



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Inhibidores de alfa-glucosidasas de la especie
fúngica *Malbranchea flavorosea* Sigler et
Carmichael

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DANIELA REBOLLAR RAMOS



Ciudad de México

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Dra. Rachel Mata Essayag
SECRETARIO: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
1er SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
2do SUPLENTE: Dr. Abraham Madariaga Mazón

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR:

Dra. Rachel Mata Essayag

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Abraham Madariaga Mazón

SUSTENTANTE:

Daniela Rebollar Ramos

Índice

Lista de Figuras.....	III
Lista de Gráficas	III
Lista de Esquemas.....	IV
Lista de Tablas.....	IV
Lista de Abreviaturas.....	IV
1. Antecedentes.....	1
1.1. Diabetes	1
1.2. Panorama mundial y nacional de la diabetes	2
1.3. Tratamiento de la diabetes	3
1.4. Inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas	5
1.5. Productos naturales como fuente de inhibidores de alfa-glucosidasas	8
1.6. Antecedentes del género <i>Malbranchea</i>	10
2. Planteamiento del Problema	21
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos particulares	23
4. Parte Experimental.....	24
4.1. Material fúngico	24
4.2. Procedimientos cromatográficos generales.....	24
4.3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	25
4.4. Estudio químico de la especie fúngica <i>Malbranchea flavorosea</i>	26
4.4.1. Fermentación de <i>M. flavorosea</i> a mediana escala.....	26
4.4.2. Preparación de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo de <i>M. flavorosea</i>	26
4.4.3. Fraccionamiento del extracto orgánico de <i>M. flavorosea</i>	26

4.4.4. Aislamiento, purificación y elucidación estructural del xylarinol A (58) y la massarigenina C (59).....	28
4.5. Ensayos de actividad biológica	28
4.5.1. Evaluación <i>in vitro</i> del extracto desgrasado y los compuestos puros 58 y 59 sobre las enzimas alfa-glucosidasas de levadura y raspado intestinal de rata ..	28
4.5.2. Evaluación <i>in vivo</i> del compuesto 59 a través de una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones ICR	29
5. Resultados y Discusión.....	31
5.1. Comprobación de la actividad inhibitoria contra α -glucosidasas del extracto fúngico desgrasado	31
5.2. Estudio químico del extracto activo de <i>Malbranchea flavorosea</i>	32
5.2.1. Xylarinol A (58)	34
5.2.2. Massarigenina C (59).....	39
5.3. Evaluación biológica de los compuestos aislados	44
5.3.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los compuestos aislados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas	44
5.3.2. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de la massarigenina C (59) en una prueba oral de tolerancia a la sacarosa	47
6. Conclusiones	50
7. Referencias.....	51
8. Apéndice	57

Lista de Figuras

Figura 1. Panorama mundial de la prevalencia de la diabetes (IDF, 2015).	3
Figura 2. Ubicación de las enzimas α -glucosidasas en el intestino delgado.	6
Figura 3. Configuración <i>sin</i> y <i>anti</i> del biciclo diazaoctano.	12
Figura 4. Biogénesis propuesta para la malbranqueamida.....	13
Figura 5. <i>Malbranchea flavorosea</i>	24
Figura 6. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, DMSO- δ_6) del xylarinol A (58).....	36
Figura 7. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO- δ_6) del xylarinol A (58).....	36
Figura 8. Espectro bidimensional HSQC del xylarinol A (58).....	37
Figura 9. Espectro bidimensional COSY del xylarinol A (58).....	37
Figura 10. Elementos estructurales parciales del compuesto 58	38
Figura 11. Espectro bidimensional HMBC del xylarinol A (58).....	38
Figura 12. Correlaciones HMBC y COSY selectas para el xylarinol A (58).	39
Figura 13. Estructuras parciales del compuesto 59	41
Figura 14. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, DMSO- δ_6) de la massarigenina C (59). .	42
Figura 15. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO- δ_6) de la massarigenina C (59)....	42
Figura 16. Correlaciones de HMBC y NOESY selectas para la massarigenina C (59). 43	
Figura 17. Estructura generada por el análisis de difracción de rayos X del compuesto 59	43
Figura 18. Curva C-R del compuesto 58 en enzima de mamífero.	45
Figura 19. Curva C-R del compuesto 59 en enzima de mamífero.	45
Figura 20. Curva C-R del compuesto 58 en enzima de levadura.	46
Figura 21. Curva C-R del compuesto 59 en enzima de levadura.	46
Figura 22. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos.	48
Figura 23. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones hiperglucémicos.....	49

