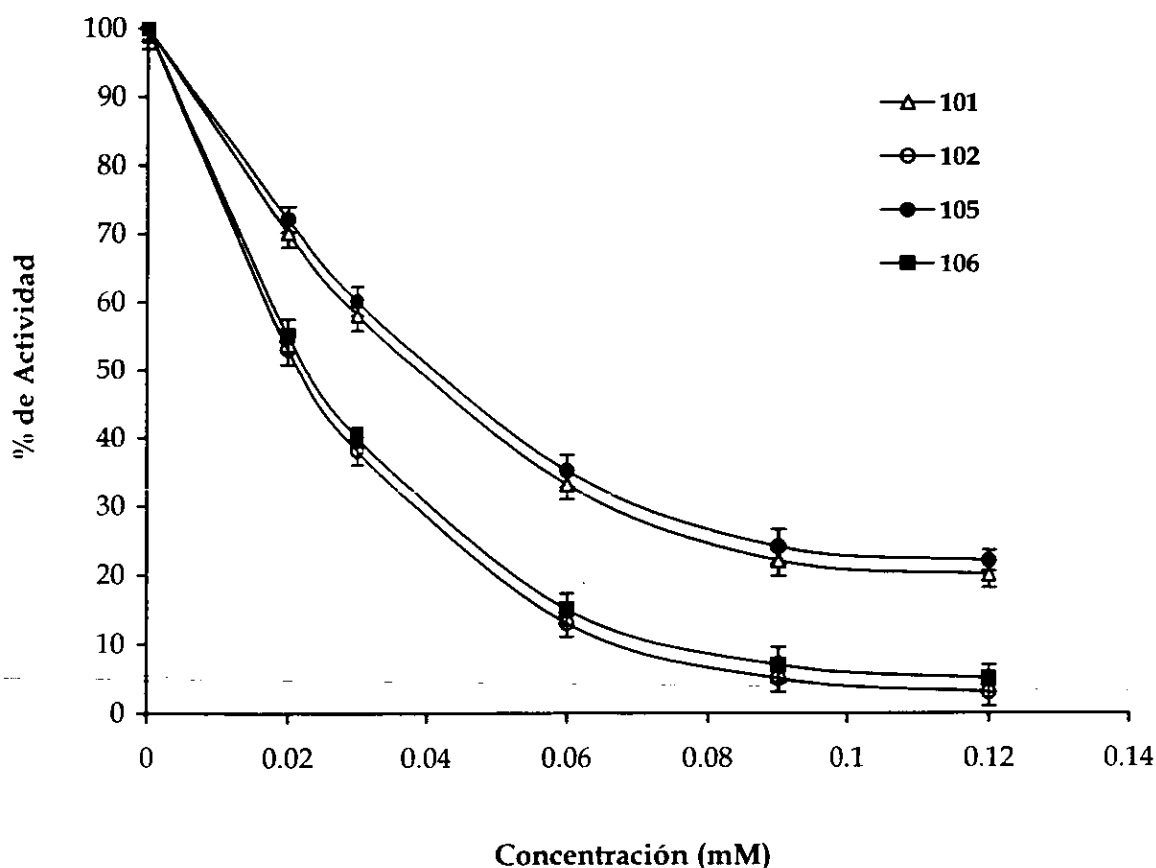
En el Cuadro 43 se indica la máxima inhibición provocada por las fitotoxinas sobre la actividad de las enzimas NAD cinasa (en ausencia y en presencia de calmodulina) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. De manera adicional, en los Cuadros 44 y 45 se incluyen los valores de  $CI_{50}$  y la cantidad de NADP (mM de NADP/min) producido en presencia de los compuestos a la máxima concentración empleada, respectivamente.

**6.3.4.1 Efecto de los compuestos 101, 102, 105 y 106 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia CaM de espinaca y de cerebro de bovino.**

En la Figura 30 se presenta el efecto de los compuestos fitotóxicos 101, 102, 105 y 106 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de CaM de

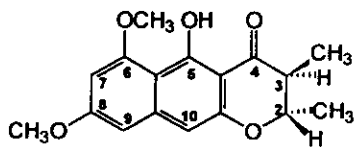
## VI. Resultados y Discusión.

espinaca. En esta misma Figura se observa que todos los compuestos inhiben la activación de la cinasa en forma creciente en el intervalo de concentraciones de  $2.0 \times 10^{-5}$  a  $1.2 \times 10^{-4}$  M. Los compuestos 102 y 106 alcanzan aproximadamente un 100 % de inhibición a la máxima concentración evaluada, y los metabolitos 101 y 105 inhiben alrededor de un 80 % la actividad de la cinasa en presencia de CaM de espinaca.

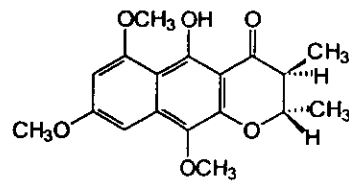


**Figura 30.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 101, 102, 105 y 106 y de concentraciones saturantes de CaM de espinaca ( $2\mu\text{g}$ ), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

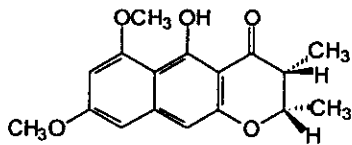
El efecto de los metabolitos secundarios sobre la capacidad de la proteína CaM de cerebro de bovino para activar la enzima NAD cinasa es mucho menor. En la Figura 31 se presenta el efecto de los metabolitos (101, 102, 105 y 106) sobre la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de CaM de cerebro de bovino.



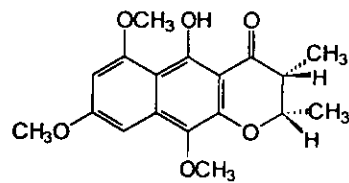
(101)



(102)



(105)

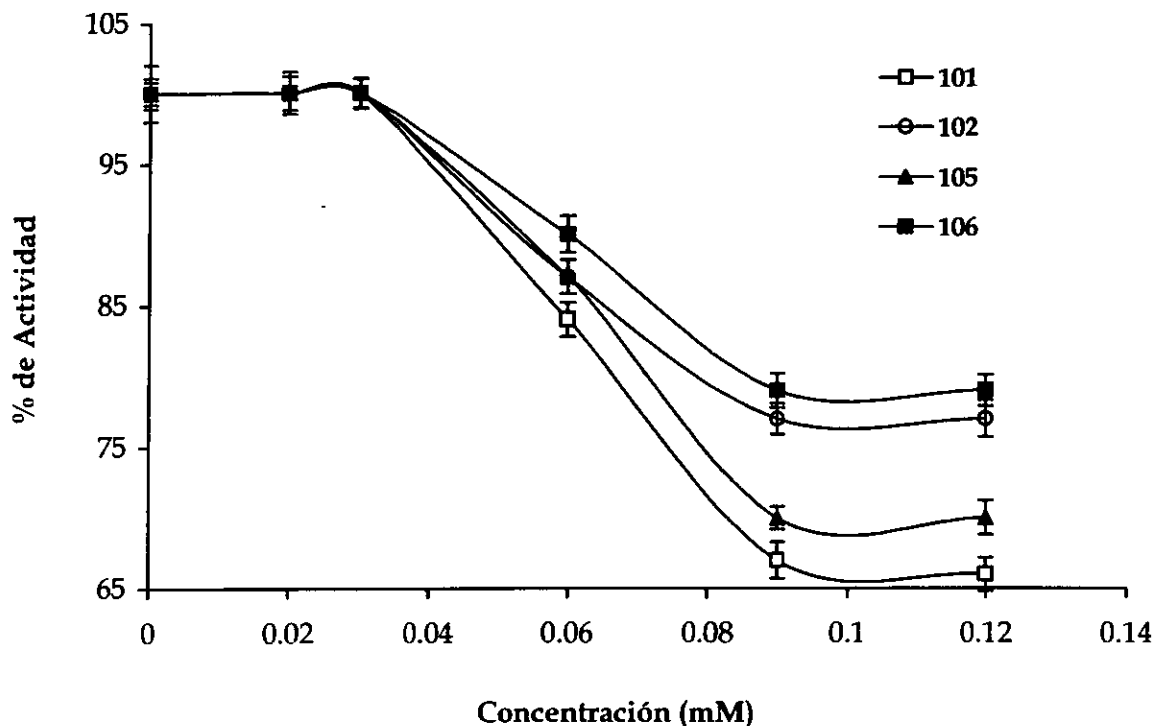


(106)

Con base en los resultados presentados en las Figuras 30 y 31, se puede concluir que las 2,3-dihidronaftopironas 102 y 106 son inhibidores de la propiedades moduladoras de la CaM vegetal. Sin embargo, cuando la proteína animal fue empleada como activador las fitotoxinas no provocaron una modificación apreciable de la actividad de la enzima NAD cinasa; por lo que estos productos naturales parecen ser inhibidores específicos de CaM vegetal.



## VI. Resultados y Discusión.

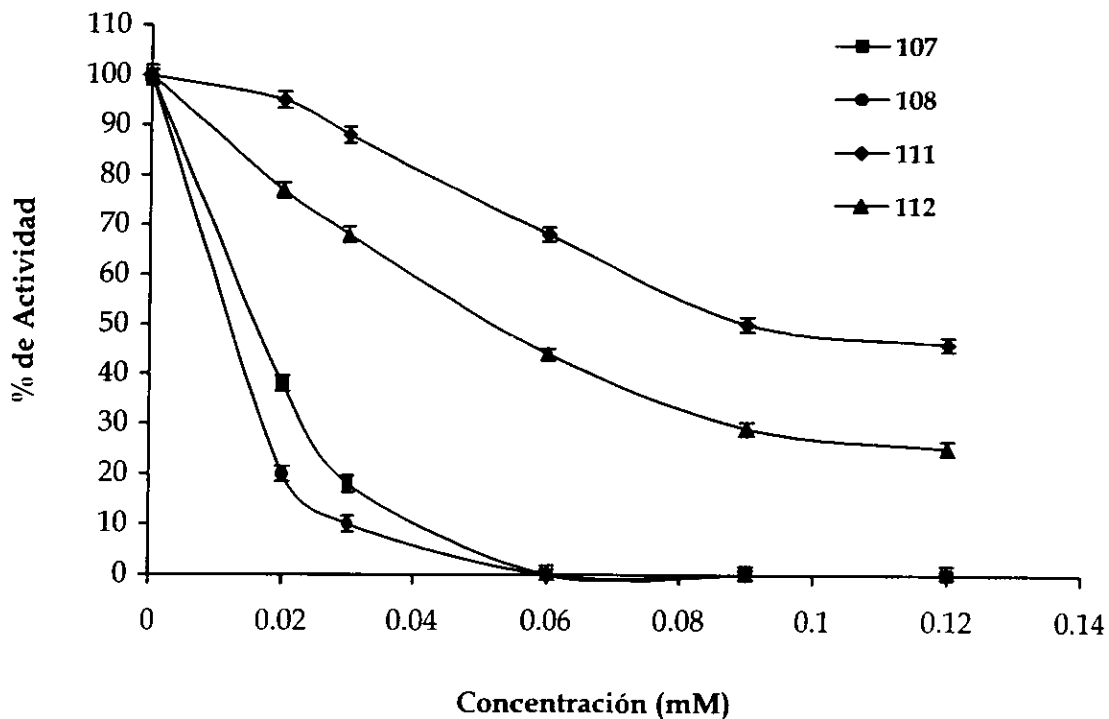
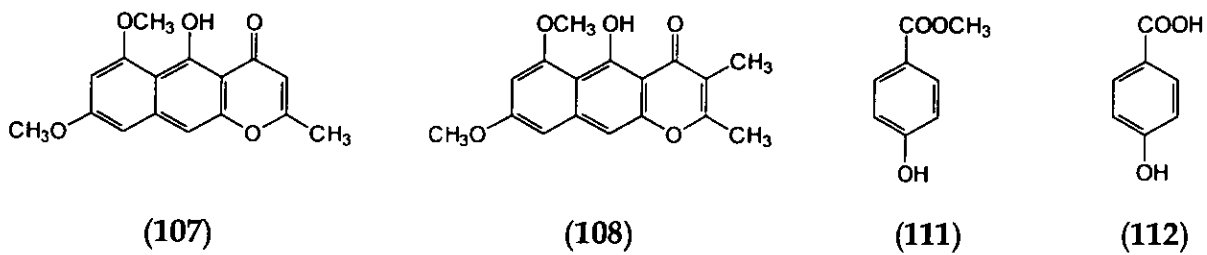


**Figura 31.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 101, 102, 105 y 106 y de concentraciones saturantes de CaM de cerebro de bovino (2 $\mu$ g), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

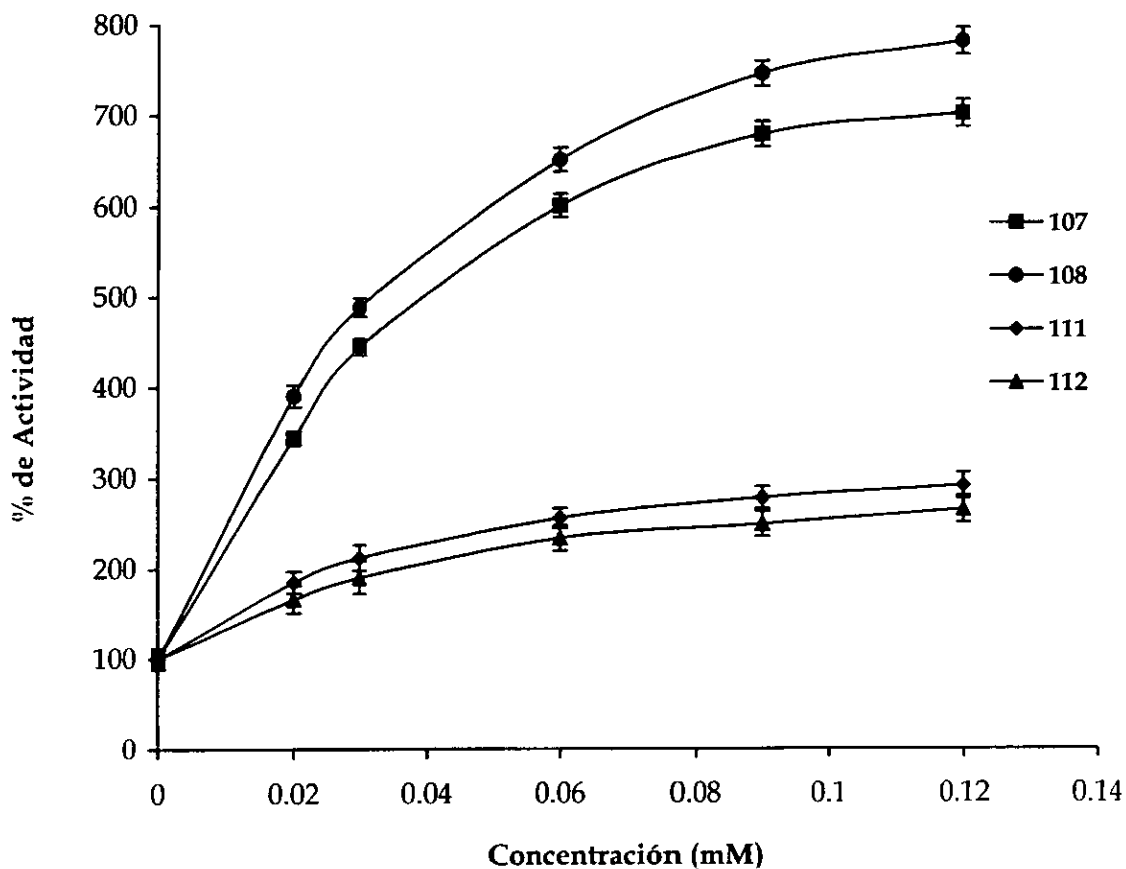
### 6.3.4.2 Efecto de los compuestos 107, 108, 111 y 112 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia CaM de espinaca y de cerebro de bovino.

Las naftopironas 107 y 108 indujeron una inhibición de la actividad enzimática de la NAD cinasa en presencia de CaM de espinaca, provocando 100% de inhibición a una concentración de  $6.0 \times 10^{-5}$  M. La rubrofusarina (107) inhibe en 82% la actividad de la enzima NAD cinasa a una concentración molar de  $3.0 \times 10^{-5}$ , en tanto que a la misma concentración, el compuesto 108 inhibe en 90 % la actividad de la cinasa. Los porcentajes de máxima inhibición de la actividad de la enzima en presencia de las fitotoxinas 111 y 112 fueron del 54 % y del 75%, respectivamente (Figura 32).

Los compuestos **107** y **108** presentan un efecto estimulante de la actividad de la NAD cinasa en presencia de CaM de cerebro de bovino. Así la rubrofusarina (**107**) provoca una activación de un 700 % y la naftopirona **108** de un 780 %. Las fitotoxinas **111** y **112** provocaron un efecto similar (Figura 33).



**Figura 32.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas **107**, **108**, **111**, y **112** y de concentraciones saturantes de CaM de espinaca (2 $\mu$ g), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

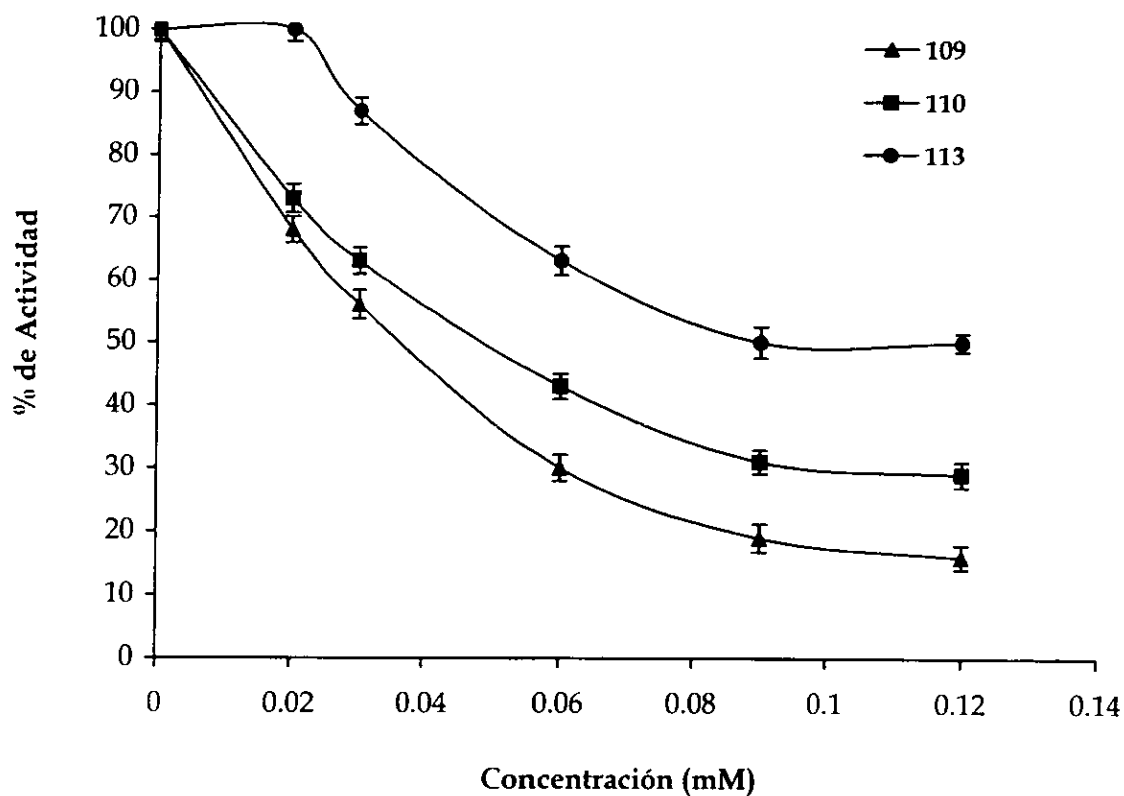


**Figura 33.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 107, 108, 111, y 112 y de concentraciones saturantes de CaM de cerebro de bovino (2 $\mu$ g), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

**6.3.4.3 Efecto de los compuestos 109, 110 y 113 sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia CaM de espinaca y de cerebro de bovino.**

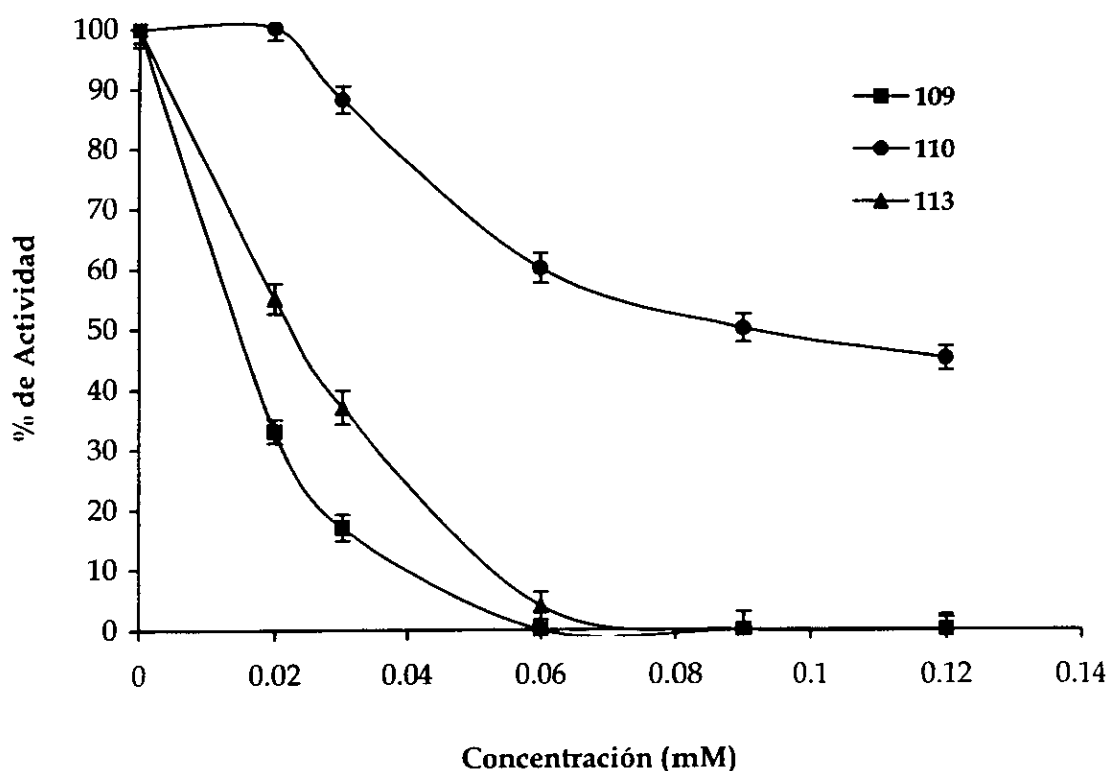
En las Figuras 34 y 35 se presenta el efecto de la 8-hidroxi-6-metil-1-metoxycarbonil-xantona (109), de la emodina (110) y del ergosta-4,6,8 [14], 22-teraen-3-ona (113) sobre la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de

CaM de espinaca y de cerebro de bovino, respectivamente. Estas Gráficas indican que estas fitotoxinas inhibieron las propiedades activadoras tanto de la proteína animal como de la vegetal. La 8-hidroxi-6-metil-1-metoxicarbonil-xantona (109) demostró el mayor efecto inhibitorio sobre la capacidad de la proteína CaM, tanto de origen animal como vegetal, para activar la enzima NAD cinasa. Los compuestos 109, 110 y 113 se pueden considerar como inhibidores de la CaM vegetal y animal.