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Sistema de elución Hexano-CHCl ₃ -MeOH empleado en el fraccionamiento secundario del extracto desgrasado.....	27
--	----

Lista de Esquemas

Esquema 1. Estudio químico del extracto orgánico del hongo <i>M. flavorosea</i>	33
--	----

Lista de Tablas

Tabla 1. Fármacos más utilizados en el tratamiento de la DT2.....	4
Tabla 2. Inhibidores selectos de α -glucosidasas de origen natural.....	8
Tabla 3. Perfil metabólico del género <i>Malbranchea</i>	15
Tabla 4. Resumen del sistema de elución empleado en el fraccionamiento secundario del extracto desgrasado.	27
Tabla 5. Reunión de las fracciones secundarias del fraccionamiento del extracto desgrasado.....	28
Tabla 6. Constantes físicas y espectroscópicas del xylarinol A (58).....	34
Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para el xylarinol A (58) en DMSO- δ_6 (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).....	35
Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la massarigenina C (59).....	40
Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para la massarigenina C (59) en DMSO- δ_6 (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).	41
Tabla 10. Metabolitos activos estructuralmente parecidos al xylarinol A (58).	47
Tabla 11. Metabolitos activos con estructuras similares a la massarigenina C (59).	47

Lista de Abreviaturas

$[\alpha]_D^{25}$	Rotación óptica específica a 25°C
[M+H] ⁻	Pseudoión molecular negativo
[M+H] ⁺	Pseudoión molecular positivo
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano

CHCl ₃	Cloroformo
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
CLUE	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
cm	Centímetro
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
DG	Diabetes gestacional
dL	Decilitro
DMSO- δ_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DT1	Diabetes mellitus Tipo 1
DT2	Diabetes mellitus Tipo 2
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EM	Espectrometría de masas
g	Gramo
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCOOH	Ácido fórmico
HepG2	Carcinoma hepatocelular
Hex	Hexano
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
HTLV-I	Virus linfotrópico de células T humanas
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
ICR	Instituto de Investigación del Cáncer (Institute of Cancer Research)
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KB	Papiloma Humano

kg	Kilogramo
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MCF-7	Adenocarcinoma de glándula mamaria
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	MegaHertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
NOESY	Espectro bidimensional homonuclear de efecto overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
P388	Linfoma de monocitos
PANC-1	Carcinoma epitelioide de páncreas
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDE1	Fosfodiesterasa de AMP cíclico
<i>p</i> -NPG	α -D-glucopiranosido de <i>p</i> -nitrofenilo
ppm	Partes por millón
PTSO	Prueba oral de tolerancia a la sacarosa
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
UV	Ultravioleta
δ_c	Desplazamiento químico de carbono
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno
λ	Longitud de onda
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro

1. Antecedentes

1.1. Diabetes

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por una hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas (NOM-015-SSA2-2010).

Existen tres tipos principales de diabetes, la primera de ellas, la diabetes mellitus tipo 1 (DT1) es de carácter autoinmune por lo que el propio sistema inmunológico ataca a las células β pancreáticas, dejándolas incapaces de producir insulina. La diabetes mellitus tipo 2 (DT2), es la más común y se caracteriza por la disminución en la secreción de insulina y/o por una resistencia a su acción. La tercera clase es la diabetes gestacional (DG) que se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se detecta por primera vez durante el embarazo (IDF, 2015). La DG aumenta el riesgo de diversas complicaciones, entre las que destacan el sufrimiento fetal, muerte intrauterina, partos por cesárea y problemas neonatales. En cualquier caso, los síntomas clásicos de la enfermedad son poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida drástica de peso corporal.

Cabe mencionar que un grupo importante de personas poseen niveles de glucosa en sangre más elevados de lo normal, pero por debajo del umbral para el diagnóstico de la diabetes. Esta condición se conoce como prediabetes, y la mayoría de estos individuos se convierten en diabéticos tipo II una década más tarde.

Los factores de riesgo asociados a la DT1 no se conocen bien, sin embargo la carga genética aumenta ligeramente el riesgo de desarrollar la enfermedad. En contraste, la DT2 tiene factores de riesgo bien establecidos, por ejemplo: sobrepeso, una dieta poco saludable, sedentarismo, la presión arterial alta, antecedentes de diabetes gestacional, la tolerancia anormal a la glucosa, y antecedentes familiares de diabetes, entre otros (IDF, 2016).

La hiperglucemia crónica induce en la mayoría de los pacientes una serie de complicaciones, que pueden ser de dos tipos: microvasculares (lesiones en los vasos

sanguíneos pequeños) y macrovasculares (lesiones en vasos sanguíneos más grandes). Dentro de las complicaciones microvasculares se encuentra la retinopatía diabética, que provoca una visión disminuida e incluso ceguera; también la nefropatía que se manifiesta como insuficiencia renal; y finalmente, la neuropatía diabética, donde hay desgaste en los nervios periféricos, provocando falta de sensibilidad en las extremidades inferiores principalmente, lo que desencadena el llamado pie diabético que puede terminar en amputación de la extremidad debido a fuertes infecciones. Las complicaciones macrovasculares involucran a las enfermedades cardiovasculares, como son los ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares y la insuficiencia circulatoria en los miembros inferiores (OMS, 2016).

1.2. Panorama mundial y nacional de la diabetes

De acuerdo a un estudio realizado en el 2015 por la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés), existen 415 millones de personas con esta enfermedad en todo el mundo; se estima que para el año 2040, este número aumente a 642 millones. La región norteamericana, que es en la que está inmerso nuestro país, ocupa el segundo lugar de prevalencia de diabetes, con 44.3 millones de personas afectadas por esta enfermedad; México, específicamente, ocupa el sexto lugar de países con mayor prevalencia de diabetes, al contar con 11.5 millones de pacientes enfermos (IDF, 2015).

La diabetes y sus complicaciones son las principales causas de muerte en la mayoría de los países. En el 2015 alrededor de 5 millones de personas fallecieron debido a esta afección (IDF, 2015). En México, de acuerdo a los datos estadísticos más recientes, es la segunda causa de muerte con 89 mil fallecimientos (INEGI, 2013).

La diabetes además de ser un problema de salud serio, tiene un alto impacto económico debido a la falta de productividad y al costo del tratamiento y sus complicaciones. A nivel mundial el 12% del presupuesto de salud total se ocupa solo en diabetes.

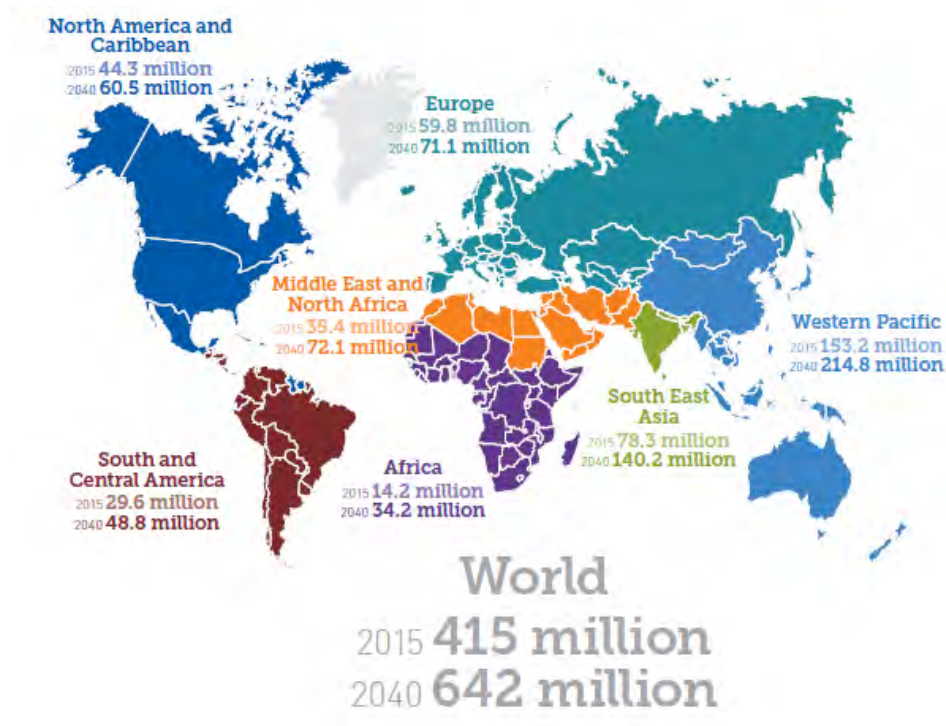


Figura 1. Panorama mundial de la prevalencia de la diabetes (IDF, 2015).