**Figura 34.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 109, 110, y 113 y de concentraciones saturantes de CaM de espinaca (2 $\mu$ g), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

## VI. Resultados y Discusión.

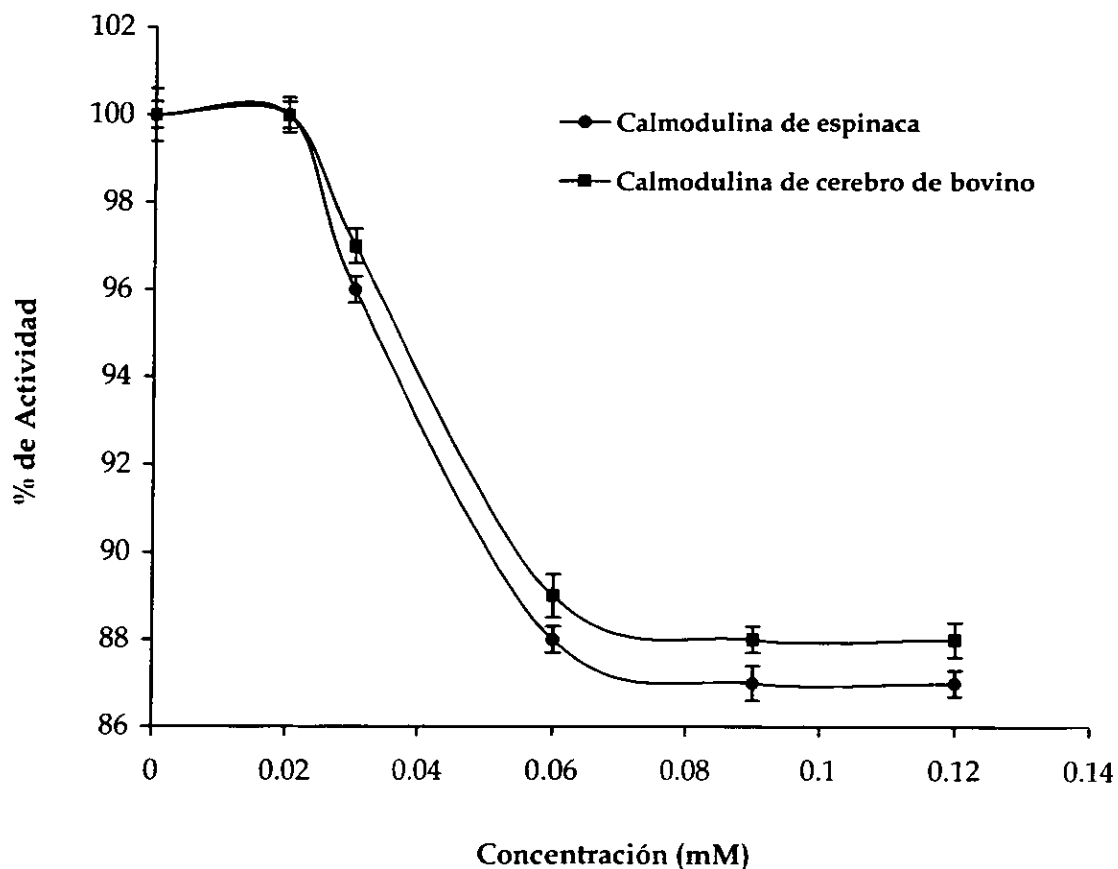


**Figura 35.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de las fitotoxinas 109, 110, y 113 y de concentraciones saturantes de CaM de cerebro de bovino (2 $\mu$ g), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

### *6.3.4.4 Efecto de la citrinina (114) sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia de CaM de espinaca y de cerebro de bovino.*

En la Figura 36 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la citrinina (114) sobre la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM en presencia de CaM de espinaca y de cerebro de bovino. Los resultados obtenidos indican claramente que la citrinina (114) no afecta significativamente la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de las dos CaMs.

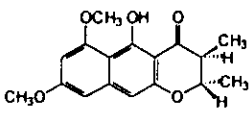
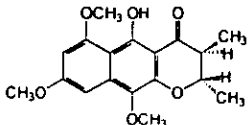
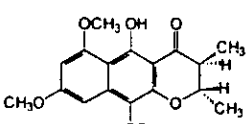
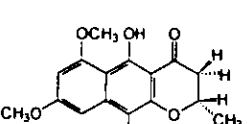
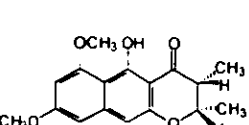
Los porcentajes de máxima inhibición de la actividad enzimática en presencia de CaM de espinaca y de cerebro de bovino fueron del 13 % y de 11%, respectivamente.



**Figura 36.** Actividad de la enzima NAD en presencia de diferentes concentraciones de citrulina (114) y de concentraciones saturantes de CaM (2 μg), ATP (3 mM) y NAD (2 mM). Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas independientes.

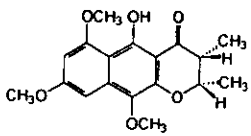
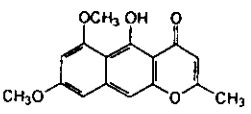
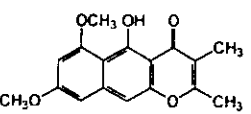
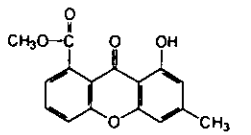
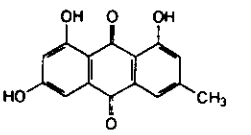
## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 43.** Porcentajes de máxima inhibición de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de  $1.2 \times 10^{-4}$  M de fitotoxina (máxima concentración utilizada).

METABOLITO	% DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM Y DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(101)</p>	80.0 %	14.0 %	15.0%	0.0 %
 <p>(102)</p>	97.0 %	23.0 %	20.0 %	0.0 %
 <p>(103)</p>	N.D*	N.D*	100.0 %	0.0 %
 <p>(104)</p>	N.D*	N.D*	100.0 %	0.0 %
 <p>(105)</p>	78.0 %	30.0 %	16.0%	33.34 %

\*N.D Efecto no determinado.

**Cuadro 43.** Porcentajes de máxima inhibición de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de  $1.2 \times 10^{-4}$  M de fitotoxina (máxima concentración utilizada) [continuación].

METABOLITO	% DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM Y DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(106)</p>	95.0 %	21.0 %	22.0 %	0.0 %
 <p>(107)</p>	100 %	0.0% , 700** %	27.0 %	0.0 %
 <p>(108)</p>	100.0 %	0.0% , 780** %	30.0 %	0.0 %
 <p>(109)</p>	84.0 %	100.0 %	32.0 %	0.0 %
 <p>(110)</p>	71.0 %	55.0 %	20.0 %	0.0 %

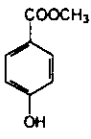
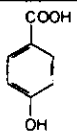
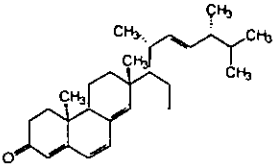
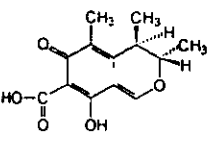
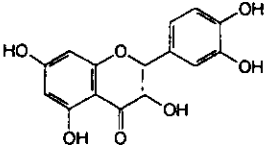
\*N.D Efecto no determinado.

\*\*% De activación sobre la actividad del complejo enzimático NAD cinasa-CaM de cerebro de bovino.



## VI. Resultados y Discusión.

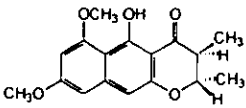
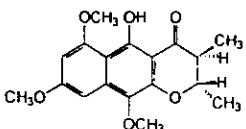
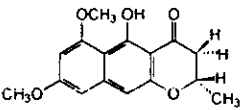
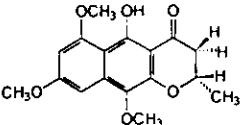
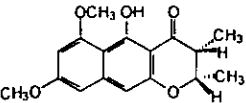
**Cuadro 43.** Porcentajes de máxima inhibición de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de  $1.2 \times 10^{-4}$  M de fitotoxina (máxima concentración utilizada) [continuación].

METABOLITO	% DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM Y DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(111)</p>	54.0 %	0.0 %, 290.0 %**	28.0 %	13.26 %
 <p>(112)</p>	75.0 %	0.0 %, 264.0 %**	26.5 %	0.0 %
 <p>(113)</p>	50.0 %	100.0 %	25.0 %	0.0 %
 <p>(114)</p>	13.0 %	11.0 %	17.0 %	0.0 %
 <p>quercetina (115) (Control positivo)</p>	N.D*	N.D*	46.0 %	50.0 %

\*N.D Efecto no determinado.

\*\*% De activación sobre la actividad del complejo enzimático NAD cinasa-CaM de cerebro de bovino.

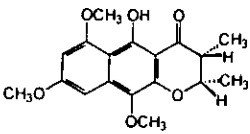
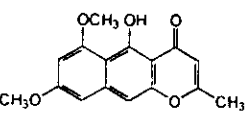
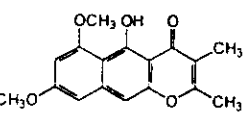
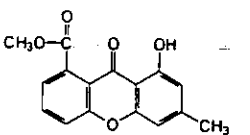
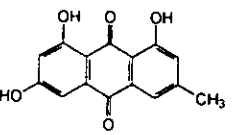
**Cuadro 44.** Concentración inhibitoria media de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

METABOLITO	CI <sub>50</sub> DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM Y DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(101)</p>	0.040 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(102)</p>	0.022 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(103)</p>	N.D*	N.D*	0.048 mM	N.D*
 <p>(104)</p>	N.D*	N.D*	0.026 mM	N.D*
 <p>(105)</p>	0.042 mM	N.D*	N.D*	N.D*

\*N.D Efecto no determinado.

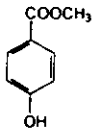
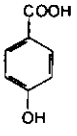
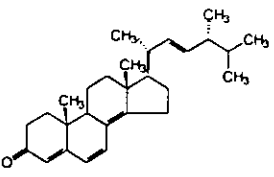
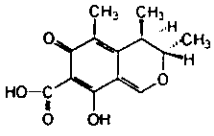
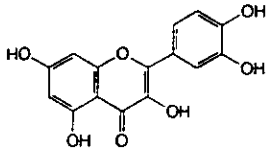
VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 44.** Concentración inhibitoria media de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (continuación).

METABOLITO	CI <sub>50</sub> DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM Y DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(106)</p>	0.024 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(107)</p>	0.017 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(108)</p>	0.013 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(109)</p>	0.036 mM	0.016 mM	N.D*	N.D*
 <p>(110)</p>	0.048 mM	0.090 mM	N.D*	N.D*

\*N.D Efecto no determinado.

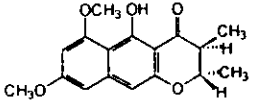
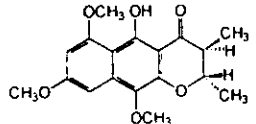
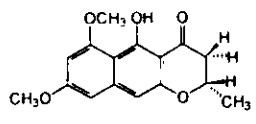
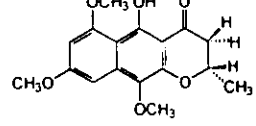
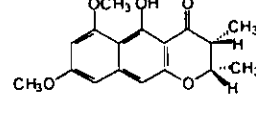
**Cuadro 44.** Concentración inhibitoria media de la actividad de la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (continuación).

METABOLITO	CI <sub>50</sub> DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM Y DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(111)</p>	0.090 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(112)</p>	0.052 mM	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>(113)</p>	0.090 mM	0.025 mM	N.D*	N.D*
 <p>(114)</p>	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
 <p>quercetina (115) (Control positivo)</p>	N.D*	N.D*	N.D*	0.120 mM

\*N.D Efecto no determinado.

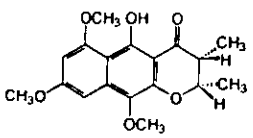
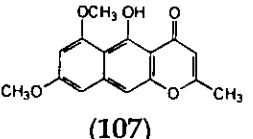
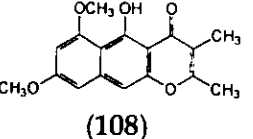
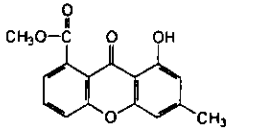
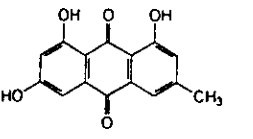
## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 45.** Concentración máxima de NADP producida por la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de las fitotoxinas aisladas.

METABOLITO	mM de NADP/min EN PRESENCIA DE $1.2 \times 10^{-4}$ M DE FITOTOXINA (MÁXIMA CONCENTRACIÓN UTILIZADA).			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
CONTROL	$3.0 \times 10^{-3}$	$2.1 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <b>(101)</b>	$6.0 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-3}$	$7.6 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <b>(102)</b>	$9.0 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-3}$	$7.2 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <b>(103)</b>	N.D*	N.D*	0.0	$5.0 \times 10^{-3}$
 <b>(104)</b>	N.D*	N.D*	0.0	$5.0 \times 10^{-3}$
 <b>(105)</b>	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$7.5 \times 10^{-4}$	$7.5 \times 10^{-4}$

\*N.D Efecto no determinado.

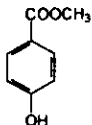
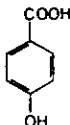
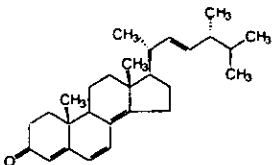
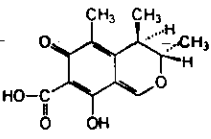
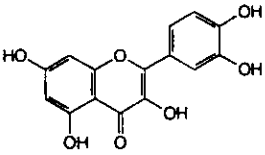
**Cuadro 45.** Concentración máxima de NADP producida por la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de las fitotoxinas aisladas (concentración).

METABOLITO	mM de NADP/min EN PRESENCIA DE $1.2 \times 10^{-4}$ M DE FITOTOXINA (MÁXIMA CONCENTRACIÓN UTILIZADA).			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 <p>(106)</p>	$1.5 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <p>(107)</p>	0.0	$1.5 \times 10^{-2}$	$6.5 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <p>(108)</p>	0.0	$1.6 \times 10^{-2}$	$6.3 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <p>(109)</p>	$4.8 \times 10^{-4}$	0.0	$6.0 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 <p>(110)</p>	$8.7 \times 10^{-4}$	$9.5 \times 10^{-4}$	$7.2 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$

\*N.D Efecto no determinado.

## VI. Resultados y Discusión.

**Cuadro 45.** Concentración máxima de NADP producida por la enzima NAD cinasa dependiente de CaM y por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de las fitotoxinas aisladas (concentración).

METABOLITO	mM de NADP/min EN PRESENCIA DE $1.2 \times 10^{-4}$ M DE FITOTOXINA (MÁXIMA CONCENTRACIÓN UTILIZADA).			
	CAM DE ESPINACA	CAM DE CEREBRO DE BOVINO	NAD CINASA DEPENDIENTE DE CAM	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA
 (111)	$1.4 \times 10^{-3}$	$6.0 \times 10^{-5}$	$6.4 \times 10^{-4}$	$4.3 \times 10^{-5}$
 (112)	$7.5 \times 10^{-4}$	$5.5 \times 10^{-5}$	$6.5 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 (113)	$1.5 \times 10^{-3}$	0.0	$6.5 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 (114)	$2.6 \times 10^{-5}$	$1.8 \times 10^{-5}$	$7.5 \times 10^{-4}$	$5.0 \times 10^{-3}$
 quercetina (115) (Control positivo)	N.D*	N.D*	$4.8 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-3}$

\*N.D Efecto no determinado.

## VII. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

- (i) Los resultados de la presente investigación corroboran una vez más que la preselección de organismos fúngicos mediante la aplicación de un criterio ecológico garantiza la obtención de productos bioactivos. Asimismo, éstos indican que la investigación de nuevos organismos efectivamente puede conllevar a la obtención de productos biodinámicos novedosos. Así, el estudio químico biodirigido de los extractos activos del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix* permitió la obtención de siete derivados novedosos de naftopironas con propiedades fitotóxicas: la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (101), la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3 dihidronafto-pirona (102), la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (103), la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (104), la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (105), la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona (106) y la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108). Estos metabolitos son análogos de dihidronaftopironas diméricas de origen fúngico (Koyama y Natori, 1988; Koyama y Natori, 1987; Sekita *et al.*, 1980; Koyama *et al.*, 1980;). Sin embargo, los monómeros no se habían descrito con anterioridad. También se obtuvo una xantona, la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109), con un patrón de sustitución poco común. La elucidación estructural de estos compuestos se realizó por métodos



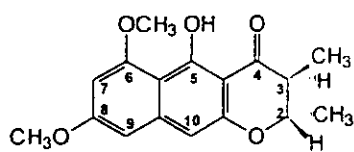
## VII. Resumen y Conclusiones.

espectroscópicos y espectrométricos. En el caso de la xantona, la estructura se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. Adicionalmente, se obtuvieron seis compuestos conocidos: la rubrofusarina B (107), la emodina (110), el metilparabeno (111), el ácido-4-hidroxibenzoico (112), el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (113), y la citrinina (114).

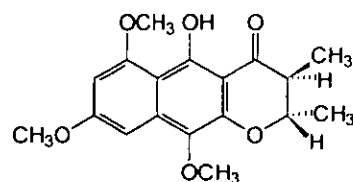
- (ii) Todos los compuestos aislados a partir del hongo *Guanomyces polythrix* presentaron una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. La xantona 109 demostró un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* ( $CI_{50}$   $9.8 \times 10^{-6}$  M). El proceso de germinación no se afectó considerablemente en presencia de los metabolitos fúngicos.
- (iii) Todas las fitotoxinas modifican la movilidad electroforética (SDS-PAGE al 12%) de la proteína CaM de origen vegetal (espinaca) y animal (cerebro de bovino) en ausencia y en presencia de calcio. Los metabolitos 102 y 106 retardan considerablemente la movilidad de la proteína. El retardo en la movilidad electroforética de la proteína CaM provocado por las fitotoxinas fue más notable en presencia de  $Ca^{2+}$ . En general, en ausencia de  $Ca^{2+}$  las fitotoxinas aceleran la movilidad de la proteína CaM, lo que permite especular que en ausencia de  $Ca^{2+}$  la interacción de los compuestos con la proteína altera la conformación de la misma de tal forma que queda expuesta en menor grado la región hidrofóbica de la proteína.
- (iv) La aplicación de la cromatografía de afinidad sobre agarosa unida a CaM de cerebro de bovino permitió corroborar que la unión entre las fitotoxinas 101-108, 110 y 113 y la proteína CaM es irreversible. Los compuestos 109, 111, 112 y la quercetina (control positivo), se unen a la proteína de manera reversible, ya que fueron liberados totalmente de la columna de afinidad. La citrinina (114)

presenta una interacción parcialmente reversible con la proteína CaM, ya que es retenida por la columna en un 60 %.

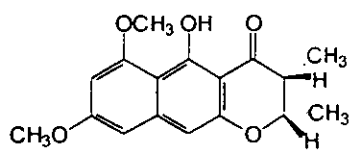
- (v) La presente investigación permitió la estandarización de un procedimiento que permite cuantificar la interacción de fitotoxinas con CaM vegetal, utilizando como enzima blanco a la enzima NAD cinasa aislada de chícharo. La aplicación de este método con las fitotoxinas aisladas del hongo *Guanomyces polythrix* permitió comprobar que las 2,3-dihidronaftopironas novedosas, con grupos metilos en C-2 y C-3, inhiben específicamente la habilidad de la CaM de espinaca para interaccionar con su proteína blanco.



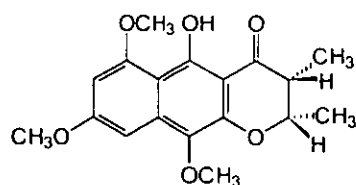
(101)



(102)



(105)

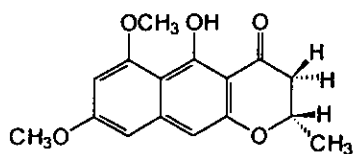


(106)

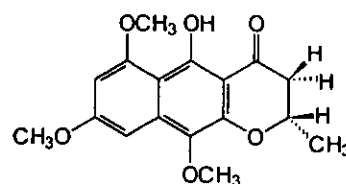
Aparentemente, el cambio de configuración absoluta en los centros quirales en C-2 y C-3 no afecta las propiedades inhibitoras de las dihidronaftopironas. Sin embargo, la presencia de un grupo metoxilo en C-10 incrementa notablemente el efecto antagonista sobre la CaM vegetal.

## VII. Resumen y Conclusiones.

La ausencia de un metilo en el carbono de la posición C-3 confiere a las naftopironas un efecto inhibitorio de la enzima NAD cinasa en ausencia de CaM.

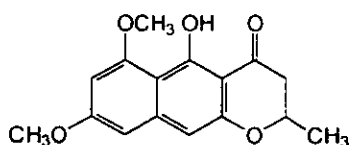


(103)

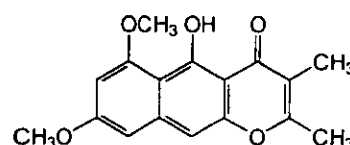


(104)

Las naftopironas con doble ligadura en la posición C-2 y C-3 aceleran la actividad de la enzima NAD cinasa en presencia de CaM de cerebro de bovino, pero inhiben la actividad de la enzima en presencia de CaM vegetal.



(107)



(108)

- (vi) Las fitotoxinas aisladas del hongo *Guanomyces polythrix*, a diferencia de las fenotiazinas (Lee *et al.*, 2000), parecen no interactuar con las proteínas blanco de la CaM (en este caso con la enzima NAD cinasa), por lo que su empleo como instrumentos de investigación para estudiar los procesos fisiológicos y bioquímicos en los que participa la proteína CaM es altamente recomendable.

- (vii) El procedimiento experimental estandarizado en el presente trabajo de tesis, utilizando a la NADcinasa como enzima blanco de la CaM, podría ser de utilidad para el estudio de aquellas isoformas de CaM que regulan específicamente la actividad de la enzima NAD cinasa.
  
- (viii) El presente trabajo doctoral constituye una aportación al conocimiento de los organismos fúngicos de México y por lo tanto a la biodiversidad de México.

## VIII. PERSPECTIVAS

- (i) Determinar el efecto pos y preemergente de las fitotoxinas 101-113 sobre distintas especies de plantas nocivas y plantas de interés agrícola.
  
- (ii) Iniciar los estudios conducentes a determinar el sitio de unión a la CaM de los productos 101, 102, 105 y 106
  
- (i) Determinar la habilidad de los productos naturales de afectar las propiedades moduladoras enzimática de la CaM en presencia de otras enzimas blancos.
  
- (ii) Estudiar el efecto de las fitotoxinas sobre aquellas isoformas de CaM que regulan específicamente la actividad de la enzima NAD cinasa.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R., Pereda-Miranda R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* **16** 2145-2152.
- Anaya, A. L., Hernández, 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. y S. Narwal (Eds.).
- Alfatafta, A. A. (1994). New antifungal and antiinsectan metabolites from coprophilous and sclerotium-producing fungi. *Tesis Doctoral*, Universidad de Iowa, Iowa.
- Alfatafta, A. A., Gloer, J. B., Scott, J. A., Malloch, D. (1994). Apiosporamida: A new antifungal agent from the coprophilous fungus *Apiospora montagnei* J. *Nat. Prod.* **57**, 1692-1702.
- Asogalem, E. A., Akintongua, A. (1997). Embryotoxic effects of oral ametryn exposure in pregnant rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 184-188.
- Au, T. K., Chick, W. S., Leung, P. C. (2000a). Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin ophiobolin A. *J. of Biochem. and Cell Biol.* **32**, 1173-1182.

## IX. Referencias Bibliográficas.

- Au, T. K., Chick, W. S., Leung, P. C. (2000b). The biology of ophiobolin A. *Life Sci.* **67**, 733-742.
- Au, T. K., Leung, P. C. (1998). identification of binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant. Physiol.* **118**, 965-973.
- Baker, F. W. (1991). Herbicides resistance. En: F. Baker y Terry P.J. (Eds.) *Tropical Grassy Weeds*. C.A.B. International for CASAF, Inglaterra, Cap. 6, 96-105.
- Baum, G., Lev-Yadum. S., Fridmann, Arazi, T., Katsenelson, M., Zik, H., Fromm (1996). Calmodulin binding to glutamate decarboxilase is required for regulation of glutamate and gaba metabolism and normal development in plants. *Embo J.* **15**, 2988-2996.
- Benner, J. P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* **39**, 95-102.
- Bradford, M. M (1976). *Anal. Biochem.* **141**, 168-178.
- Bonza, C., Carnelli, A., De Michelis, M. I., Rasi-Caldogno, F. (1998). Purification of the plasma membrane  $ca^{2+}$ -atpase from radish seedlings by calmodulin-agarose affinity chromatography. *Plant Physiol.* **116**, 845-851.
- Buckingham, J., ed., Dictionary of organic compounds. Chapman and Hall: Inglaterra, 1982, 5<sup>th</sup> edn., p 299.
- Calabrese, E. J. (1997). Strinking the balance between the role of animal model and human data in hazard assesment. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**, 186-187.
- Charizopoulus, E. y Papadopoulu-Moukidou, E. (1999). Occurrence of pesticides in rain of the axios river basin, greece. *Environ. Sci. Tech.* **33**, 2363-2368.

- Charudattan, R. (1990). Pathogens with potential for weed control. En: *Microbes and Microbial Products as Herbicides*. R. E. Hoagland (Editor), ACS Symposium Series, **439**, 132-154.
- Cocucci, M., Negrini, N. (1988). Changes in the levels of calmodulin and calmodulin inhibitor in the early phase of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Physiol.* **88**, 910-914.
- Cocucci, M., Negrini, N. (1991). Calcium calmodulin in germination of *phacelia tanacetifolia* seed: Effects of light, temperature, fusicoccin and calcium calmodulin antagonists. *Physiol. Plantarum* **82**, 143-149.
- Collins, S. C. (1991). Chemical control of grassy weeds. En: *Tropical Grassy Weeds*. F. Baker y Terry P.J. (Eds.), C.A.B. International for CASAFI Inglaterra. Cap. **4**, pp. 73-84.
- 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 requires for Lys<sup>115</sup> trimethylation. *Biochem. J.* **340**, 417-424.
- Cremllyn, R. J. (1991). Agrochemicals. Preparation and mode of action. John Wiley and Son. Cap. **8**, pp. 217-270.
- Cramer, H. M. (2000). Crop protection. En: *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicol. Appl.* F. Müller (editor), Wiley-VCH, Alemania, 288-317.
- Dairi, T. , Hamano, Y., Furumai, T., Oki, T. (1999). Development of a self-cloning system for *Actinomadura verrucosospora* and identification of poliketide synthasa genes essential for production of the angucyclic antibiotic pradimicin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2703-2709.
- Dayan, F. E., Romagni, J. G., Duke, S. O. (2000). Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *J. Chem. Ecol.* **26**, 2079-2094.



## IX. Referencias Bibliográficas.

- Dieter, P. (1984). Calmodulin and calmodulin-mediated processes in plants. *Plant Cell and Environ.* **7**, 371-380.
- Ditch, J., Zahm, S. H., Hanberg, A., Adami, H. O. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control.* **8**, 420-43
- 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* Cap. **9**, pp.110-124.
- Duke, O. S., Abbas, H. K. (1995). Natural products with potential use as herbicides. En: *Allelopathy: Organisms, Processes and Applications*. Inderjit, M. Dakshini y Frank A Einhellig (Eds.), American Chemical Society. *Symposium Series* 348-362.
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., Mata, R. (1999). R. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Med.* **65**, 109-114.
- Evans, D. (1998). Agrochemicals-benefits and risks. *Chem. Brit.* **2**, 20-23.
- Evidente, A., Motta, A. (2001). Phytotoxins from fungi, pathogenic for agrarian, forestal and weeding plants. En: *Bioactive Compounds from Natural Sources*. Tringalli (Editor), Taylor and Francis, Inglaterra. 475-525.
- Fujita, T., Liu, D., Ueda, S., Itaketa, Y. (1992). Xanthenes from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry* **31**, 3997-4000.
- Gaffield, W. (1970). Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. *Tetrahedron* **26**, 4093-4108.

- Gamble, W., Gloer, J., Scott, J., Malloch, D. (1995). Polytolypin, a new antifungal triterpenoid from the coprophilous fungus *Polytolypa hystericis*. *J. Nat. Prod.* **58**, 1983-1986.
- Galmarini, O.; Mastronardi, I.; Priestap, H. (1974). Two novel metabolites of *Aspegillus fonsecaeus*. *Experientia* **60**, 586.
- Gerwick, B.C. (1997). Pyridazocidin, a new microbial phytotoxin with activity in the mehler reaction. *Weed Sci.* **45**, 654-657.
- Gloer, J. B. (1995). The chemistry of fungal antagonism and defense. *Canadian J. Bot.* **73**, 1265-1274.
- Gloer, J. B. y Truckenbrod, S. M. (1988). Interference competition among coprophilous fungi: Production of (+)-isoeoxydon by *Poronia punctata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 861-864.
- González, M. C., Hanlin, R. T., Ulloa, M. (2000). *Guanomyces*, a new genus of Ascomycetes from México. *Mycologia* **92**, 1138-1148.
- Gorst-Allam, C., Steyn, P., Rabie C. (1980). Structural elucidation of the nigerones, for new naphthopyrones from cultures of *Aspergillus niger*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2474-2479.
- Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of bioactive natural products. En: bioactive natural detection, isolation and structural determination. Colegate, S. y Molyneux, R. (Eds.). C. R. C. Press., E. U. A. pp 10-49
- Gunatilaka, A. A., De Silva, A. M., Sotheeswaran, S., Blalasubramaniam, S., Wazeer M. I. (1984). Terpenoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum calaba* and *Garcinia spicata* from Sri Lanka. *Phytochemistry* **23**, 323-328.
- Grover, R. Wolt, J.D., Cessnai, A. J. y Shiefer, H. B. (1997). Environmental fate of Trifluralin. *Rev. Environ. Contamination Toxicol.* **153**, 1-64.

## IX. Referencias Bibliográficas.

- Harding, S. A., Oh, S. H., Roberts, D. M. (1997). Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene show an enhanced production of active oxygen species. *The Embo J.* **16**, 1137-1144.
- Harborne, J. B. (1993). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Reports* **10**, 327-348.
- Harborne, J. B. (1999). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Reports* **16**, 509-523.
- Hardell, L., Erikson, H. (1999). A case control study of Non-Hodkin lymphoma and Exposure to Pesticides. *Cancer* **85**, 1353-1560.
- Harmon, C. A., Jarreett, W. H., Cormier, J. M. (1984). An Enzimatic Assay for Calmodulins Based on Plant NAD Kinase Activity. *Analytical Biochem.* **141**, 168-178.
- Heap, I. M. (1997). The occurrence of herbicide-resistan weeds worldwide. *Pestic. Sci.* **51**, 235-243.
- Hein, S. M., Gloer, J. B., Koster, B., Malloach D. (1998). Arugosin F: A new antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Ascodesmis sphaerospora*. *J. Nat. Prod.* **61**, 1566-1567.
- Heydens, W. F., Wilson, A. G., Kier, L. D., Lau, H., Thake, D. C., Martens, M.A. (1999). An evaluation of the carcinogenic potential of the herbicide alachlor to Man. *Human Exper. Toxicol.* **18**, 363-391.
- Hideaki, K., Takeshi S., (1986). Isolation of Moniliphenone, a Key Intermediate in Xanthone Biosynthesis from *Monilinia fructicola*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1699-1671.

- Hoagland, R. E. (1990). Microbes and Microbial Products as Herbicides, an Overview. En: Microbes and Microbial Products as Herbicides, ACS Symposium Series 439, 1-52.
- Holt, J. S. (1993). Mechanims and Agronomic Aspects of Herbicide Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 203-229.
- Hook, S. S., Means, A. R. (2001). Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent Kinases: From Activation to Function. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 471-505.
- Ichihara, A., Oikawa, H., Hayashimoto, M., Sakamura, S., Haraguchi, T. y Nagano. (1983a). A Phytotoxin, Betaenones C, and its Related Metabolites of *Phoma betae* Fr. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2965-2967.
- Ichihara, A., Oikawa, H., Hayashi, K. y Sakamura, S. (1983b). Structures of betaenones A, B; Novel Phytotoxins from *Phoma betae* Fr. *J. Amer. Chem. Soc.* 105, 2907-2907.
- Igarashi, M., Kinoshita, N., Ikeda, T., Kameda, M. Hamada, M., Takeuchi, T. (1997). Resormycin, a novel herbicidal and antifugal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties *J. Antibiot.* 50, 1020-1025.
- Igarashi, M., Nakamura, H., Naganawa, H., Takeuchi, T. (1997). Resormycin, a Novel Herbicidal and Antifugal Antibiotic Produced by a Strain of *Streptomyces platensis*. II. Structure elucidation of Resormycin. *J. Antibiot.* 50, 1026-1031.
- Iinuma, M., Tosa, H., Toriyama, N., Tanaka, T., Ito, T., Chelladurai, V. (1996). Six santonas from *Calophillum austroindicum*. *Phytochemistry.* 43, 681-685.
- Ikeduigwu, F. E. y Webster, J. (1970). Antagonism Between *Coprinus heptemerus* and Other Coprophilous Fungi. *Tran. of the British Mycol. Soc.* 54, 181-204.

## IX. Referencias Bibliográficas.

- Inoue, M., Nishimura, H., Li, H.-H., Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *J. Chem. Ecol.* **18**, 1833-1840.
- Iyer, P., Gammon, D., Gee, J., Pfeifer, K. (1999). Characterization of maternal influence on teratogenicity: and assessment of developmental toxicity studies for the herbicide cyanazine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **29**, 88-95.
- Jaya V., Dubey, N., K. (1999). Perspectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. *Current Sci.* **76**, 172-179.
- Khan, N., U., Parveen, N., Singh, M., P., Singh, R., Achari, B., Dastidar, P., G., Dutta, P., K. (1996). Two isomeric benzodipyrone derivatives from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **42**, 1181-1183.
- Kimura, T., Nakamura, K., Takahashi, E. (1995). Phosphonothrixin, a novel hebicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Estructure determination. *J. Antibiot.* **48**, 1130-1133.
- King. R. R., Lawrence, H. (1996). Characterization of New Thaxtomin A. Analogues Generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1108-1110.
- Koyama, K , Natori, S. (1987). Chaetochromins B, C and D bis (naphtho- $\gamma$ -pyrone) derivatives from *Chaetomium gracile*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 578-584.
- Koyama, K., Natori, S., Iitaka, Y. (1987). Absolute Configurations of chaetochromin a and related bis(naphtho- $\gamma$ -pyrone) mold metabolites. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4049-4055.
- Koyama, K , Natori, S. (1988). Further Characterization of Seven Bis(naptho- $\gamma$ -pyrone) Congeners of Ustilaginoidins, Coloring Matters of *Claviceps virens* (*Ustilaginoidea virens*). *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 146-152.

- Lee, S. H., Kim, J. C., Lee, M. S., Heo, W. D., Seo, H. Y., Yoon, H. W., Hong, J. C., Lee, S. Y., Bahk, J.D., Hwang, I., Cho, M. J.(1995). Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *The J. Biol. Chem.* **37**, 21806-21812.
- Lee, S. H., Seo, H. Y., Kim, J.C., Heo, W. D., Chung, W; S., Lee, K.J., Kim, C. Y., Cheong, H. W., Chio, J. Y., Lim, O. C., Cho, J. M. (1997). Differential activation of nad kinase by plant calmodulin isoforms. the critical role of domain I. *The J. Biol. Chem.* **272**, 9252-9259.
- Lee, S. H., 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., Sho, M. J.(1999). Competitive binding of calmodulin isoforms to calmodulin-binding proteins: implications for the function of calmodulin isoforms in plants. *Biochim. et Biophys.* **1433**, 56-66.
- Lee, S. H., Johnsn J.D., Walsh, M.P., Van Leirop, J. E., Sutherland, C., Xu\$, A., Snedden, W. A., Kosk-Kosicka, D., Fomm, H., Narayanan\$, N. Cho, M.J. (2000). Differential regulation of  $ca^{2+}$ /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free  $Ca^{2+}$ /concentration. *Biochem. J.* **350**, 299-306.
- Leeper, F., Staunton, J. (1984). Biomimetic syntheses of polyketide aromatics from reaction of an orsellinate anion with pyrones and a pyrylium salt. *J. Chem. Soc.,Perkin Trans. 1*, 1053-1059.
- Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H., Tripton, C. L. (1984). Ophiobolin A, a natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **259**, 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 Physiol.* **77**, 303-308.
- 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. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 53-60.

## IX. Referencias Bibliográficas.

- Liu, Z., Xia, M., Poovaiah, B. W. (1998). Chimeric calcium-calmodulin-depedent protein kinase in tabaco: differential regulation by calmodulin isoforms. *Plant Mol. Biol.* **38**, 889-897.
- Maier, A., Müllen, J., Schneider, P., Fiedler, H., Groth, I., Tayman, F. S., Teltschik, F., Günther, C., Bringmann, G. (1999). (2E, 4Z)-decadienoic acid and (2E, 4Z, 7z)-dacatrienoic acid, two herbicidal metabolites from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 6105. *Pestic. Sci.* **55**, 733-739.
- Mathieson, D., Whalley, W. (1964). The chemistry of fungi. Part XLIV. The conformation of citrinin. *J. Chem. Soc.* 4640-4641.
- McLaughlin, J. L., Chang, C. J. Smith, D. L. (1991). "Bench-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. *Stud. in Nat. Prod. Chem.* **9**, 383-409.
- Melvyn, G., Giménez, A., Mckenzie, R. (1988). Pigments of fungi, Part 8. bianthraquinones of *Dermocybe austroveneta* J. *Nat. Prod.* **51**, 1251-1256.
- Melvyn, G., Giménez, A. (1991). Austrovenetin, the principal pigment of the toadstool *Dermocybe austroveneta*. *Phytochemistry* **30**, 951-955.
- Neuefeind, T. Reinemer, P. y Bieseler, B. (1997). Plant glutathione S-transferase and herbicide detoxification. *Biol. Chem.* **378**, 199-205.
- Nishino, H., Naitoh, E., Iwashima, A., Umezawa, K. (1984). Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein. *Experientia* **40**, 184-185.
- Oettmeier, W. (1999). Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cel. Mol. Life Sci.* **55**, 1255-77.
- Oh, S. H., Steiner, D. K., Dougall, D. M., Roberts. (1992). Modulation of calmodulin levels, calmodulin methylation and calmodulin bindings proteins during carrot cell growth and embriogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 28-34.

- Oiwa, R. (1992). Antibacterial agents. En: *The search for bioactive compounds from microorganisms*, S. Omura (Editor). Springer-Verlag, E.U.A., pp. 1-29.
- Overvoorde, P. J., Grimes, H. D. (1994). The Role of Calmodulin in Carrot Somatic Embriogenesis. *Plant. Cell Phys* **35**, 135-144.
- 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 Phys.* **26**, 201-209.
- Parce, F. y Mackenzie, D. (1999). It's Raining Pesticides. The Water Falling from Our Skies is Unfit to Drink. *New Scientist* **3**, april 23.
- Pedras, M. S. C., Abrems, S. R., Séguin-Swartz, G. Wilson-Quail, J. y Jia, Z. (1989). Phomarizine, a novel toxin from the phytothogenic fungi *Phoma lingam*. *J. Am.. Chem. Soc.* **111**, 1094-1095.
- Pedras, M. S. C. y Séguin-Swartz, G. (1990a). Rapid high-performance liquid chomatographic analysis of phytotoxins from *Phoma lingam*. *J. Chomatogr.* **519**, 383-386.
- Pedras, M. S. C., Séguin-Swartz, G., Abrams, S. R. (1990b). Minor phytotoxins from the blackleg fungus *Phoma lingam*. *Phytochemistry* **29**, 777-781.
- Pefferle, C., Breinholt, J., Gürtler, H., Fiedler, H. (1997). 1-hidroxy-4-methoxy-2-Naphthoic Acid a Herbicidal Compound by *Streptosporangium cinnabarium* ATCC 31213. *J. Antibiot.* **50**, 1067-1068.
- Pillmoor, J. B.; Wright, K., Terr, S. A. (1993). Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pestic. Sci.* **39**, 131-140.
- Poovaiah, B. W., Takezawa, G. A., An, T. J., Han, D. (1996). Regulated expression of a calmodulin isoforms alters growth and development in potato. *J. Plant Physiol.* **149**, 553-558.



## IX. Referencias Bibliográficas.

- Porter, K.; Bacon, C., Robinson, J., Higman, H. (1975). A field indicator in plants associated with ergot-type toxicities in cattle. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 771-775.
- 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. *Phytochem.. Anal.* **2**, 199-203.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M.; Frenk, E. y Hosttetmann, K. (1994). antifungal test in phytochemical investigations: comparison of bioautografic methods using phytopathogenic and human phatogenic fungi. *Plant. Med.* **60**, 41-44.
- Riche, C. Pascard-Billy, C., Devys, M., Guadmer, A., Barbier, M. y Bousquet, J.F. (1974). Structure cristalline et moleculaire de la phomenone, photoxine produite par le champignon *Phoma exigua* var. *non oxydabilis*. *Tetrahedron Lett.* **52**, 2765-2766.
- Roberts, D., Lukas. T. J., Watterson, D. M. (1986). Structure, function and mechanism of action of calmodulin. *Crc. Crit. Rev. Plant Sci.* **4**, 311-339.
- Roberts, D. y Harmon, A. (1992). Calcium-calmodulate proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.
- Rodgers, B. P. (1993). Potential of Biopesticides in agriculture. *Pestic. Sci.* **39**, 117-129.
- Sankawa, U., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Isikawa, Y., Kitaghawa, S., Yamamoto, Y., Kobayashi, T., Iitak, Y. (1983). Biosynthesis of citrinin in *aspergillus terreus*. incorporation studies with [2-<sup>13</sup>C, 2-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>], [1-<sup>13</sup>C, <sup>18</sup>O<sub>2</sub>]and [1-<sup>13</sup>C, <sup>17</sup>O]-acetate. *Tetrahedron* **39**, 3583-3591.
- Sathiakumar, N. y Delzell, E. (1997). A Review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Crit. Rev. Toxicol.* **27**, 599-612.

- Sebille, B. y Thuaud, N. (1980). *Crc Handbook of HPLC for the separation of aminoacids, peptides and proteins*, Vol. II Boca Raton, Florida, pp. 331-379.
- Seitz, L; Paukstelis, J. (1977). Metabolites of *Alternaria alternata*: Ergosterol and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one *J. Agric. Food Chem.* **25**, 838-841.
- Sekita, S., Yoshihira, K., Natiri, S. (1980). Chaetochromin, a bis(naphthodihydropyran-4-one) mycotoxin from *Chaetomium thielavioideum*: applicattion of  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  long-rang coupling to the structure elucidation. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2428-2435.
- Shiomi, K., Arai, N., Shionose, M. Takahashi, Y., Yoshida, H., Iwabuchi, J., Takana, Y. y Omura, S. (1995). New antibiotics phithoxazolins B, C and D produced by *Streptomyces* sp. KO-7888 *J. Antibiot.* **48**, 714-719.
- Singh, N. y Webster, J. (1973). Antagonism between *Stilbella erythrocephala* and other coprophilous fungi. *Trans Brit. Mycol. Soc.* **61**, 487-495.
- Snedden, W.A., Fromm, H. (1998). Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Science.* **3**, 299-304.
- Sthal, E. (1969). *Thin layer chromatography*. Academic Press Inc., E. U.A pp 478
- Tanaka, Y., Sugoh, M., Yoshida. H., Arai, N. Shiomi, K., Matsumoto, S., Takahashi, Y., Omura, S. (1995). Hydrantomicin, a new agroactive antibiotic produced by *Streptomyces* sp. K-935305. *J. Antibiot.* **48**, 1525-1526.
- Takahashi, E., Kimura, T., Nakamura, K., Arahira, M. E Iida, M. (1995). Phosphonothrixin, a novel hebicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **48**, 1124-1129.

## IX. Referencias Bibliográficas.

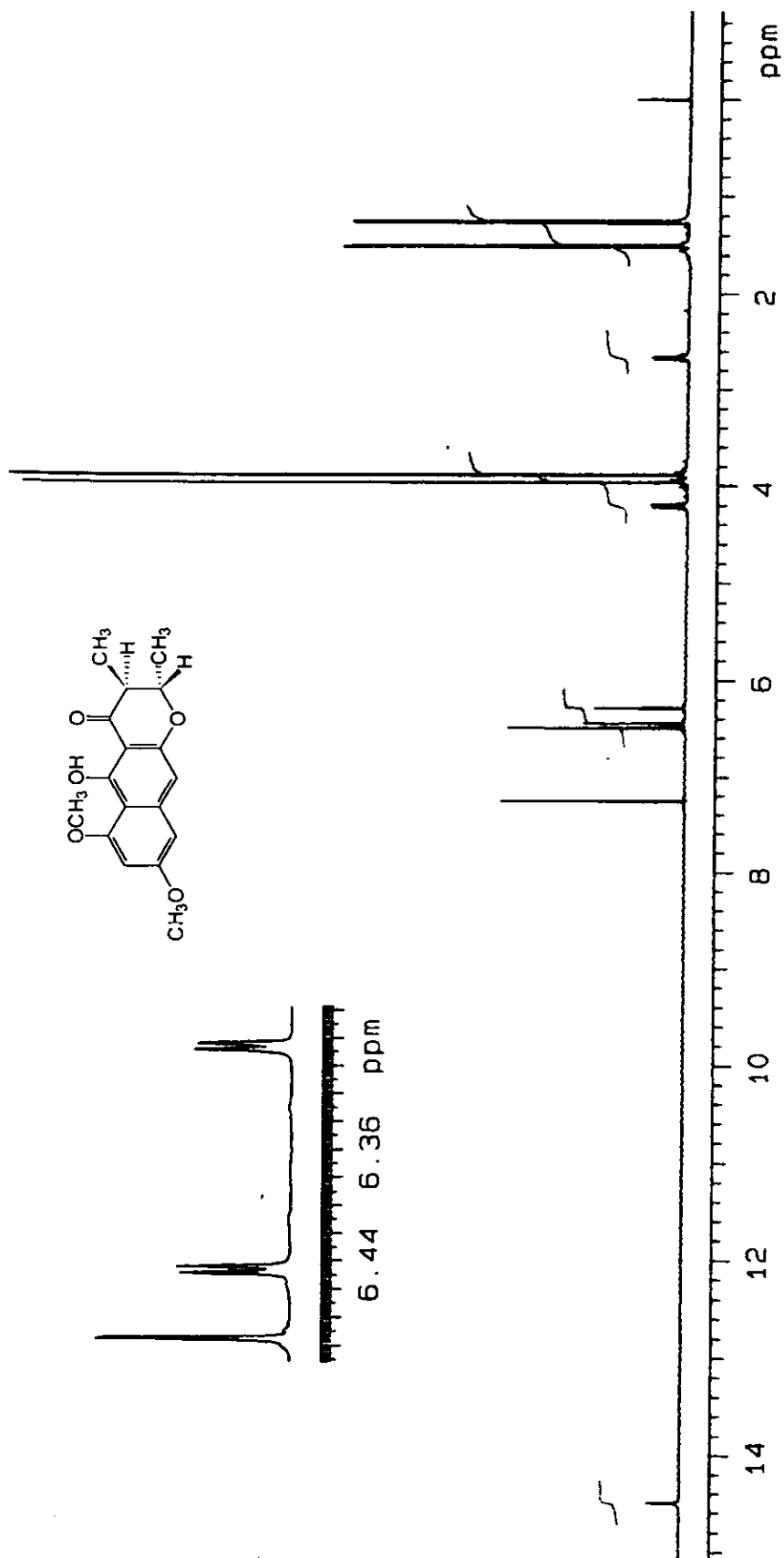
- Terry, P. J. (1991). Grassy weeds a general overview. En: *Tropical Grassy Weeds*. F. Baker y Terry P.J. (Eds.) C.A.B. International for CASABA Inglaterra. Cap. 1, 5-38.
- Tosa, H., Iinima, M., Murakami, K., Ito, T., Tanaka, T., Chelladurai, V., Riswan, S. (1997). Three xanthones from *poeciloneuron pauciflorum* and *mammea acuminata*. *Phytochemistry*. **45**, 133-136.
- Thomas, T. H. (1995). Calcium and calmodulin inhibitor effects on the growth of carrot and radish in nutrient culture. *Plant Growth Regul.* **16**, 299-303.
- Villegas, M (1979). *Malezas de la cuenca de México*; Instituto de Ecología, Museo de historia natural de la ciudad de México.
- Wang, Y. (1994). Isolation and structure determination of new antifungal metabolites from coprophilous fungi. *Tesis Doctoral*, Universidad de Iowa, Iowa.
- Wang, Y., Gloer, J. B., Scott, J. A., Malloch, D. (1993). Appenolides A-C: new antifungal furanones from the coprophilous fungus *Podospora appendiculata*. *J. Nat. Prod.* **56**, 341-344.
- Wang, Y., Gloer, J. B., Scott, J. A., Malloch, D. (1995). Terezines A-D: new amino acid-derived bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella teretispora*. *J. Nat. Prod.* **58**, 93-99.
- Wang, H., Gloer, K. B., Gloer, J. B., Scott, J. A. y Malloch, D. (1997). Anserinones A and B: New antifungal and antibacterial benzoquinones from the coprophilous fungus *Podospora anserina*. *J. Nat. Prod.* **60**, 629-631.
- Warrior, P. (2000). Living systems as natural crop-protection agents, *Pestic. Manag. Sci.*, **56**, 671-687.
- Watanabe, T., Iwase, T. (1996). Developmental and dysmorphogenic effects of glyphosinate ammonium and mouse embryos in culture. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **16**, 287-99

- Weber, H. A. (1991). *Antifungal metabolites from coprophilous fungi*. Tesis doctoral, universidad de Iowa, Iowa.
- Weber, H. A., Gloer, J. B. (1988). Interference competition among natural fungal competitors: an antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Preussia fleishhakkii* (Auerswald) Cain. *J. Nat. Prod.* **51**, 879-883.
- Weber, H. A., Gloer, J. B. (1991). Preussomerins A-F: Novel antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Preussia isomera* Cain. *J. Org. Chem.* **56**, 4355-4360.
- Weber, H. A., Baenziger, N. C., Gloer, J. B. (1988). Podosporin A: A novel antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Podospora decipiens* (Wint.) Niessl. *J. Org. Chem.* **53**, 4567-4569.
- Weber, H. A., Baenziger, N. C., Gloer, J. B. (1990). Structure of preussomerin A: An unusual new antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Preussia isomera*. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6718-6719.
- Weber, H. A., Swenson, D. C., Gloer, J. B., Malloch, D. (1992). Similins A and B: new antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella similis*. *Tetrahedron Lett.* **33**, 1157-1160.
- Whyte, A. C.; Gloer, J. B.; Scott, J. A. y Malloch, D. (1994). New bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Cercophora* sp. En: *International Congress on Natural Products Research*, Julio 31- Agosto 5, Halifax, N. S. pp. 1-40.
- Whyte, A. C., Gloer, J. B., Scott, J. A., Malloch, D. (1996). Cercophorins A-C: Novel antifungal and cytotoxic metabolites from the coprophilous fungus *Cercophora areolata*. *J. Nat. Prod.* **7**, 1-5.
- Wicklow, D. T. y Hirschfiel, B. J. (1979a). Competitive hierarchy in post-fire ascomycetes. *Mycologia* **71**, 47-54.

### ***IX. Referencias Bibliográficas.***

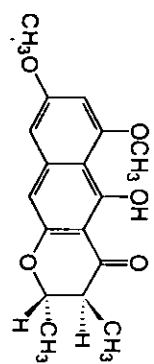
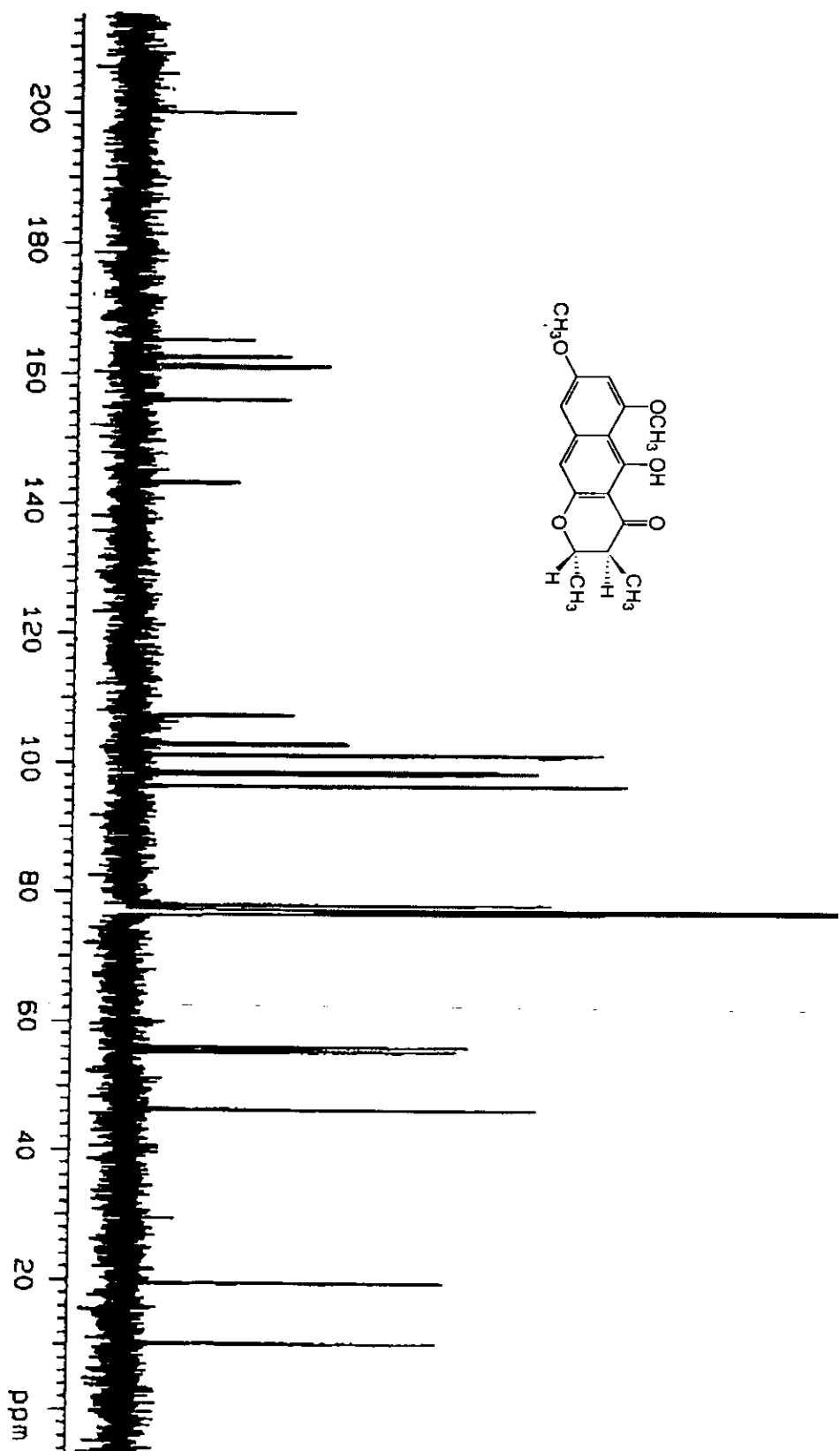
- Wicklow, D. T., Hirschfield, B. J. (1979b). Evidence of a competitive hierarchy among coprophilous fungal populations. *Can. J. Microbiol.* **25**, 855-858.
- Wicklow, D. T. (1992a). Interference competition. En: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. G. C. Carroll y D. T. Wicklow (Eds.). 2a. Ed., Marcel Dekker, E.U.A, pp. 265-274.
- Wicklow, D. T. (1992b). The coprophilous fungal community: an experimental system. En: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem* G. C. Carroll y D. T. Wicklow (Eds.). 2a. Ed., Marcel Dekker, E.U.A, pp. 715-728.
- Worsham, A. D.(1989). Current and potential technique used in allelopathy as aid in weed management. En: *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxin and Insects Pheromones and Allones*. C. H. Chou y G.R. Waller (Eds.). Institute of Botany, Academia Sinica Monograh, Series No. 9, Taipei, ROC.
- Zielinski, R.E. (1998). Calmodulin and calmodulin-binding protein in plants, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 697-725.

## ***X. APÉNDICE I.***

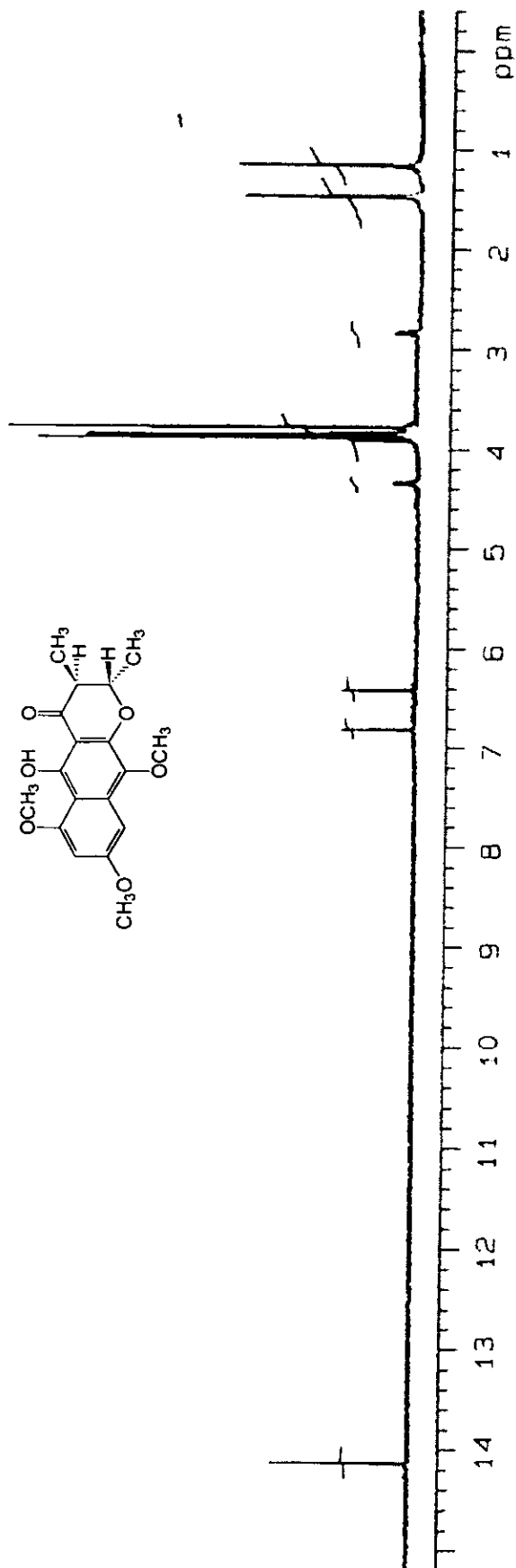


**Espectro 1.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [101].

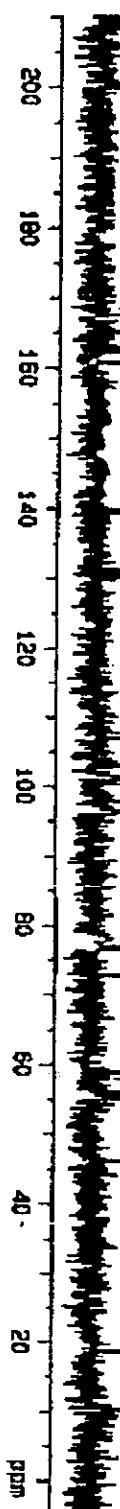
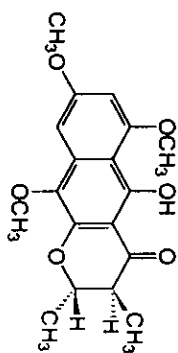
Espectro 2. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [101].



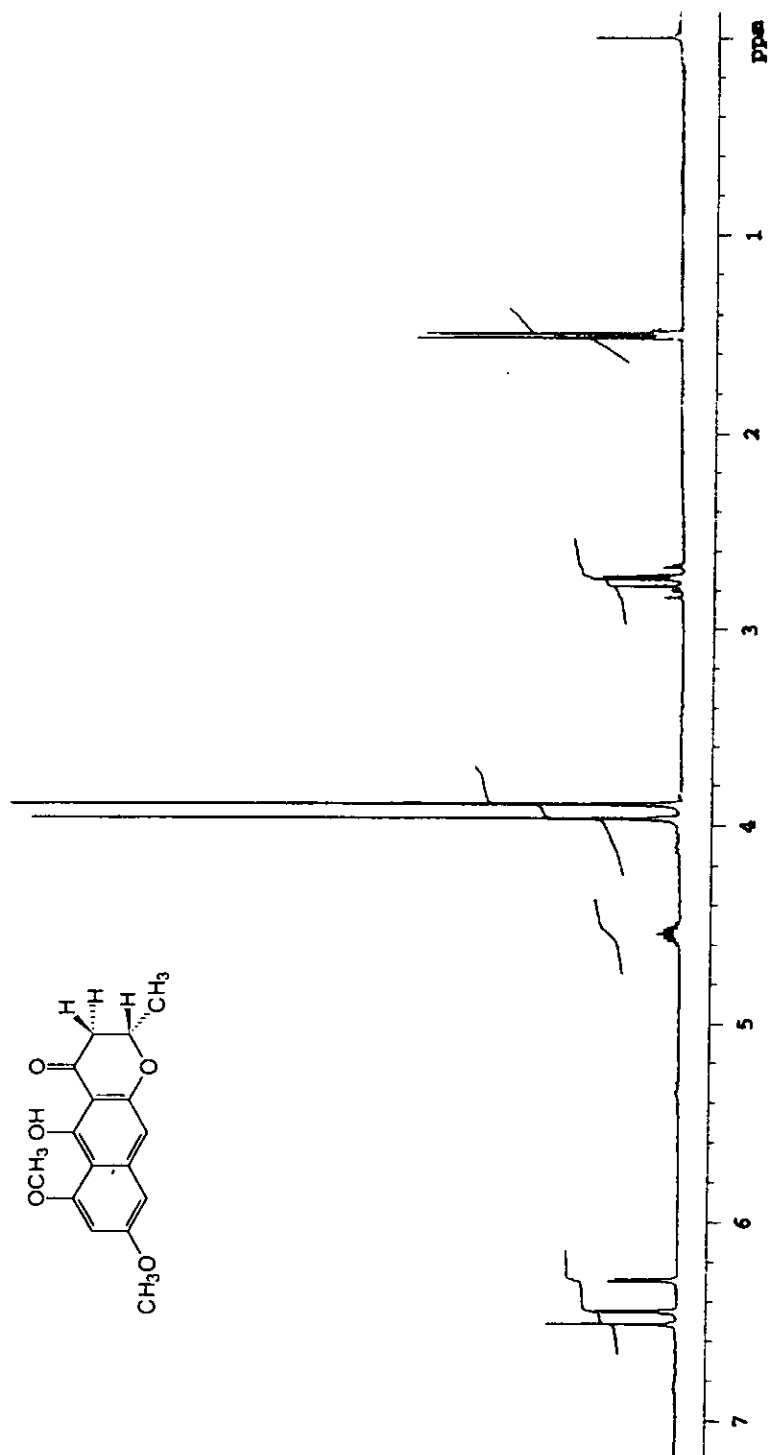




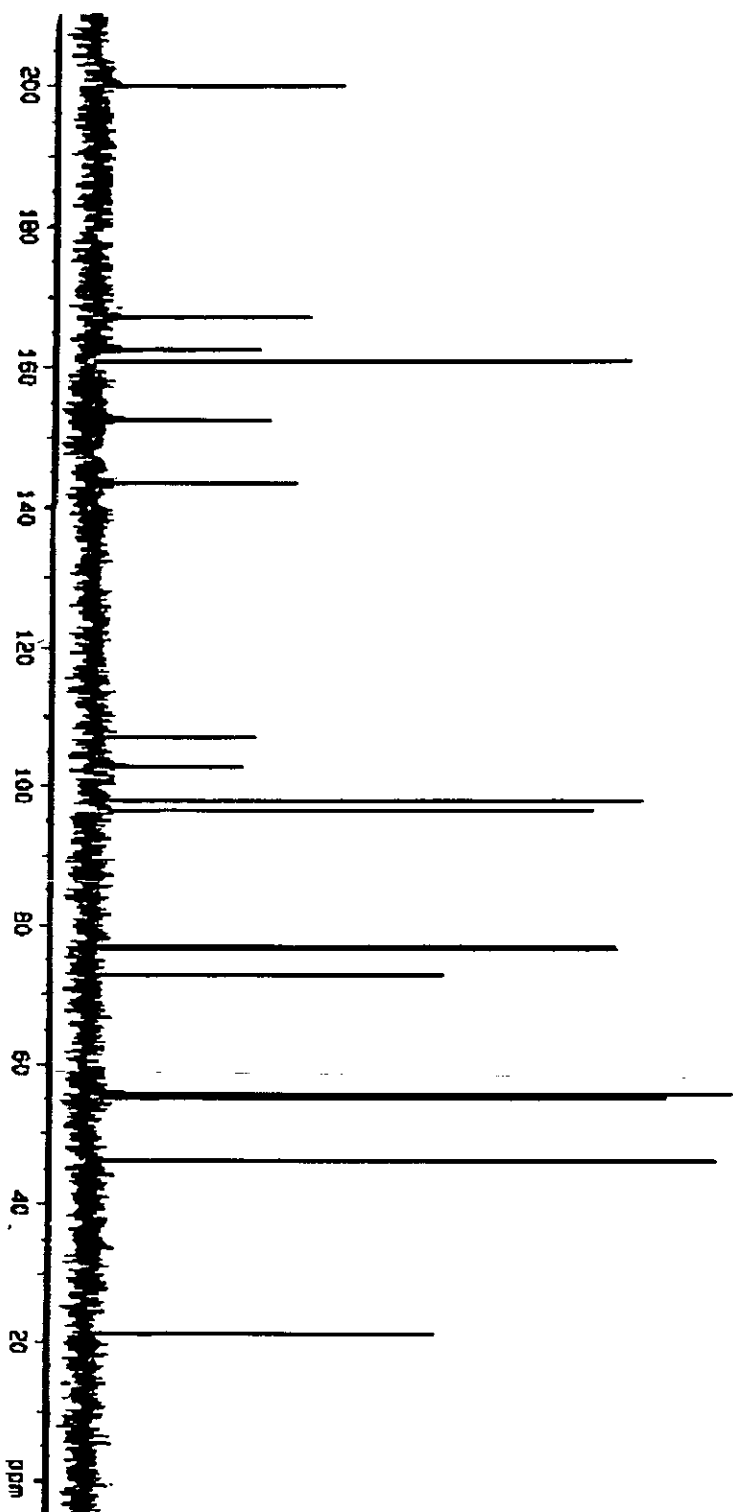
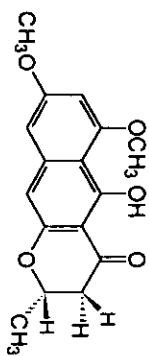
**Espectro 3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10,-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [102].



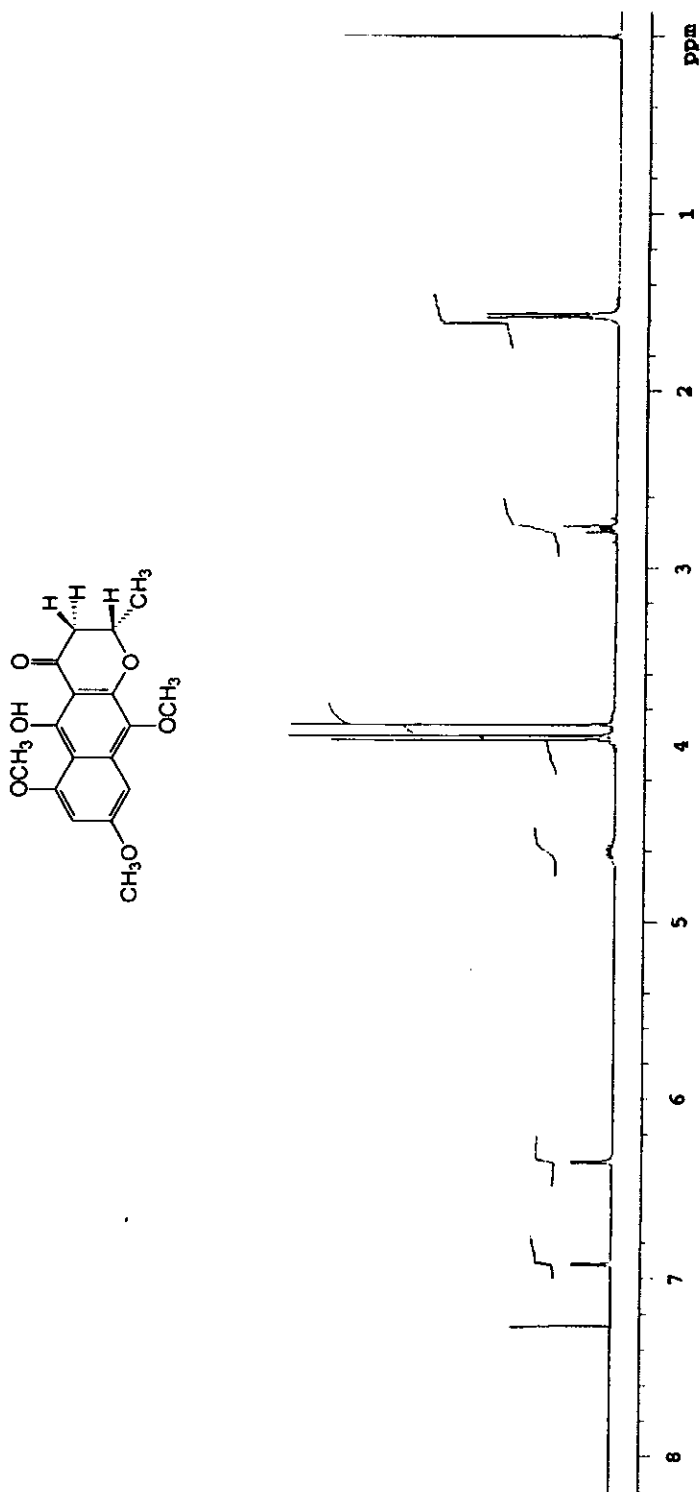
Espectro 4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2S,3S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronatopirona [102].



Espectro 5. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-dihidronaftopirona (103).

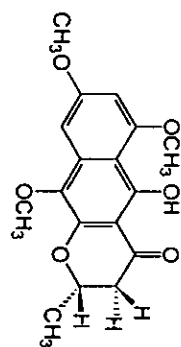
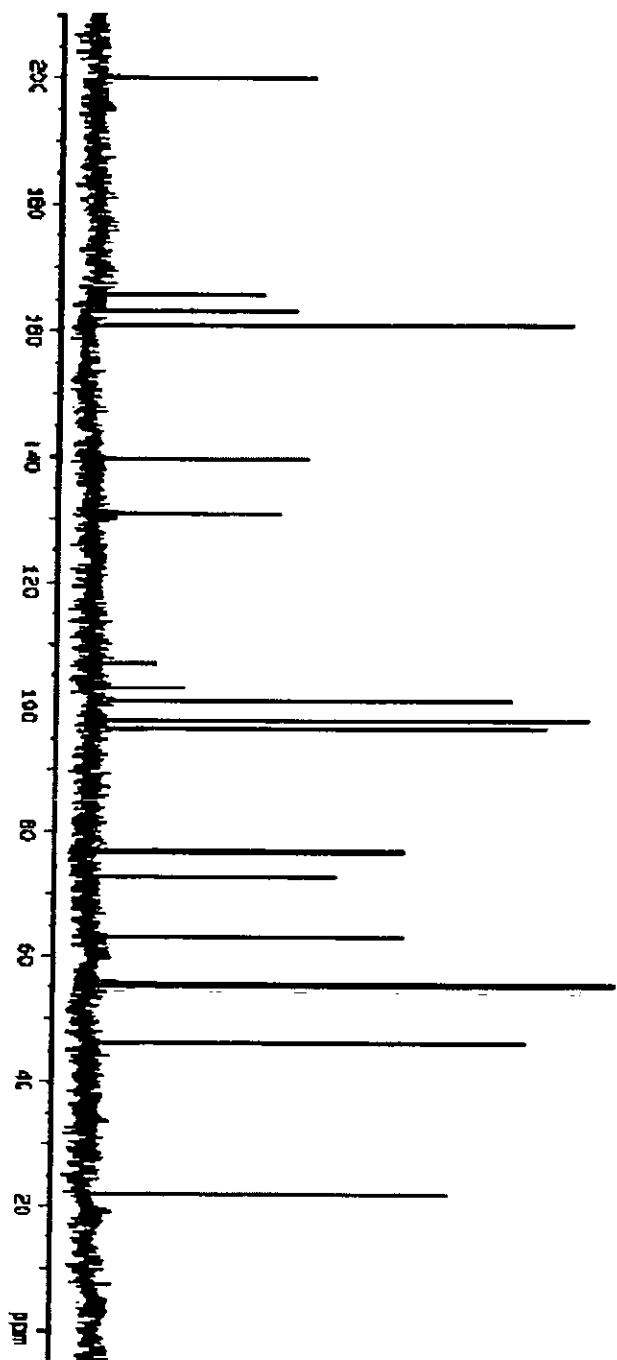


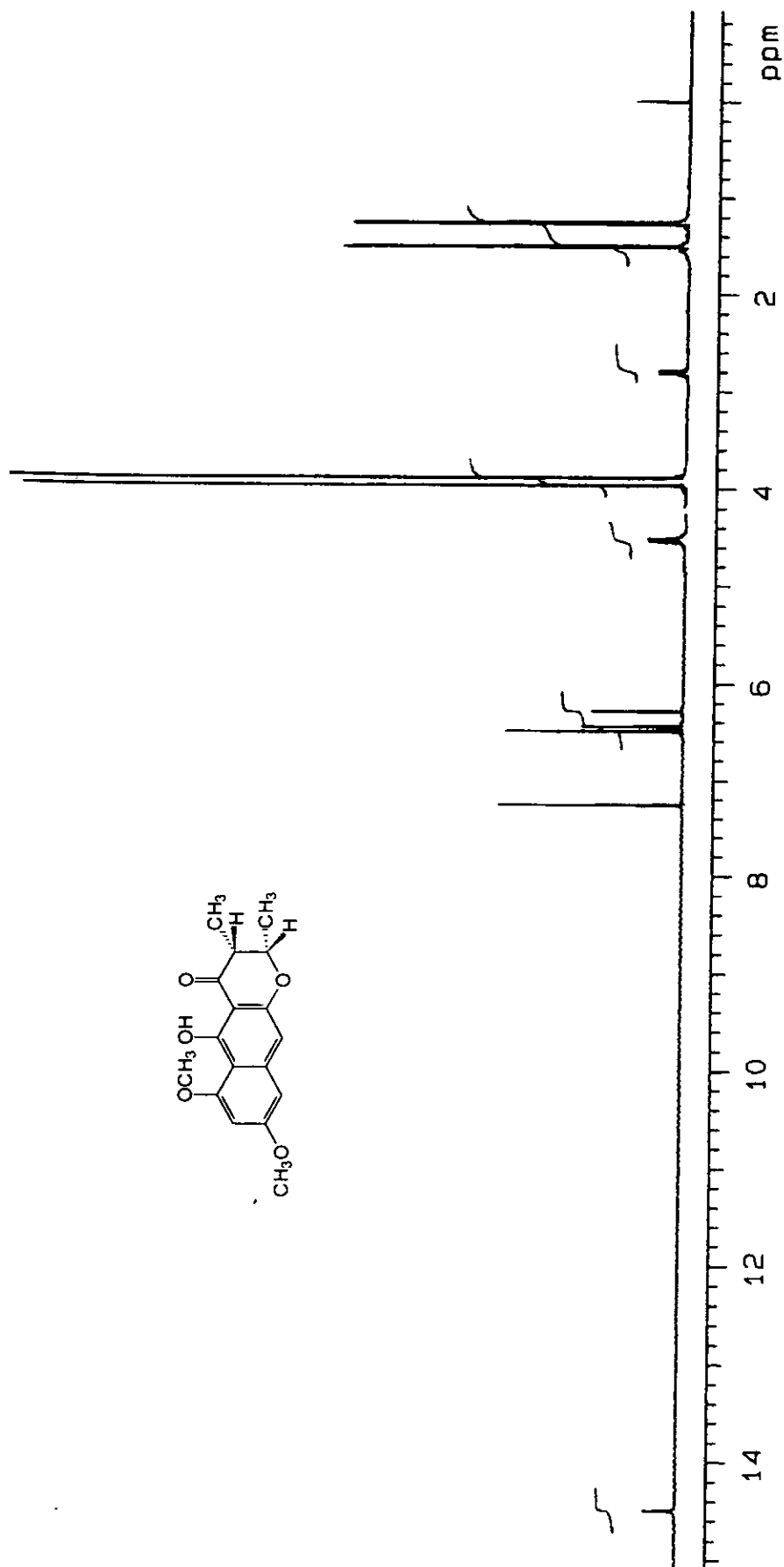
Espectro 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-2,3-dihidronaftopirona (103).



Espectro 7. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidronatopirona (104).

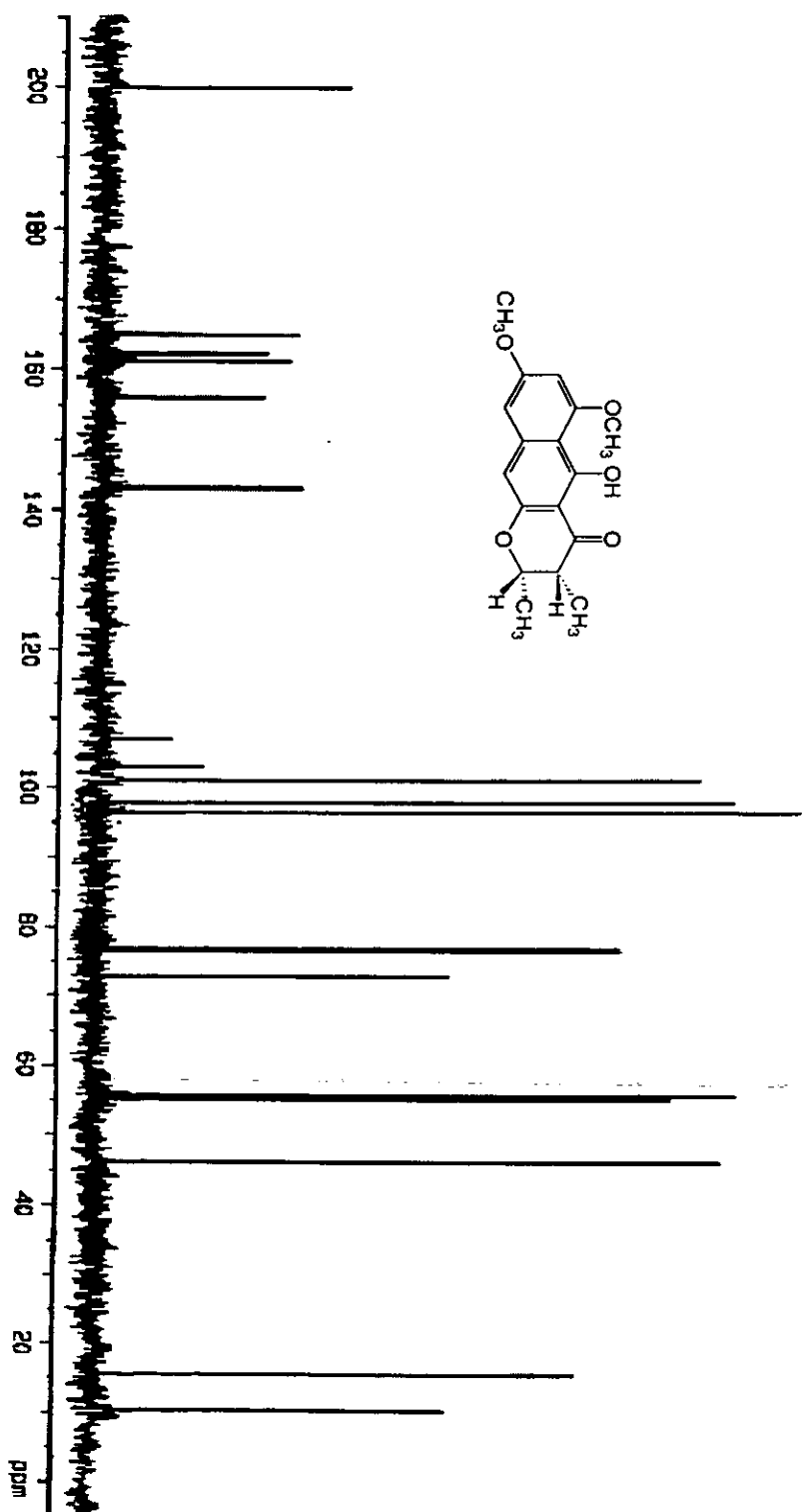
Espectro 8. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(-)(2S)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2-metil-2,3-dihidro-naftopirona (104).



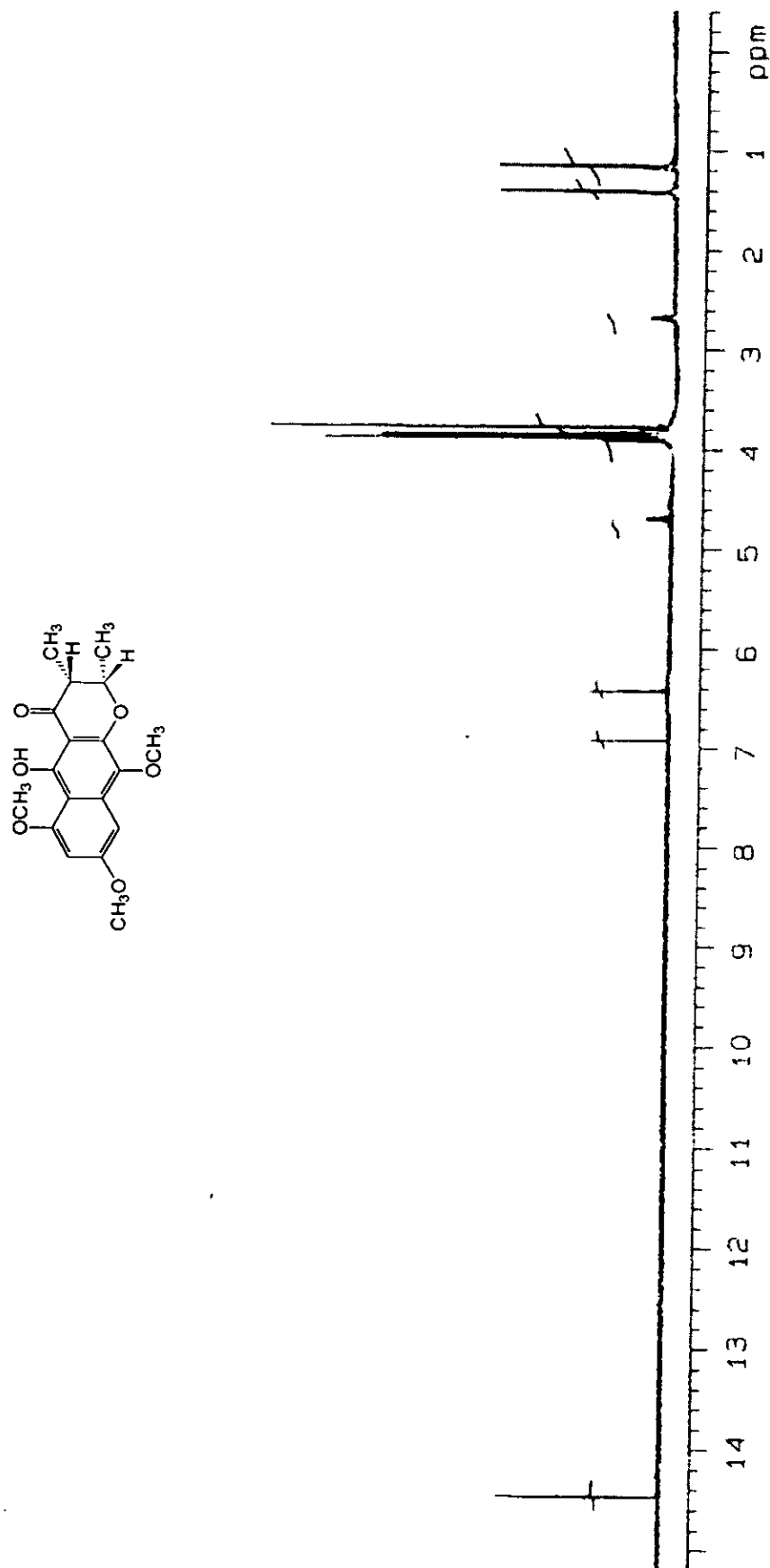


Espectro 9. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [105].

Espectro 10. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [105].

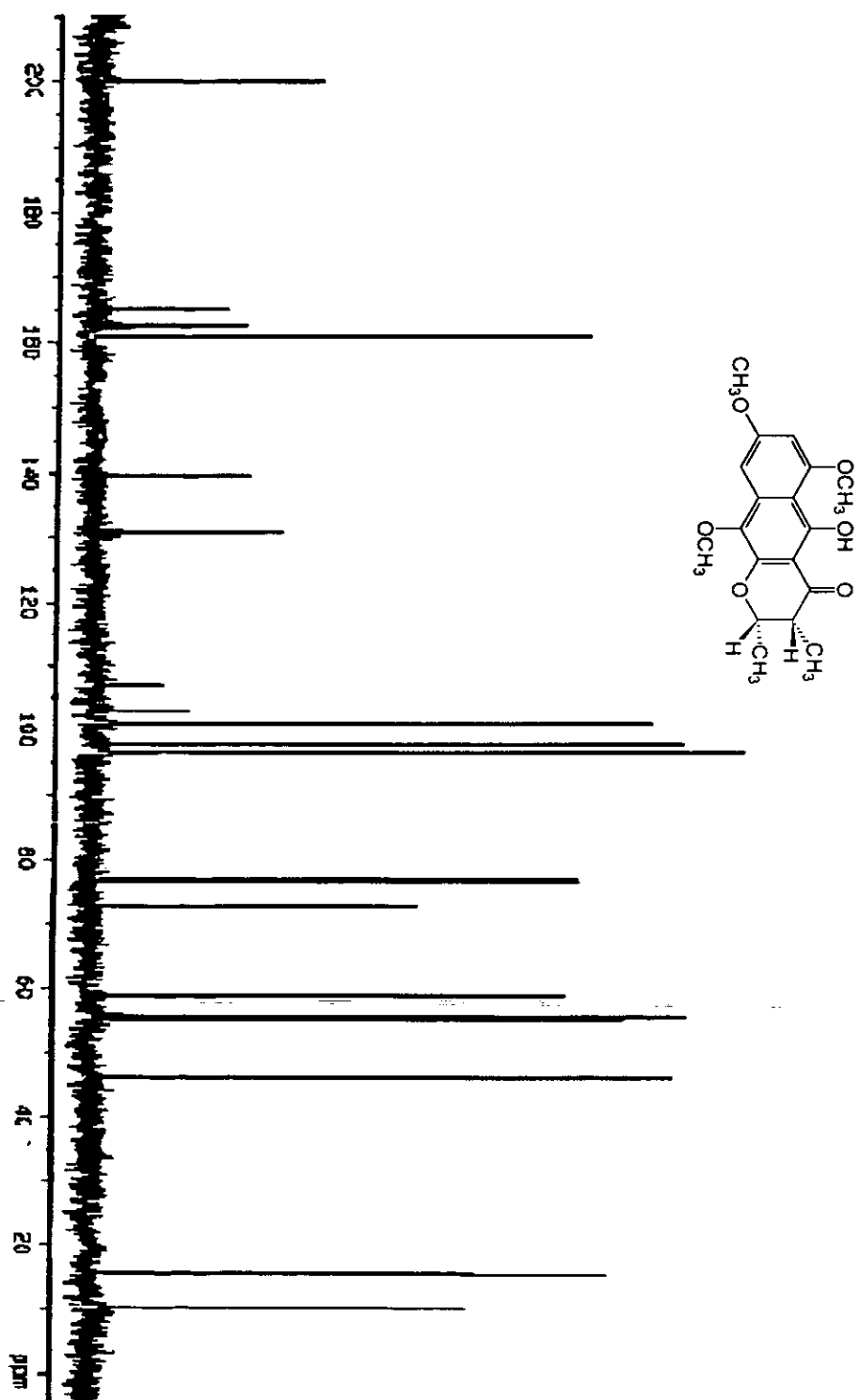


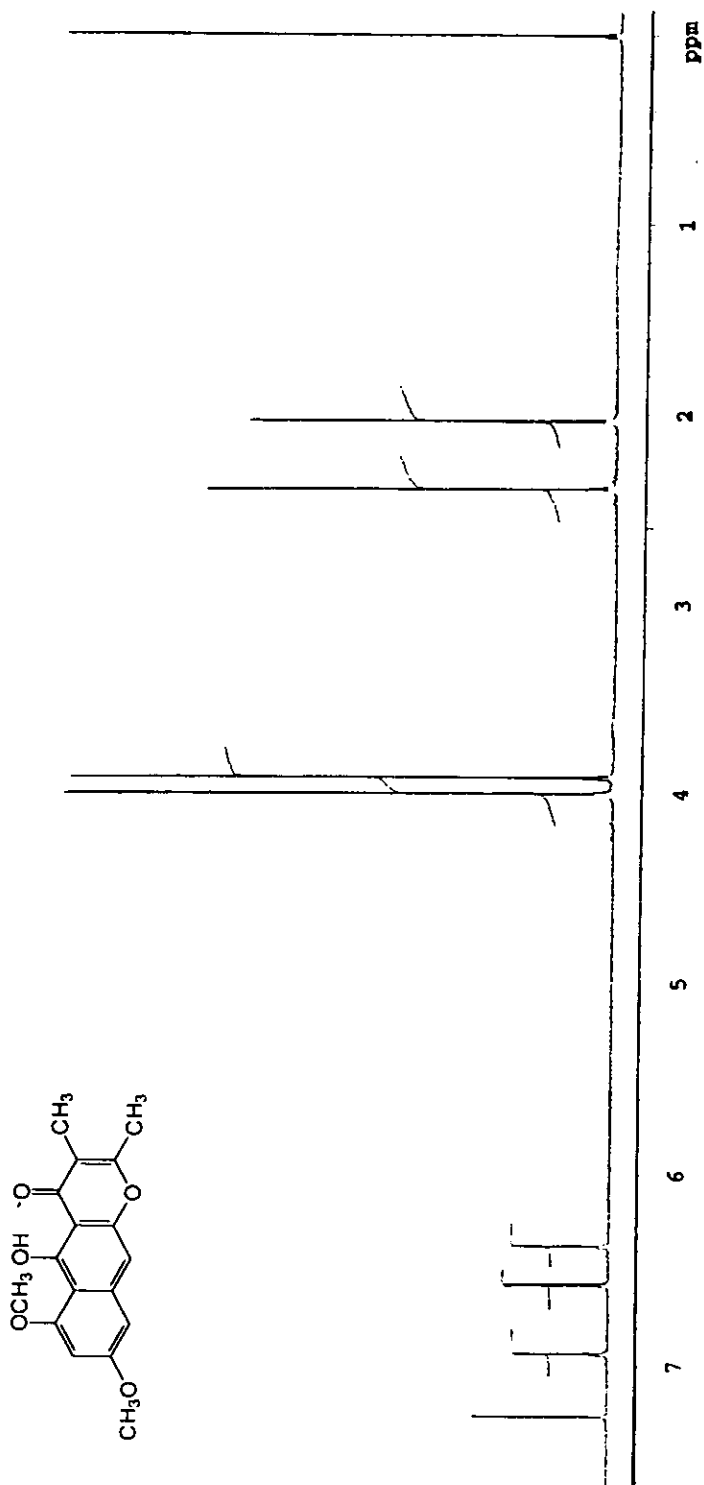




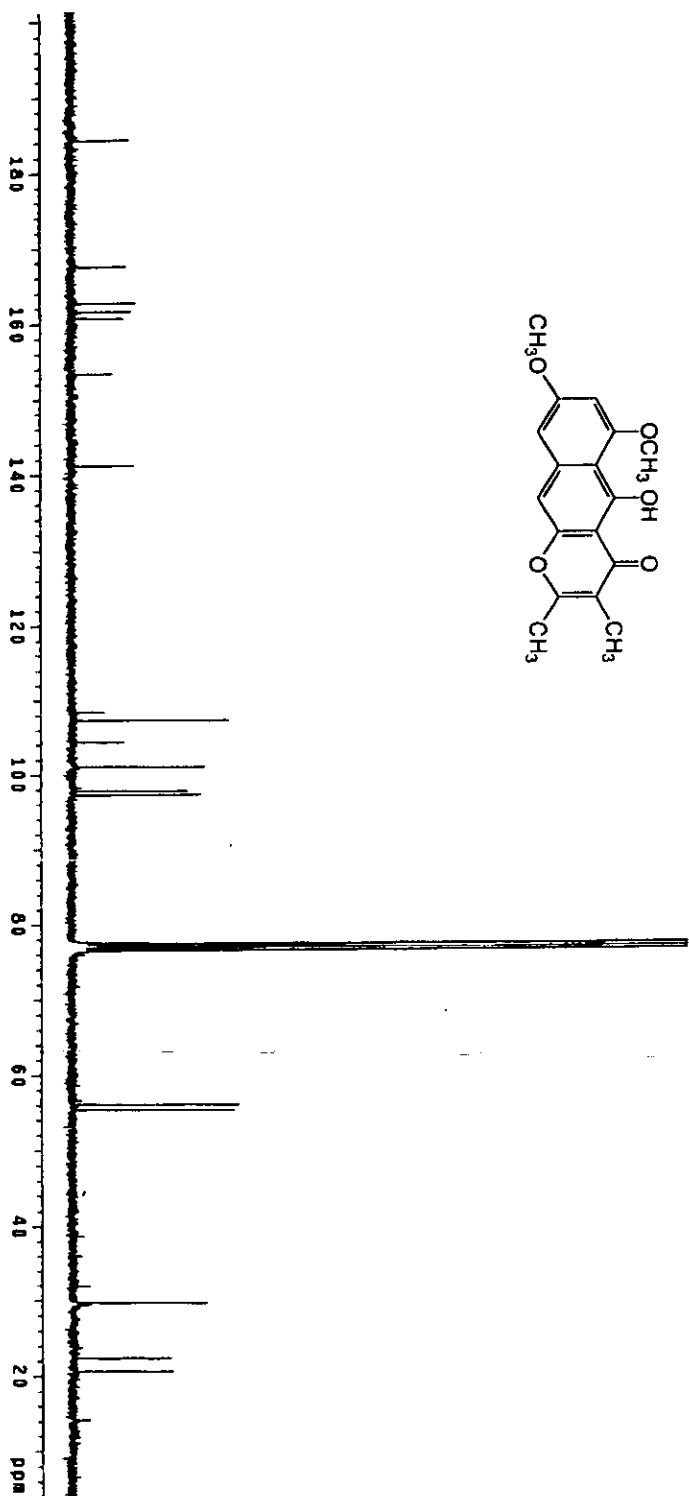
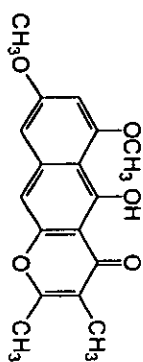
Espectro 11. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la (+)-(2S,3R)-5-hidroxi-6,8,10,-trimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidronaftopirona [106].

**Espectro 12.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la (+)-(2*S*,3*R*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dihidronaftopirona [106].

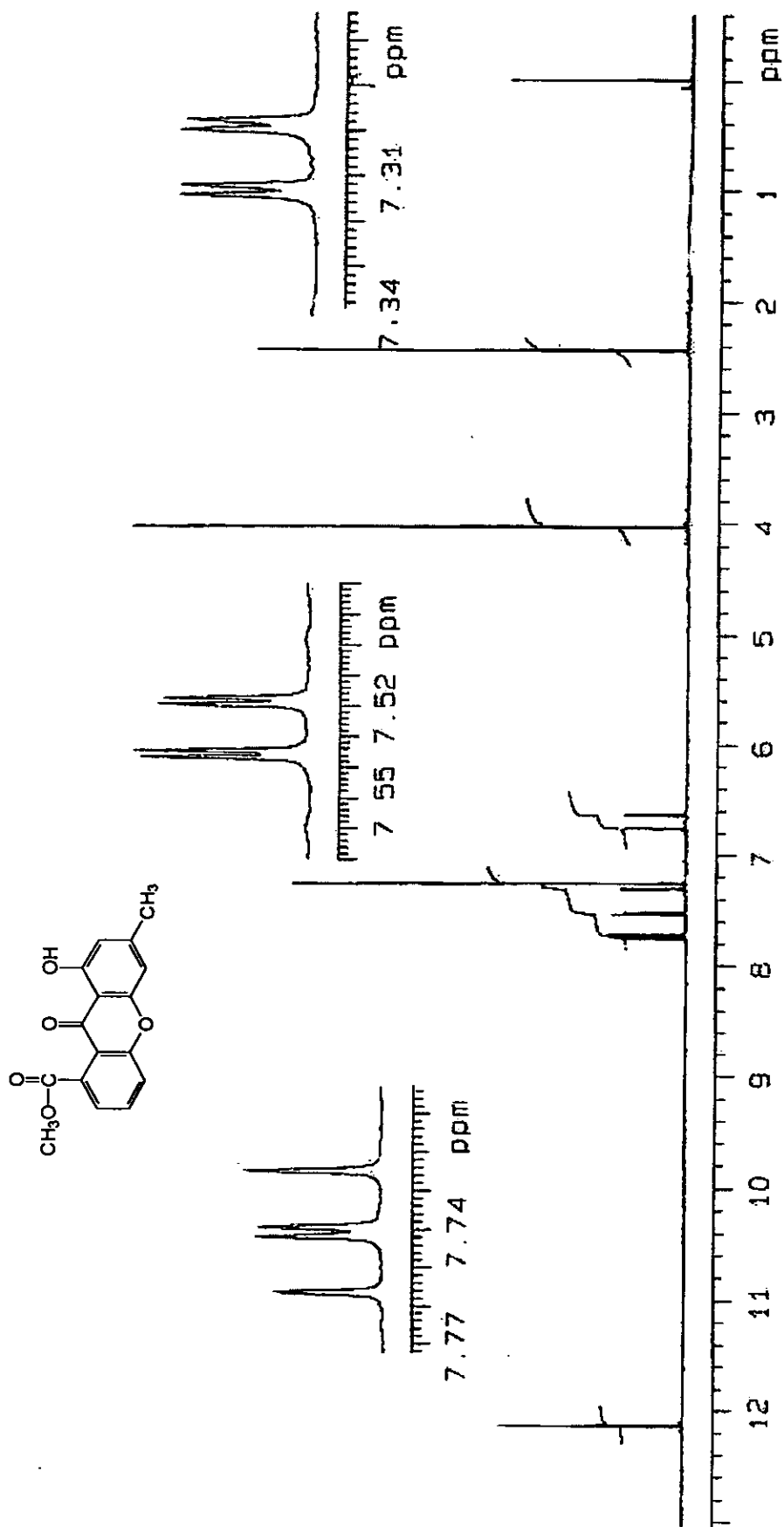


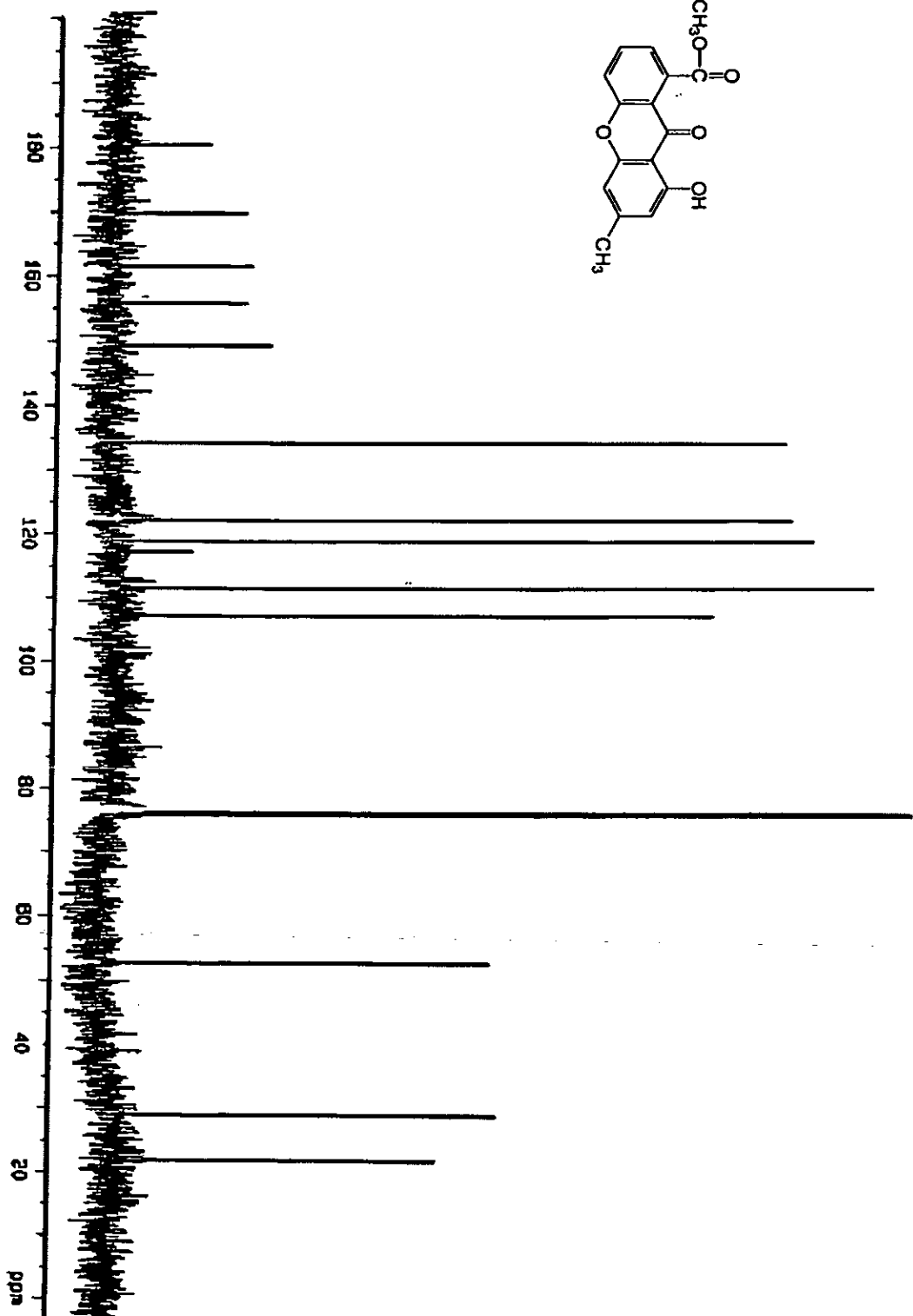
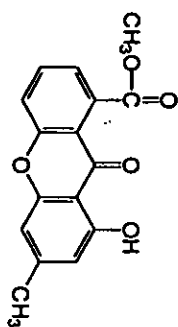


Espectro 13. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108).



Espectro 14. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 2,3-dimetil-5-hidroxi-6,8-dimetoxi-2,3-naftopirona (108).

Espectro 15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).



Espectro 16. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 8-hidroxi-1-metoxicarbonil-6-metilxantona (109).

## ***XI. APÉNDICE II.***



PERGAMON

Phytochemistry □ (□□□□) □-□

PHYTOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/phytochem

# Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*<sup>☆</sup>

Martha Macías<sup>a</sup>, Alicia Gamboa<sup>b</sup>, Miguel Ulloa<sup>c</sup>, Rubén A. Toscano<sup>d</sup>, Rachel Mata<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup>Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico

<sup>d</sup>Laboratorio de Rayos X, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico

Received 16 January 2001; received in revised form 8 May 2001

## Abstract

Reinvestigation of the fermentation broth and mycelium of the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*, grown in static conditions, led to the isolation of several phytotoxic compounds, including two new naphthopyranone derivatives, namely (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one and (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one. The structures of the new compounds were established by spectral and chiroptical methods. In addition, the structure of 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester was unambiguously determined by X-ray analysis. The isolates caused significant inhibition of radicle growth of two weed seedlings (*Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*) and interacted with both spinach and bovine brain calmodulins. © 2001 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Guanomyces polythrix*; *Amaranthus hypochondriacus*; *Echinochloa crusgalli*; Calmodulin; Affinity chromatography; (2*S*, 3*R*)-5-Hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one; (2*S*, 3*R*)-5-Hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one; 8-Hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester; Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one; 4-Hydroxybenzoic acid

## 1. Introduction

As part of our systematic search for new herbicidal lead structures from natural sources, we have recently reported the isolation and structure elucidation of several phytotoxins from the mycelium and culture broth of the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix* grown in agitation conditions. Fourteen compounds (1–14) were isolated, of which the phytotoxic compounds included the five new dihydronaphthopyranone derivatives (1–5), rubrofusarin B (11), emodin (12), citrinin (13) and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester (14). The isolates caused noted inhibition of radicle growth of two weed seedlings [*Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.] and behaved as plant calmodulin (CaM) interactors

(Macías et al., 2000). For this reason, we have undertaken the further chemical investigation of *G. polythrix* grown in static conditions. Herein, we report the isolation and structure elucidation of two additional novel naphthopyranone derivatives (6 and 7) along with several known compounds. In addition, the phytotoxic properties of the isolates and the potential role of CaM as molecular target of the phytotoxic action are described.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Bioactivity-guided isolation

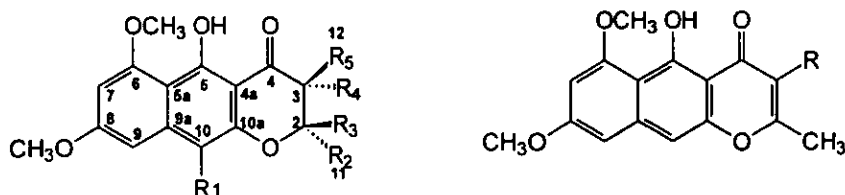
*G. polythrix* was grown in liquid-substrate fermentation on PDB (potato dextrose broth). The mycelium and fermentation broth were extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined extract exhibited significant phytotoxic activity on seedlings of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* (Table 1). Bioassay-guided fractionation of the active

<sup>☆</sup> Taken in part from the PhD thesis of Martha Macías.

\* Corresponding author. Tel.: +52-5-622-5289; fax: +52-5-622-5329.

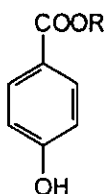
E-mail address: rachel@servidor.unam.mx (R. Mata).



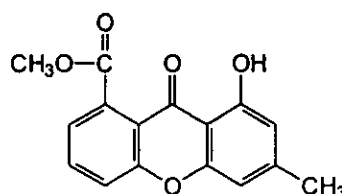


- (1)  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = H, R_5 = CH_3$   
 (2)  $R_1 = CH_3O, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = H, R_5 = CH_3$   
 (3)  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = H, R_5 = H$   
 (4)  $R_1 = CH_3O, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = H, R_5 = H$   
 (6)  $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = CH_3, R_5 = H$   
 (7)  $R_1 = CH_3O, R_2 = CH_3, R_3 = H, R_4 = CH_3, R_5 = H$

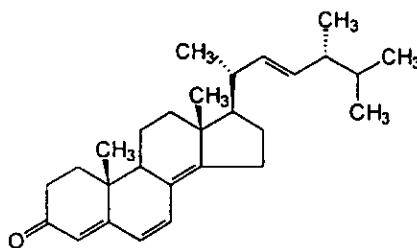
- (5)  $R = CH_3$   
 (11)  $R = H$



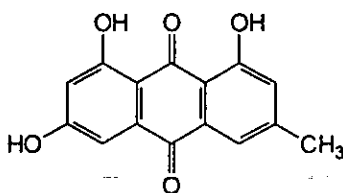
- (8)  $R = H$   
 (14)  $R = CH_3$



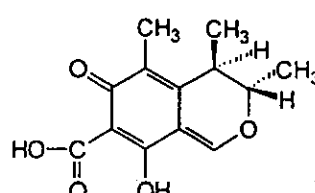
(9)



(10)



(12)



(13)

extract led to the isolation of two new naphthopyranone derivatives identified as (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (6), and (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one (7). In addition, compounds 1-5, rubrofusarin B (11), emodin (12), citrinin (13), *p*-hydroxybenzoic acid methyl ester (14), *p*-hydroxybenzoic acid (8) 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester (9) and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (10) were obtained. Compounds 8-10 are new to this species. Compounds 1-5 were identified by comparison with authentic samples (Macías et al., 2000) and compounds 8 and 10 were identified from their IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data, which were identical to those

previously described in the literature (Porter et al., 1975; Seitz and Paukstelis, 1977).

## 2.2. Structure elucidation of compounds 6 and 7

The molecular formulae of compounds 6 and 7 were established as C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> and C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, respectively, by HREIMS and were identical to those of compounds 1 and 2, respectively, suggesting that each set of compounds were isomers. The uni and bidimensional NMR (Table 2) spectra of compounds 6 and 7 were almost identical to those of 1 and 2, respectively (Macías et al., 2000) indicating that the new natural products have the same 2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one skeleton and that the position of the hydroxy and

Table 1  
Phytogrowth-inhibitory activity of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract and isolated compounds from *Guanomyces polythrix* on radicle elongation (IC<sub>50</sub> M) of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*

Compound	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Echinochloa crusgalli</i>
Extract	54.3 <sup>a</sup>	384.3 <sup>a</sup>
6	1.1 × 10 <sup>-4</sup>	1.3 × 10 <sup>-4</sup>
7	7.5 × 10 <sup>-5</sup>	7.0 × 10 <sup>-5</sup>
8	1.7 × 10 <sup>-5</sup>	2.3 × 10 <sup>-4</sup>
9	1.5 × 10 <sup>-5</sup>	9.8 × 10 <sup>-6</sup>
10	8.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.7 × 10 <sup>-4</sup>
2,4-D <sup>b</sup>	1.8 × 10 <sup>-4</sup>	8.8 × 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup> Expressed in µg/ml.

<sup>b</sup> Positive standard control.

methoxyl groups along the dihydronaphthopyrone core was the same. The most obvious differences between the NMR spectra of 6 and 7 and those of 1 and 2 were: (i) the chemical shifts and coupling constants of the methines attributable to H-2/C-2 [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.59 (*dq*,  $J=6.5, 3.5$  Hz)/75.26 in 6 and 4.66 (*dq*,  $J=3.5, 10$  Hz)/75.73 in 7 vs 4.20 (*dq*,  $J=6.5, 10$  Hz)/78.0 in 1 and 4.28 (*dq*,  $J=6.5, 10$  Hz)/78.3 in 2]; and (ii) the chemical shift values of the methyl groups at C-2 and C-3 [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1.40/16.38 (C-11), 1.22/9.6 (C-12) in 6 and 1.45/16.4 (C-11), 1.24/9.6 (C-12) in 7 vs 1.50/19.8 (C-11), 1.26/10.4 (C-12) in 1 and 1.57/19.8 (C-11), 1.28/10.8 (C-12) in 2]. The small  $J_{2,3}$  value (3 Hz) clearly indicated that the methyl groups at C-2 and C-3 in 6 and 7 were *cis* rather than *trans* as in 1 and 2. The CD spectra of 6 and 7 showed a

negative Cotton effect around 314 nm, supporting the depicted 2*S* absolute configuration (Gaffield, 1970; Macías et al., 2000). Automatically the configuration at C-3 was established as *R* due to the *cis* relationship of the methyl groups. Altogether, these observations revealed that compounds 6 and 7 were the corresponding epimers at C-3 of compounds 1 and 2, respectively. Consequently compounds 6 and 7 were identified as (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-H-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one, and (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-H-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one.

### 2.3. X-ray crystallographic analysis of compound 9

The structure of compound 9 was unequivocally established as 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester by X-ray crystallography. The ORTEP-like view as obtained by the single-crystal X-ray analysis is shown in Fig. 1. Except for the ester group, the compound is planar (root-mean-square-deviation 0.048 Å). The mean plane defined by the atoms of the methyl ester is almost perpendicular (77.9°) to the plane of the tricyclic moiety. The hydroxyl group at C-8 is intramolecularly hydrogen bonded [O1-H1...O2 1.83(3) Å]. In the crystal, molecules of 9 stack into columns along the *c* axes in an anti-parallel fashion with an adjacent molecule, while the main molecule axis makes an angle of 65.8° in the opposite direction. Both types of stacking are almost perfect, as judging the

Table 2  
NMR spectral data for (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-H-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (6), and (2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-H-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (7)<sup>a</sup>

Position	6				7			
	<sup>13</sup> C (δ)	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)	NOESY	HMBC	<sup>13</sup> C (δ)	$\delta_{\text{H}}$ ( $J_{\text{HH}}$ in Hz)	NOESY	HMBC
1								
2	75.26	4.59 <i>dq</i> , (6.5, 3.5)	CH <sub>3</sub> -11, H-3, CH <sub>3</sub> -12	3, CH <sub>3</sub> -11,	75.73	4.66 <i>dq</i> , (3.5, 6.5)	CH <sub>3</sub> -11, H-3, CH <sub>3</sub> -12	3, CH <sub>3</sub> -11,
3	44.93	2.69 <i>dq</i> , (7.5, 3.5)	CH <sub>3</sub> -12, H-2, CH <sub>3</sub> -11	2, CH <sub>3</sub> -12	44.96	2.75 <i>dq</i> , (3.5, 7.0)	CH <sub>3</sub> -12, H-2, CH <sub>3</sub> -11	2, CH <sub>3</sub> -12
4	201.84			2, 3, CH <sub>3</sub> -12	201.69			2, 3, CH <sub>3</sub> -12
4a	103.50		1	3, OH-5, 10	102.84			3, OH-5
5	165.49			OH-5	161.68			OH-5
5a	107.71			OH-5, 7, 9, 10	107.12			OH-5, 7, 9
6	161.27			7, OCH <sub>3</sub> -6	161.54			7, OCH <sub>3</sub> -6
7	96.41	6.29 <i>d</i> , (2.5)	9, OCH <sub>3</sub> -6	9	92.59	6.34 <i>d</i> , (2.0)	9, OCH <sub>3</sub> -9	9
8	162.38			7, OCH <sub>3</sub> -8, 9	162.75			7, OCH <sub>3</sub> -8, 9
9	98.27	6.55 <i>d</i> , (2.5)	7, 10, OCH <sub>3</sub> -8	7, 10	96.79	6.91 <i>d</i> , (2.0)	7, 10, OCH <sub>3</sub> -8, OCH <sub>3</sub> -10	7
9a	143.31			9, 10	131.99			9
10	101.30	6.50 <i>s</i>	9	9	162.75			9
10a	155.81			2, 10	138.3			2
CH <sub>3</sub> -11	16.38	1.40 <i>d</i> , (6.5)	H-2, H-3, CH <sub>3</sub> -12	2, 3	16.44	1.45 <i>d</i> , (6.5)	H-2, H-3, CH <sub>3</sub> -12	2, 3
CH <sub>3</sub> -12	9.58	1.22 <i>d</i> , (7.5)	H-3, H-2, CH <sub>3</sub> -11, OH-5	3, 2	9.62	1.24 <i>d</i> , (7.0)	H-3, H-2, CH <sub>3</sub> -11, OH-5	3, 2
OCH <sub>3</sub> -6	55.99	3.96 <i>s</i>	7	7	56.14	3.97 <i>s</i>	7	7
OCH <sub>3</sub> -8	55.36	3.89 <i>s</i>	9	9	55.51	3.95 <i>s</i>	9	9
OCH <sub>3</sub> -10			CH <sub>3</sub> -12		60.64	3.88 <i>s</i>	9	9
OH-5		14.41 <i>s</i>				14.23 <i>s</i>	CH <sub>3</sub> -12	

<sup>a</sup> Spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 500 MHz and <sup>13</sup>C, 125 MHz).



Table 3  
Retention of phytotoxic compounds (1–14) from *Guanomyces polythrix* in a calmodulin-agarose column

Compound	µg the compound retained in the agarose column				
	Tris-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH = 7.0	Tris-HCl 20 mM 1 mM EGTA pH = 7.0	Tris-HCl 20 mM 1 mM CaCl <sub>2</sub> pH = 8.0	NaCl 1 M	Urea 6 M
1	10.0±0.0056	10.0±0.0021	10.0±0.0045	10.0±0.0014	10.0±0.0041
2	10.0±0.0089	10.0±0.0033	10.0±0.0074	10.0±0.0022	10.0±0.0021
3	10.0±0.0026	10.0±0.0054	10.0±0.0042	10.0±0.0021	10.0±0.0024
4	10.0±0.0051	10.0±0.0048	10.0±0.0041	10.0±0.0081	10.0±0.0021
5	10.0±0.0056	10.0±0.0074	10.0±0.0023	10.0±0.0045	10.0±0.0052
6	10.0±0.0045	10.0±0.0024	10.0±0.0030	10.0±0.0040	10.0±0.0075
7	10.0±0.0058	10.0±0.0016	10.0±0.0025	10.0±0.0078	10.0±0.0028
8	10.0±0.0046	6.9±0.0024	6.9±0.0021	6.9±0.0033	0.0±0.0038
9	10.0±0.0059	2.8±0.0058	2.8±0.0019	0.0±0.0021	0.0±0.0045
10	10.0±0.0023	10.0±0.0056	10.0±0.0080	10.0±0.0054	10.0±0.0021
11	10.0±0.0019	10.0±0.0089	10.0±0.0049	10.0±0.0047	10.0±0.0084
12	10.0±0.0027	10.0±0.0026	10.0±0.0026	10.0±0.0087	10.0±0.0012
13	6.0±0.0074	6.0±0.0052	6.0±0.0074	6.0±0.0045	6.0±0.0027
14	10.0±0.0088	7.1±0.0018	7.1±0.0022	7.1±0.0038	0.0±0.0050
Quercetin	10.0±0.0051	6.2±0.0038	6.2±0.0058	6.2±0.0074	0.0±0.0022

transduction during germination and plant growth modulating the activity of several important plant enzymes (Snedden and Fromm, 1998). Thus, continuing with our search of potential herbicides agents that could interact with CaM, the phytotoxic compounds were further evaluated for their ability to bind spinach and bovine brain Ca<sup>2+</sup>-CaM complex. The interaction of any compound with Ca<sup>2+</sup>-CaM complex alters its conformation and changes its electrophoretic mobility as detected in a SDS-PAGE electrophoresis (Leung et al., 1984, 1985). Fig. 2 shows that spinach CaM treated with Ca<sup>2+</sup> (1 mM) and the isolates (0.033 µg/ml) had a lower electrophoretic mobility than untreated calmodulin. The strongest effect was observed with compound 7. The mobility shift of bovine brain CaM (Fig. 2) in the presence of compounds 6–10 was similar to that of spinach CaM. Once more compound 7 exerted the strongest effect.

According to the results shown in Fig. 2 and those previously reported for compounds 1–5 and 11–14 (Macías et al., 2000), the interaction of compounds 1–14 with both spinach and bovine-brain CaMs could be irreversible (covalent), although the denaturing conditions in the SDS-PAGE electrophoresis would release any phytotoxin bound non-covalently. Thus, to obtain more information about the nature (covalent vs noncovalent) of the interaction of compounds 1–14 with CaM, an affinity-based chromatographic procedure employing a bovine brain CaM-agarose column was used (Bonza et al., 1998). After application of the phytotoxic compounds, the CaM-agarose column was eluted under non-denaturing (buffers I and II) and denaturing conditions (buffers III, NaCl and urea). In all cases, the eluents were analyzed spectrophotometrically to detect quantitatively the amount of bound compound (Table 3). According to the results summarized in Table 3, the interaction of

compounds 1–7 and 10–12 with bovine brain CaM is irreversible (covalent). These phytotoxins remained attached to the CaM-agarose complex after extensive washing in non-denaturing and denaturing conditions. Compounds 8, 9, 14 and quercetin, however, were initially absorbed by the CaM-agarose conjugate, subsequently partially eluted with EGTA [ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid] containing buffer II and then totally removed on addition of urea 6M. The last set of results indicated that the interaction of 8, 9, 14 and quercetin with bovine brain CaM requires calcium and that the nature of the binding is non covalent. Finally, compound 13 showed a different elution profile and almost half of the phytotoxin remains attached to the CaM-agarose matrix after eluting in different conditions.

The aromatic compounds from *G. polythrix* interact directly with bovine brain and spinach CaM suggesting that these compounds may exert their phytotoxic action by inhibiting CaM-dependent process, although they could also interfere with other cellular metabolic phenomena. Affinity chromatography on CaM-agarose beads indicated that in most cases the interaction is covalent. Apparently the phytotoxins interact with the protein at different binding sites. Further work with calmodulin dependent enzymes will provide new insight about the interaction sites.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained

1 using KBr disks on a Perkin-Elmer FT 1605 spectro-  
 2 photometer. UV spectra were obtained on a Lambda II  
 3 UV spectrometer in MeOH solution. Optical rotations  
 4 were taken on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. CD spec-  
 5 tra were performed on a JASCO 720 spectropolarimeter  
 6 at 25 °C in MeOH solution. NMR spectra including  
 7 COSY spectra, NOESY, HMBC and HMQC experi-  
 8 ments were recorded on a Bruker DMX500, in CDCl<sub>3</sub>,  
 9 either at 500 (<sup>1</sup>H) or 125 (<sup>13</sup>C) MHz, using tetra-  
 10 methylsilane (TMS) as an internal standard. EI mass  
 11 spectra were performed using a JEOL SX 102 mass spec-  
 12 trometer. X-ray analysis of compound 9 was accom-  
 13 plished on a Siemens P4/PC diffractometer equipped with  
 14 graphite-monochromated radiation. Open column  
 15 chromatography: silica gel 60 (70–230 mesh, Merck).  
 16 Analytical and preparative TLC were performed on pre-  
 17 coated silica gel 60 F254 plates (Merck).

### 19 3.2. Fungal material

21 The fungus *G. polythrix* was isolated from bat guano  
 22 in Tepozotlán, Morelos, México. Voucher specimens  
 23 (24486) have been deposited in the National Herbarium  
 24 (MEXU), Instituto de Biología, Universidad Nacional  
 25 Autónoma de México, México D.F and in the mycolo-  
 26 gical collection of the Department of Plant Pathology  
 27 (GAM 5803) University of Georgia, Athens, GA, USA.

28 Ten 2-l Erlenmeyer flasks, each containing 1000 ml of  
 29 potato dextrose broth (PDB, Difco), were individually  
 30 inoculated with one 1-cm<sup>2</sup> agar plug taken from a stock  
 31 culture of *G. polythrix* maintained at 4 °C on potato  
 32 dextrose agar (Difco). Flask cultures were incubated in  
 33 static conditions at 28 °C for 30 days.

### 34 3.3. Extraction and isolation

36 After incubation, the flask contents were combined  
 37 and filtered. The culture filtrate (10 l) was extracted  
 38 exhaustively with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 l). The combined  
 39 organic phase was filtered over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and  
 40 concentrated in vacuo to give a green solid (615.6 mg).  
 41 In addition, the mycelium was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
 42 (3 × 2 l). The combined mycelial extract was evaporated  
 43 to yield 1.9 g of a green solid. The extracts (culture and  
 44 mycelial) were combined (2.5 g) and subjected to col-  
 45 umn chromatography on silica gel (50 g) eluting with a  
 46 gradient of hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:5→0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–  
 47 MeOH (9.9:0.1→0:10). Four hundred and fifty frac-  
 48 tions (30 ml each) were collected and pooled on the basis of  
 49 their TLC profiles to yield 12 major fractions (FI–  
 50 FXII). Bioactivity in the phyto-growth bioautographic  
 51 bioassay (BPIB) showed five active pools: FIV (38.1  
 52 mg), FV (95.7 mg), FVI (105.4 mg), FVII (49.8 mg) and  
 53 FVIII (77.6 mg). Active fraction FIV, eluted with hexane–  
 54 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:8), was resolved by preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
 55 to yield 9 (5.2 mg). Phytotoxic fraction FV, eluted with

57 hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:9), was applied to a silica gel (10 g)  
 58 column which was eluted with a gradient of hexane–  
 59 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:5→0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (9.9:0.1→5:5).  
 60 Ten secondary fractions were obtained (FV-1–FV-10).  
 61 According to the BPIB, the phytotoxic activity was con-  
 62 centrated in secondary FV-5, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.  
 63 Extensive TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) of fraction FV-5 yielded 6 (5.2  
 64 mg) and 7 (4.6 mg), 1 (9.8 mg), 2 (5.1 mg), 3 (4.1 mg)  
 65 and 4 (3.2 mg). Primary fraction FVI, eluted with  
 66 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, was further resolved on another silica gel (15 g)  
 67 column using the same elution system as for fraction FV  
 68 to yield eight secondary fractions (FVI-1–FVI-8). The  
 69 phytotoxic activity was found in secondary fraction FVI-  
 70 6, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (99:1). Further purification  
 71 of this fraction by successive preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
 72 yielded 10 (13.5 mg), 5 (3.5 mg), 11 (3.8 mg) and 14 (4.0  
 73 mg). From active fraction FVII, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–  
 74 CH<sub>3</sub>OH (99:1), spontaneously crystallized 12 (5.2 mg).  
 75 Finally, fraction FVIII, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>OH  
 76 (97:3), was resolved by preparative TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–  
 77 CH<sub>3</sub>OH (97:3)] to render compounds 8 (5.3 mg) and 13  
 78 (15.2 mg).

### 80 3.4. Spectral data of compounds

82 Compound 6 [(2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-  
 83 dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho[2,3-*b*]pyran-4-one].  
 84 Yellow crystalline needles, mp 165–166 °C; [α]<sub>D</sub> +128°  
 85 (MeOH; *c* 1); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm (log ε) 409.5 (3.85),  
 86 320 (3.97), 277.5 (4.54), 252 (4.19), 235 (4.43), 214 (4.26),  
 87 209 (4.27); CD (MeOH) Δε (nm) –1.5 × 10<sup>4</sup> (314); IR ν<sub>max</sub>  
 88 (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3500, 1638, 1610; EIMS *m/z* 302 [M<sup>+</sup> (100)],  
 89 246 (90), 218 (12), 203 (6), 190 (19); HRMS *m/z* 302.330  
 90 (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, 302.322); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR  
 91 (Table 2).

92 Compound 7 [(2*S*, 3*R*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-  
 93 2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4-*H*-naphtho-[2,3-*b*]pyran-4-  
 94 one]. Yellow solid, mp 154–156 °C; [α]<sub>D</sub> +150° (MeOH;  
 95 *c* 1); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm (log ε) 411 (3.34), 320 (3.46),  
 96 277.5 (4.07), 252 (3.71), 235 (3.96), 214 (4.28), 209  
 97 (4.29); CD (MeOH) Δε (nm) –1.6 × 10<sup>4</sup> (314); IR ν<sub>max</sub>  
 98 (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3500, 1638, 1610; EIMS *m/z* 332 [M<sup>+</sup> (98)],  
 99 317 (90), 261 (100), 233 (66), 218 (14); HRMS *m/z*  
 100 332.351 (calc. for C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, 332.348). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C  
 101 NMR (Table 3).

102 Compound 9 [8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xan-  
 103 thene-1-carboxylic acid methyl ester]. Pale yellow nee-  
 104 dles, mp 197–198 °C; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm 233, 256,  
 105 289, 300, and 360; IR ν<sub>max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup> 3148, 1732 and  
 106 1650; EIMS *m/z* (rel. int.): 284 [M<sup>+</sup> (48)], 252 (100), 223  
 107 (14), 139 (8), 127 (8), 77 (9); <sup>13</sup>C NMR NMR (CHCl<sub>3</sub>,  
 108 125 MHz) δ 180.44 (C-9), 169.66 (CH<sub>3</sub>OOC-8), 161.45  
 109 (C-1), 156.02 (C-8), 155.69 (C-4a), 149.39 (C-3), 134.75,  
 110 133.61 (C-10a), 122.50 (C-7), 119.40 (C-5), 117.57 (C-8),  
 111 111.73 (C-2), 107.38 (C-4), 106.99 (C-9a), 133.61 (C-  
 112 10a), 53.09 (CH<sub>3</sub>OOC-8), 22.62 (CH<sub>3</sub>-3).

Fig. 3. Author please supply.

### 3.5. X-ray crystallographic analysis of compound 9

Suitable crystal of **9** was obtained from EtOAc by slow evaporation. The crystal belongs to the monoclinic system, space group C2/c with  $a=21.014(1)$  Å,  $b=10.4145(3)$  Å,  $c=13.5140(4)$  Å,  $\beta=114.57(5)$  °,  $Z=8$ ,  $V=2689.75(17)$  Å<sup>3</sup>,  $D_c=1.404$  g cm<sup>-3</sup>, and  $\mu(\text{CuK}\alpha)=0.882$  mm<sup>-1</sup>. Of the 3733 reflections collected, only 1809 were used for structural analysis. The structure was solved by direct methods (SIR92) (Altomare et al., 1994) and refined by the full matrix-least squares methods using SHELXTL97 (Sheldrick, 1997) based on  $F^2$  to a final  $R=0.046$  and  $R_w=0.134$  with  $w^{-1}=[\sigma^2(F_o^2)+(0.0779P)^2+1.1731P]$  where  $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ . The hydrogen atoms attached to carbon atoms were included at idealized positions following a riding model, the hydrogen atom of the hydroxyl group was identified by difference Fourier methods and its positional parameters refined.

Crystallographic data for the structure reported in this paper have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax: +44-1223-336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

### 3.6. Bioassays

#### 3.6.1. Phytogrowth-inhibitory bioassays

The phytogrowth inhibitory activity of the extract and pure compounds was evaluated on seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv by using a Petri dish bioassay (Mata et al., 1998). In addition, a direct bioautographic bioassay system was employed to guide secondary fractionation and speed up the isolation of active compounds. The direct bioautographic assay was carried out as previously described. The results were analyzed by ANOVA ( $P<0.05$ ), and  $IC_{50}$  values were calculated by Probit analysis based on per-

cent of radicle growth or germination inhibition. The extract was evaluated at 10, 100 and 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The pure compounds were tested at 1, 10 and 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . 2,4-D was used as the positive control. The bioassays were performed at 28 °C.

#### 3.6.2. SDS-PAGE of compounds 1–5 with spinach and bovine brain calmodulins

The interaction of the isolated compounds with both spinach and brain calmodulins (Sigma) was performed using SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE was done according to previously described procedures using 15% polyacrylamide gels (Leung, et al., 1984, 1985; Liao et al., 1996). The interaction of the phytotoxins with both calmodulins was determined by observing the difference in electrophoretic mobility in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The experimental conditions are described briefly in the legend of Fig. 3. In each case the electrophoresis run was done in triplicate. Quercetin was used as the positive control (Nishino et al., 1984).

#### 3.6.3. CaM affinity chromatography

The non-reversible effect of the compounds was determined by affinity chromatography employing a bovine brain calmodulin-agarose (SIGMA) column (Bonza et al., 1998). One milligram of each compound was dissolved in 1 ml of DMSO and 10  $\mu\text{l}$  of this mixture was loaded to 200  $\mu\text{l}$  bed volume of calmodulin-agarose previously equilibrated with buffer I (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ). The column was eluted consecutively with five volumes of buffer I, five volumes of buffer II (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EGTA), five volumes of buffer III (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ), five volumes of NaCl 1 M and five volumes of urea (6M). In each case aliquots of 200  $\mu\text{l}$  were collected, concentrated in vacuo and analyzed spectrophotometrically to determine the retention of each compound. 3,4'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl, obtained from *Scahyglottis livida* (Estrada et al., 1999), was used as a negative control since this compound was not retained in the column after eluting with buffer I.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACyT (27978N) and DGAPA IN207300. We wish to thank the following people: Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Luis Velasco-Ibarra, Javier Pérez Flores and Rocio Patiño (Instituto de Química, UNAM) for recording MS and CD spectra Marisela Gutiérrez and Graciela Chávez for registration of Irand UV spectra. The technical assistance of Samuel Aguilar Ogarrio, Isabel Rivero-Cruz and Laura Acevedo is also acknowledged. M. Macías acknowledges the fellowship awarded by CONACyT to carry out graduate studies.

## References

- Altomare, A., Cascarano, G., Giacobozzo, C., Guagliardi, A., Burla, M.C., Polidori, G., Camalli, M., 1994. SIR92- A Program for automatic solution of crystal structures by direct methods. *J. Appl. Cryst.* 27, 435.
- Bonza, C., Carnelli, A., De Michelis, M.I., Rasi-Caldogno, F., 1998. Purification of the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase from radish seedlings by calmodulin-agarose affinity chromatography. *Plant Physiol.* 116, 845-851.
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., Mata, R., 1999. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Med.* 65, 109-114.
- Gaffield, W., 1990. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. *Tetrahedron* 26, 4093-4108.
- Hideaki, K., Takeshi, S., 1986. Isolation of moniliphenone, a key intermediate in xanthone biosynthesis from *Monilinia fructicola*. *J. Agric. Food Chem.* 50 (6), 1671-1699.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tripton, C.L., 1984. Ophiobolin A a natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.* 259, 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 Physiol* 77, 303-308.
- 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. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 53-60.
- Macias, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Mata, R., 2000. Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *J. Nat. Prod.* 63, 757-761.
- Mata, R., Macias, M., Rojas, S., Lotina-Hennsen, B., Toscano, R., Anaya, A., 1998. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry* 49, 441-449.
- Nishino, H., Naitoh, E., Iwashima, A., Umezawa, K., 1984. Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein. *Experientia* 40, 184-185.
- Porter, K., Bacon, C., Robinson, J., Higman, H., 1975. A Field indicator in plants associated with ergot-type toxicities in cattle. *J. Agric. Food Chem.* 23, 771-775.
- Seitz, L., Paukstelis, J., 1977. Metabolites of *Alternaria alternata*: Ergosterol and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. *J. Agric. Food Chem.* 25, 838-841.
- Sheldrick, G.M., 1997. SHELXTL97: Program for Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany.
- Snedden, W.A., Fromm, H., 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci.* 3, 299-304.

# Phytotoxic Compounds from the New Coprophilous Fungus *Guanomyces polythrix*<sup>1</sup>

Martha Macías,<sup>†</sup> Miguel Ulloa,<sup>‡</sup> Alicia Gamboa,<sup>§</sup> and Rachel Mata<sup>\*,†</sup>

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, México, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, México, and Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, México

Received October 20, 1999

Bioactivity-directed fractionation of the fermentation broth and mycelium of the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix* led to the isolation of several phytotoxic compounds, including five new naphthopyranone derivatives (1–5). In addition, rubrofusarin B, emodin, citrinin, and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester were obtained. The structures of the new compounds were established by spectral and chiroptical methods. The isolates caused significant inhibition of radicle growth of two weed seedlings (*Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*) and interacted with both spinach and bovine brain calmodulins.

As a part of our search for potential herbicide agents from natural sources, we describe in this investigation the isolation and structure elucidation of the major phytotoxic principles from the culture broth and mycelium of the new coprophilous fungus *G. polythrix*. In addition, the potential role of calmodulin as molecular target of the phytotoxic action of the isolated compounds was investigated. Calmodulin is a highly conserved calcium-modulated protein that appears to be ubiquitous among eukaryotes. In plants, this protein is a fundamental component of calcium signal transduction pathways during germination and plant growth. It modulates the activity of several important plant enzymes such as NAD-kinase, glutamate decarboxylase, and Ca<sup>2+</sup>-ATPase.<sup>2–4</sup> Plant calmodulins share many structural and functional features with their homologues from animals, but the expression of multiple protein isoforms appears to be a distinctive feature of higher plants. Therefore, calmodulin and the proteins it regulates could be important targets for the action of many phytotoxins. In this context, it has been previously described that some fungal phytotoxins such as ophiobolin A<sup>5,6</sup> and several plant aromatic compounds<sup>7,8</sup> interact with calmodulin and inhibit its enzyme activator properties.

*G. polythrix* is a new species of coprophilous fungus related to the genus *Chaetomium* (Chaetomiaceae). Morphological, physiological, and molecular studies on this fungus revealed that it belongs to a new genus. Its description will be published soon.<sup>9</sup> The new fungus was isolated in 1979, from bat guano obtained from zone III of the cave "Cueva del Diablo" or "Ocotliltlán", in Tepozotlán, Morelos, México.

## Results and Discussion

The new fungus *G. polythrix* was grown in liquid-substrate fermentation on potato dextrose broth (PDB). The culture broth and the mycelium were extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined extract showed phytotoxic activity (Table 1) when evaluated on seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. using a Petri dish bioassay.<sup>10</sup> Bioactivity-guided fraction-

**Table 1.** Phytogrowth-Inhibitory Activity of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Extract and Isolated Compounds from Coprophilous Fungus on Radicle Elongation (IC<sub>50</sub>, M) of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*

compound	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
extract	54.3 <sup>a</sup>	384.3 <sup>a</sup>
1	1.0 × 10 <sup>-4</sup>	1.2 × 10 <sup>-4</sup>
2	6.5 × 10 <sup>-5</sup>	6.1 × 10 <sup>-5</sup>
3	2.3 × 10 <sup>-5</sup>	8.7 × 10 <sup>-5</sup>
4	1.3 × 10 <sup>-5</sup>	4.0 × 10 <sup>-5</sup>
5	8.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.7 × 10 <sup>-4</sup>
6	1.3 × 10 <sup>-5</sup>	8.7 × 10 <sup>-5</sup>
7	1.3 × 10 <sup>-4</sup>	2.0 × 10 <sup>-5</sup>
8	5.5 × 10 <sup>-5</sup>	6.3 × 10 <sup>-5</sup>
9	2.3 × 10 <sup>-5</sup>	6.3 × 10 <sup>-4</sup>
2,4-D <sup>b</sup>	1.8 × 10 <sup>-4</sup>	8.8 × 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup> Expressed in µg/mL. <sup>b</sup> Positive control (2,4-dichlorophenoxy-acetic acid).

ation of this extract led to the isolation of nine phytotoxins (see Experimental Section). Compounds 1–5 are new natural products and were characterized by spectroscopic and chiroptical methods as (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (1); (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (2); (2*S*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4*H*-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (3); (2*S*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2-methyl-4*H*-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (4); and 5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (5). In addition, the known compounds rubrofusarin B (6),<sup>11–13</sup> emodin (7),<sup>14,15</sup> citrinin (8),<sup>16,17</sup> and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester (9)<sup>18</sup> were obtained. The spectral properties of the known compounds, including IR, <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, were identical to those previously described in the literature.

Compound 1 has a molecular formula of C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> (nine unsaturations) as inferred from HREIMS and <sup>13</sup>C NMR. The NMR spectra (Table 2) were similar to those of other 2,3-dihydronaphthopyran derivatives.<sup>19</sup> These spectra demonstrated the presence of a carbonyl group; a chelated hydroxyl functionality; two methoxyl groups; two *m*-related and one isolated aromatic protons; two methyl groups, each attached to an aliphatic methine; and several nonprotonated sp<sup>2</sup> carbons. From the <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY spectrum, the methines [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.20 (dq, *J* = 10.5, 6.5 Hz, H-2) and 2.65

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: (525) 622-5289. Fax: (525) 622-5329. E mail: rachel@servidor.unam.mx.

<sup>†</sup> Facultad de Química.

<sup>‡</sup> Instituto de Biología.

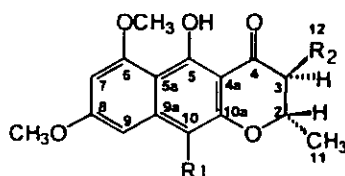
<sup>§</sup> Instituto de Ecología.



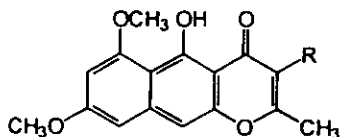
**Table 2.** NMR Data for (2*S*,3*S*)-5-Hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (1)<sup>a</sup>

position	<sup>13</sup> C (δ)	<sup>1</sup> H (δ, mult., <i>J</i> in Hz)	NOESY	HMBC
1				
2	78.01	4.20 (dq, 6.5, 10.0)	11-CH <sub>3</sub> , 3-H, 12-CH <sub>3</sub>	3, 11-CH <sub>3</sub>
3	46.43	2.65 (dq, 6.5, 10.0)	12-CH <sub>3</sub> , 2-H, 11-CH <sub>3</sub>	2, 12-CH <sub>3</sub>
4	200.06			2, 3, 12-CH <sub>3</sub>
4a	102.99			3, OH-5, 10
5	165.11			OH-5
5a	107.17			OH-5, 7, 9, 10
6	161.28			7, 6-OCH <sub>3</sub>
7	96.39	6.27 (d, 2.5)	9, 6-OCH <sub>3</sub>	9
8	162.30			7, 8-OCH <sub>3</sub> , 9
9	98.27	6.43 (d, 2.5)	7, 10, 8-OCH <sub>3</sub>	7, 10
9a	143.30			9, 10
10	101.22	6.48 (s)	9	9
10a	156.00			2, 10
CH <sub>3</sub> -11	19.75	1.50 (d, 6.5)	2-H, 3-H, 12-CH <sub>3</sub>	2, 3
CH <sub>3</sub> -12	10.44	1.26 (d, 7.0)	3-H, 2-H, 11-CH <sub>3</sub> , 5-OH	3, 2
OCH <sub>3</sub> -6	56.00	3.96 (s)	7	
OCH <sub>3</sub> -8	55.34	3.88 (s)	9	
OH-5		14.49 (s)	12-CH <sub>3</sub>	

<sup>a</sup> Spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 500 MHz and <sup>13</sup>C, 125 MHz).



- 1 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>
- 2 R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>O, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>
- 3 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H
- 4 R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>O, R<sub>2</sub> = H



- 5 R = CH<sub>3</sub>
- 6 R = H

(dq, *J* = 10.5, 6.5 Hz, H-3)/78.0 and 46.4] were adjacent, and the coupling constant value (*J* = 10.5 Hz) indicated a *trans*-diaxial relationship. cursory inspection of the NOESY and HMBC spectra (see Table 2) indicated the position of the methoxy, hydroxy, and methyl groups on the dihydronaphthopyranone skeleton. The application of chiroptical methods for the assignment of the absolute configuration of benzo- $\gamma$ -dihydropyrone such as flavanones and 4-hydroxyflavanones is well documented.<sup>20</sup> In flavanones, the configuration 2*S* shows a positive Cotton effect around 330 nm; conversely, the configuration 2*R* shows a negative Cotton effect in the same region. The presence of a *trans* hydroxy group at C-3 does not modify the relation between the sign and configuration. Thus, the stereogenic centers C-2 and C-3 were each determined to have the *S* absolute configuration on the basis of the negative Cotton effect around 314 nm in the CD spectrum.<sup>20</sup>

Compound 2 had the composition C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> (nine unsaturations) as determined by HREIMS and <sup>13</sup>C NMR, differing from 1 by 30 mass units. This observation, as well as the NMR data (Table 3), suggested that 2 was the C-10 methoxy derivative of 1. The NMR spectra of 2 were almost identical with those of 1, except for the presence of an additional methoxyl signal ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3.89/60.6) in place of the isolated aromatic proton signal. As in the case of compound 1, the disposition of the substituents along the 2,3-dihydronaphthopyranone nucleus was established by the analysis of the NOESY and HMBC correlations (see Table 3).

The strong interactions observed both in the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and NOESY spectra between the signal at  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (H-9) and those at  $\delta_{\text{H}}$  3.94 and 3.89 (CH<sub>3</sub>O-8 and CH<sub>3</sub>O-10, respectively) were consistent with the placement of the third methoxyl group at C-10. Once more, the absolute stereochemistry at C-2 and C-3 was assigned on the basis of the negative Cotton effect around 314 nm in the CD spectrum.<sup>20</sup> Consequently, the structure of compound 2 was determined to be (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one.

The HREIMS of compounds 3 and 4 showed the molecular ions at *m/z* 288.0992 and 318.1108, respectively, and, together with the <sup>13</sup>C NMR, indicated the molecular formulas of C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> and C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>, respectively. The NMR and CD characteristics of 3 and 4 (see Experimental Section) were highly similar to those of 1 and 2, respectively. In the NMR spectra of 3 and 4, signals attributable to a methylene group replaced those corresponding to the methyl and methine groups at C-3 of 1 and 2. In addition, a marked difference in chemical shift for H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.60 in both cases) was observed. The CD spectra of both compounds again showed a negative Cotton effect around 314 nm, supporting the depicted 2*S* absolute configuration. These observations, in conjunction with the data obtained using the same array of NMR techniques as in the structure determination of 1 and 2, allowed the identification of compounds 3 and 4 as (2*S*)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4*H*-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one and (2*S*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2-methyl-4*H*-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one, respectively.

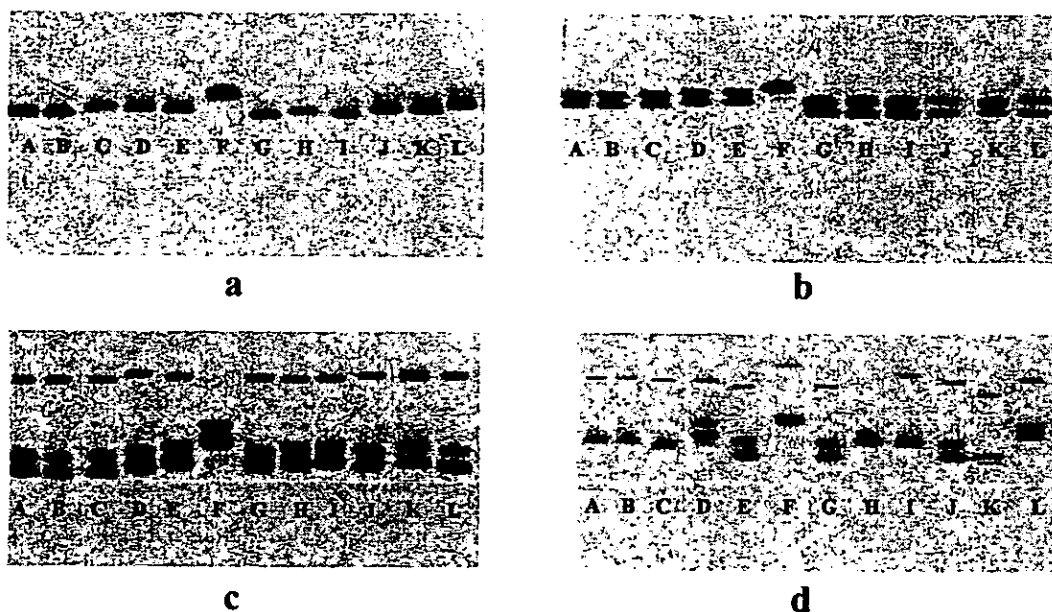
HREIMS and NMR data for compound 5 indicated a molecular formula of C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub> (ten unsaturations) differing from 1 by two mass units. This observation, as well as the NMR spectra (see Experimental Section), suggested that 5 was the 2,3-dehydro derivative of 1. The most obvious difference between the NMR spectra of 5 and 1 is the presence of two nonprotonated vinylic signals ( $\delta_{\text{C}}$  167.4 and 119.2) in 5, instead of the resonances attributed to H-2/C-2 and H-3/C-3 in 1. In addition, the chemical shift values for the methyl groups on the pyrone ring were shifted paramagnetically in comparison to those in 1. Thus, the structure of compound 5 was established as 5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one.

Natural products 1-9 were evaluated for their ability to inhibit seed germination and seedling growth of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*. Table 1 summarizes the

**Table 3.** NMR Data for (2*S*,3*S*)-5-Hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-2,3-dihydro-4*H*-naphtho[2,3-*b*]-pyran-4-one (2)<sup>a</sup>

position	<sup>13</sup> C (δ)	<sup>1</sup> H (δ, mult., <i>J</i> in Hz)	NOESY	HMBC
1				
2	78.32	4.28 (dq, 6.5, 10.0)	11-CH <sub>3</sub> , 3-H, 12-CH <sub>3</sub>	3, 11-CH <sub>3</sub>
3	46.54	2.68 (dq, 7.0, 10.0)	12-CH <sub>3</sub> , 2-H, 11-CH <sub>3</sub>	2, 12-CH <sub>3</sub>
4	200.09			2, 3, 12-CH <sub>3</sub>
4a	102.65			3, OH-5, 10
5	161.63			OH-5
5a	106.95			OH-5, 7, 9
6	161.20			7, 6-OCH <sub>3</sub>
7	92.59	6.34 (d, 2.5)	9, 6-OCH <sub>3</sub>	9
8	162.68			7, 8-OCH <sub>3</sub> , 9
9	96.78	6.91 (d, 2.5)	7, 10, 8-OCH <sub>3</sub> , 10-OCH <sub>3</sub>	7
9a	131.83			9
10	162.68			9
10a	138.27			2, 10
CH <sub>3</sub> -11	19.85	1.57 (d, 6.5)	2-H, 3-H, 12-CH <sub>3</sub>	2, 3
CH <sub>3</sub> -12	10.75	1.28 (d, 7.0)	3-H, 2-H, 11-CH <sub>3</sub> , 5-OH	3, 2
OCH <sub>3</sub> -6	56.15	3.97 (s)	7	
OCH <sub>3</sub> -8	55.48	3.94 (s)	9	
OCH <sub>3</sub> -10	60.63	3.89 (s)	9	
OH-5		14.30 (s)	12-CH <sub>3</sub>	

<sup>a</sup> Spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 500 MHz and <sup>13</sup>C, 125 MHz).



**Figure 1.** SDS-PAGE of bovine (a and b) and spinach (c and d) calmodulins after treatment with compounds 1–9. Electrophoresis of 2- $\mu$ g samples of calmodulins in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub> (a and c) or EGTA (b and d). Pretreatments of the calmodulin samples, for 1.5 h at 30 °C in the presence of CaCl<sub>2</sub> (a and c) or EGTA (b and d). A, no additions; B, DMSO; C, 0.033  $\mu$ g/mL quercetin in DMSO; D, 1; E, 3; F, 2; G, 4; H, 5; I, 6; J, 7; K, 8; L, 9. In all cases 0.033  $\mu$ g/mL of treatment (1–9) in DMSO were applied.

phytotoxic effects of the isolates on seedling growth. The results are expressed as IC<sub>50</sub> values (50% inhibitory concentration). In general, the tested compounds showed significant phytotoxic effect and were more potent as radicle growth inhibitors than the positive control [2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)]. The nine compounds reduced the radicle growth of both target species in a concentration-dependent manner. Compounds 3, 4, 6, and 9 were the most active against *A. hypochondricus*; however, *E. crusgalli* was more affected by emodin.

In an attempt to discover potential herbicides with an effect on the protein calmodulin, the phytotoxic compounds were further evaluated for their ability to bind spinach and bovine brain calmodulin-Ca<sup>2+</sup> complex. The interaction of any compound with calmodulin-Ca<sup>2+</sup> complex alters its conformation and changes its electrophoretic mobility as detected in a SDS-PAGE.<sup>5,6</sup> Figure 1 shows that bovine calmodulin treated with Ca<sup>2+</sup> (1 mM) and the isolates (0.033  $\mu$ g/mL) has a lower electrophoretic mobility than untreated calmodulin. The strongest effect was observed

with compound 2. The inhibition of bovine calmodulin induced by compounds 1 and 3–9 seems to be dependent on Ca<sup>2+</sup>. Phytotoxins 1 and 3–9 in the presence of Ca<sup>2+</sup> retarded the electrophoretic mobility of calmodulin. Upon conducting the same assay in the presence of EGTA (ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid), a calcium-chelating agent, the mobility of calmodulin is not retarded (Figure 1). In the case of compound 2, however, the effect seems to be independent of Ca<sup>2+</sup> because in the presence of EGTA the retardation on the electrophoretic mobility of calmodulin provoked by this compound was the same as in the presence of Ca<sup>2+</sup>. Because the isolates are phytotoxins, their effects on a plant calmodulin were investigated. Spinach calmodulin was also found to interact with compounds 1–9. Once again, compound 2 demonstrated the stronger interaction, and its effect was independent of Ca<sup>2+</sup> (Figure 1).

In conclusion, the results of this study showed that the compounds isolated from the fungus *G. polythrix* are calmodulin-Ca<sup>2+</sup> inhibitors and possess promising phyto-

growth inhibitory activity. Further work is in progress to determine the nature (covalent vs noncovalent) of the interaction of compound 2 with calmodulin.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Melting points were determined in a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer 599 B spectrophotometer. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution. Optical rotations were recorded on a JASCO DIP 360 digital polarimeter. CD spectra were performed on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25 °C in MeOH solution. NMR spectra, including COSY spectra, NOESY, HMBC, and HMQC experiments were recorded on a Varian UNITY PLUS 500 spectrometer in CDCl<sub>3</sub> or CDCl<sub>3</sub>-DMSO-*d*<sub>6</sub> either at 500 MHz (<sup>1</sup>H) or 125 MHz (<sup>13</sup>C), using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EIMS were performed using a JEOL JMS-AX505 HA spectrometer, at an ionization energy of 70 eV. Column chromatography: Si gel 60 (70–230 mesh, Merck). Analytical and preparative TLC were performed on precoated Si gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck).

**Fungal Material.** The fungus *G. polythrix* was isolated from bat guano, obtained from zone III of the cave "Cueva del Diablo" or "Ocotlitlán", in Tepozotlán, Morelos, México, in 1979. Since then, cultures of the fungus have been preserved lyophilized in liquid nitrogen. Subcultures were obtained in several culture media, such as PDA, V8 agar, and others. Cultures of this new fungus are maintained at the National Herbarium (MEXU, voucher: 24486), Instituto de Biología, UNAM, México, and in the mycological collection of the Department of Plant Pathology (voucher: GAM 5803), University of Georgia, Athens, Georgia.

Thirty 2-L Erlenmeyer flasks, each containing 400 mL of PDB (Difco), were individually inoculated with one 1-cm<sup>2</sup> agar plug taken from a stock culture of *G. polythrix* maintained at 4 °C on potato dextrose agar. Flask cultures were incubated at 28 °C and aerated by agitation on an orbital shaker at 150 rpm for 15 days.

**Extraction and Isolation of 1–9.** After incubation, the flask contents were combined and filtered. The culture filtrate (12 L) was extracted exhaustively with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 12 L). The combined organic phase was filtered over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo to give a green solid (1.4 g). In addition, the mycelium was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 2 L). The combined mycelial extract was evaporated to yield 5.7 g of a green solid. The extracts (culture and mycelial) were combined (7.1 g) and subjected to Si gel (200 g) column chromatography eluting with a gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:5–0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9.9:0.1–0:10). In all, 465 fractions (50 mL each) were collected and pooled on the basis of their TLC profiles to yield 12 mayor fractions (FI–FXII). Bioactivity in the bioautographic bioassay showed five active pools: FIV (113.6 mg), FV (164.2 mg), FVI (316.3 mg), FVII (143.1 mg), and FVIII (262.5 mg). From the active fraction FIV, eluted with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:8), crystallized 9.2 mg of compound 1. From fraction FV eluted with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:9), cocrystallized a mixture (53 mg) of 1 and 2. The mixture was resolved by preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to yield 1 (20 mg) and 2 (10.5 mg). The mother liquors from phytotoxic fraction FV (164.2 mg) were rechromatographed on a Si gel (15 g) column eluting with a gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:5–0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9.9:0.1–5:5). Ten secondary fractions were obtained (FV-1–FV-10). According to the bioautographic bioassay, the phytotoxic activity was concentrated in secondary fraction FV-5. Extensive TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) of fraction FV-5 yielded 3 (9.0 mg) and 4 (5 mg). Primary fraction FVI (316.3 mg), eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, was further resolved on another Si gel (30 g) column using the same elution system as for fraction FV to yield eight secondary fractions (FVI-1–FVI-8). The phytotoxic activity was found in secondary fraction FVI-6, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1). Further purification of this fraction by preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) yielded 6 (7.1 mg), 5 (7

mg), and 9 (8 mg). Active fraction FVII (143.1 mg), eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1), was rechromatographed on a Si gel column using the solvent gradient systems of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:5–0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9.9:0.1–0:10). In all, 10 secondary fractions were obtained (FVII-1–FVII-10), the phytotoxic activity being in fraction FVII-7. From this fraction crystallized spontaneously 9.5 mg of 7. Finally, from the phytotoxic fraction FVIII crystallized 55 mg of compound 8.

**(2S,3S)-5-Hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4H-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]-pyran-4-one (1):** yellow crystalline needles, mp 165–167 °C; [α]<sub>D</sub> +128° (c 1 mg/mL MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 409.5 (3.85), 320 (3.97), 277.5 (4.54), 252 (4.19), 235 (4.43), 214 (4.26), 209 (4.27) nm; CD (MeOH) Δε (nm) -1.5 × 10<sup>4</sup> (314); IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3500, 1638, 1610 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Table 2; EIMS *m/z* 302 [M<sup>+</sup> (100)], 246 (90), 218 (12), 203 (6), 190 (19); HRMS *m/z* 302.1159 (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, 302.1154).

**(2S,3S)-5-Hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-4H-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]-pyran-4-one (2):** yellow solid, mp 153–155 °C; [α]<sub>D</sub> +150° (c 1 mg/mL MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 411 (3.34), 320 (3.46), 277.5 (4.07), 252 (3.71), 235 (3.96), 214 (4.28), 209 (4.29) nm; CD (MeOH) Δε (nm) -1.6 × 10<sup>4</sup> (314); IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3500, 1638, 1610 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Table 3; EIMS *m/z* 332 [M<sup>+</sup> (98)], 317 (90), 261 (100), 233 (66), 218 (14); HRMS *m/z* 332.1255 (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, 332.1259).

**(2S)-5-Hydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4H-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]-pyran-4-one (3):** pale yellow needles, mp 175–177 °C; [α]<sub>D</sub> +87.5° (c 1 mg/mL MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 401.5 (4.10), 331 (4.23), 318 (4.19), 278 (4.83), 232 (4.69), 223 (4.16), 247 (4.46); CD (MeOH) Δε (nm) -1.5 × 10<sup>4</sup> (312); IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3500, 1639 and 1611 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 14.46 (1H, s, OH-5), 6.52 (1H, s, H-10), 6.45 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-9), 6.30 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-7), 4.58 (1H, d, *J* = 11.0, 6.25, 3.5 Hz, H-2), 3.97 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-8), 2.81 (1H, dd, *J* = 17.0, 11.0 Hz, H-3<sub>a</sub>), 2.73 (1H, dd, *J* = 17.0, 3.5 Hz, H-3<sub>b</sub>), 1.51 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>-11); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 197.60 (C-4), 165.31 (C-5), 162.48 (C-8), 161.46 (C-6), 156.21 (C-10a), 143.50 (C-9a), 107.39 (C-5a), 103.13 (C-4a), 101.41 (C-10), 98.49 (C-9), 96.58 (C-7), 73.16 (C-2), 56.06 (OCH<sub>3</sub>-6), 55.38 (OCH<sub>3</sub>-8), 43.86 (C-3), 21.16 (CH<sub>3</sub>-11); EIMS *m/z* 288 [M<sup>+</sup> (100)], 246 (50), 218 (10), 190 (20); HRMS *m/z* 288.0992 (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 288.0997).

**(2S)-5-Hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2-methyl-4H-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]-pyran-4-one (4):** pale yellow needles, mp 160–162 °C; [α]<sub>D</sub> +145.8° (c 1 mg/mL MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 413 (3.14), 332 (3.17), 320.5 (3.24), 277 (3.85), 235.5 (3.74), 214 (3.52), 207 (3.55); CD (MeOH) Δε (nm) -1.5 × 10<sup>4</sup> (313); IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3490, 1640, and 1610 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 14.21 (1H, s, OH-5), 6.92 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-9), 6.35 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-7), 4.60 (1H, d, *J* = 10.5, 6.25, 4.25 Hz, H-2), 3.97 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-8), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-10), 2.80 (1H, dd, *J* = 17.0, 10.5 Hz, H-3<sub>a</sub>), 2.75 (1H, dd, *J* = 17.0, 4.25 Hz, H-3<sub>b</sub>), 1.57 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>-11); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 197.65 (C-4), 162.88 (C-8), 162.88 (C-10), 161.83 (C-5), 161.36 (C-6), 138.45 (C-10a), 132.03 (C-9a), 107.10 (C-5a), 103.36 (C-4a), 96.90 (C-9), 92.76 (C-7), 73.42 (C-2), 60.66 (OCH<sub>3</sub>-10), 56.15 (OCH<sub>3</sub>-6), 55.49 (OCH<sub>3</sub>-8), 43.97 (C-3), 21.00 (CH<sub>3</sub>-11); EIMS *m/z* 288 [M<sup>+</sup> (100)], 246 (50), 218 (10), 190 (20); EIMS *m/z* 318 [M<sup>+</sup> (98)], 303 (90), 261 (100), 233 (45), 218 (20); HRMS *m/z* 318.1108 (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>, 318.1103).

**5-Hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4H-naphtho[2,3-b]-pyran-4-one (5):** pale yellow needles, mp 195–197 °C; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 398.5 (3.47), 274 (3.64), 237.5 (3.18), 224.5 (3.46); IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3148, 1732, and 1650 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 15.22 (1H, s, OH-5), 6.93 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-9), 6.37 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-7), 4.00 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-8), 2.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>-11), 2.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>-12); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 184.13 (C-4), 167.40 (C-2), 162.61 (C-8), 161.50 (C-6), 160.62 (C-5), 153.30 (C-10a), 141.09 (C-9a), 119.22 (C-3), 108.40 (C-5a), 104.21 (C-4a), 101.04 (C-10), 97.80 (C-9), 97.23 (C-7), 56.08 (OCH<sub>3</sub>-6), 55.40 (OCH<sub>3</sub>-8), 23.12 (CH<sub>3</sub>-11), 20.68 (CH<sub>3</sub>-12):

ELMS  $m/z$  300 ( $M^+$  (100)), 282 (25), 271 (65), 254 (15), 229 (12), HRMS  $m/z$  300.0994 (calcd for  $C_{17}H_{16}O_5$ , 300.0997).

**Phytogrowth-Inhibitory Bioassays.** The phytogrowth inhibitory activity of the extract and pure compounds was evaluated on seeds of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* by using a Petri dish bioassay.<sup>10</sup> In addition, a direct bioautographic bioassay system was employed to guide secondary fractionation and speed up the isolation of active compounds. The direct bioautographic assay was carried out as previously described.<sup>10</sup> The results were analyzed by ANOVA ( $p < 0.05$ ), and  $IC_{50}$  values were calculated by Probit analysis based on percent of radicle growth or germination inhibition. The extract was evaluated at 10, 100, and 1000  $\mu g mL^{-1}$ . The pure compounds were tested at 1, 10, and 100  $\mu g mL^{-1}$ . 2,4-D was used as the positive control. The bioassays were performed at 28 °C.

**Evaluation of the Interaction of Compounds 1–9 with Spinach and Bovine Brain Calmodulins.** The interaction of the isolated compounds with both spinach and brain calmodulins (Sigma) was performed using nondenaturing homogeneous electrophoresis (SDS–PAGE). SDS–PAGE was performed according to previously described procedures using 15% polyacrylamide gels.<sup>4–6</sup> The interaction of the phytotoxins with both calmodulins was determined by observing the difference in electrophoretic mobility in two different conditions, in the presence of  $Ca^{2+}$  and in the presence of EGTA. The experimental conditions are described briefly in the legend of Figure 1. In each case the electrophoresis run was done in triplicate. Quercetin was used as the positive control.

**Acknowledgment.** This work was supported by a grant from CONACyT (27978N). We wish to thank the following people: Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Luis Velasco-Ibarra, Javier Pérez Flores, and Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) for recording NMR, Mass CD and UV spectra;

Marisela Gutiérrez and Graciela Chávez for registration of IR spectra. The technical assistance of Samuel Aguilar Ogarrio, Perla Castañeda, and Laura Acevedo is also acknowledged. M.M. acknowledges the fellowship awarded by CONACyT to carry out graduate studies.

## References and Notes

- (1) This work represents part of the Ph.D. thesis that will be submitted to the graduate School of Chemistry, UNAM, by Martha Macias.
- (2) Zielinski, R. E. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.* **1998**, *49*, 697–725.
- (3) Poovaiah, B. W.; Takezawa, D.; Han, T. J. *J. Plant Physiology* **1996**, *149*, 553–558.
- (4) Liao, B.; Gawienowski, M. C.; Zielinski, R. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *327*, 53–60.
- (5) Leung, P. C.; Taylor, W. A.; Wang, J. H.; Tripton, C. L. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2742–2747.
- (6) Leung, P. C.; Taylor, W. A.; Wang, J. H.; Tripton, C. L. *Plant Physiol.* **1985**, *77*, 303–308.
- (7) Nishino, H.; Naitoh, E.; Iwashima, Umezawa K. *Experientia* **1984**, *40*, 184–185.
- (8) Paliyath, G.; Poovaiah, B. W. *Plant Cell Physiol.* **1985**, *26*, 201–209.
- (9) González, M. C.; Hanlin, R. T.; Ulloa, M. *Mycologia* **2000**, in press.
- (10) Mata, R.; Macias, M.; Rojas, S.; Lotina-Hennsen, B.; Toscano, R.; Anaya, A. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 441–449.
- (11) Gorst-Allam, C.; Steyn, P.; Rabie, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2474–2479.
- (12) Galmarini, O.; Mastronardi, I.; Priestap, H. *Experientia* **1974**, *60*, 586.
- (13) Leeper, F.; Staunton, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1053–1059.
- (14) Melvyn, G.; Giménez, A.; McKenzie, R. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1251–1256.
- (15) Melvyn, G.; Giménez, A. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 951–955.
- (16) Sankawa, U.; Ebizuka, Y.; Noguchi, H.; Isikawa, Y.; Kitagawa, S.; Yamamoto, Y.; Kobayashi, T.; Iitak, Y. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3583–3591.
- (17) Mathieson, D.; Whalley, W. *J. Chem. Soc.* **1964**, 4640–4641.
- (18) Buckingham, J. (ed.) *Dictionary of Organic Compounds*, 5th ed.; Chapman and Hall: London, 1982; p 299.
- (19) Koyama, K.; Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *36*, 146–152.
- (20) Gaffield, W. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4093–4108.

NP990534H