1.3. Tratamiento de la diabetes

El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones (NOM-015-SSA2-2010).

La terapia a seguir depende del tipo de diabetes. En el caso de la DT1, la terapia consiste en la administración de insulina exógena a través de inyecciones o con bombas, ya que el organismo no produce la hormona.

Para el caso del tratamiento de la DT2, lo más común es seguir una dieta baja en carbohidratos y complementar con fármacos orales que controlen la hiperglucemia; estos fármacos se dividen en tres grandes grupos, dependiendo el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto hipoglucemiante (Israili, 2011):

- a. Fármacos que incrementan los niveles de insulina, también llamados secretagogos.

- b. Fármacos que mejoran la sensibilidad de la insulina en los tejidos.
- c. Fármacos que reducen la tasa de absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal.

En la **Tabla 1**, se resumen los tipos de fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de DT2, así como el mecanismo de acción de cada uno de ellos (Israili, 2011; Thulé, 2012).

Tabla 1. Fármacos más utilizados en el tratamiento de la DT2.

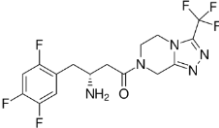
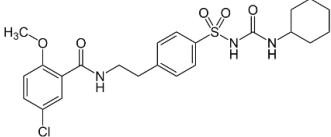
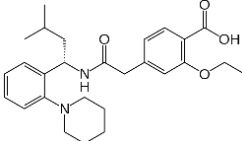
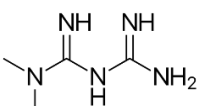
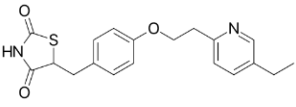
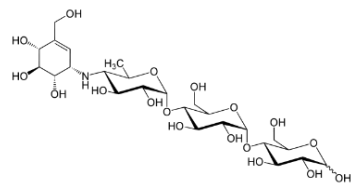
Tipo de fármaco (ejemplo)	Mecanismo de acción
<p>Análogos de incretinas</p> <p>Exenatida (1)</p> <p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p>	<p>Aumentan la síntesis y secreción de insulina por las células β pancreáticas, disminuyen la secreción de glucagón, y retrasan el vaciamiento gástrico debido a que son agonistas del receptor GLP-1.</p>
<p>Inhibidores de DPP-4</p> <p>Sitagliptina (2)</p> 	<p>Inhiben la enzima proteolítica que degrada a las incretinas GIP y GLP-1, aumentando su concentración y dejando que actúen en páncreas, favoreciendo la síntesis de insulina y disminuyendo la producción de glucagón. También son llamados potenciadores de incretinas.</p>
<p>Sulfonilureas</p> <p>Glibenclamida (3)</p> 	<p>Bloqueadores del canal de potasio dependiente de ATP de las células β pancreáticas, lo que provoca que la célula se despolarice y abra canales de calcio dependientes de voltaje, la entrada de calcio al interior de la célula aumenta la fusión de los gránulos de insulina con la membrana celular, de manera que se libera la hormona.</p>
<p>Meglitinidas</p> <p>Repaglinida (4)</p> 	<p>Actúan igual que las sulfonilureas pero tienen un sitio de unión específico en el canal de potasio dependiente de ATP, además tienen una acción más rápida.</p>

Tabla 1. Fármacos más utilizados en el tratamiento de la DT2 (continuación).

Tipo de fármaco (ejemplo)	Mecanismo de acción
<p>Biguanidas</p> <p>Metformina (5)</p> 	<p>Reducen la gluconeogénesis y glucogenólisis en hígado. Favorecen la acción de la insulina en músculo y tejido adiposo.</p>
<p>Tiazolidinedionas</p> <p>Pioglitazona (6)</p> 	<p>Aumentan la sensibilidad a la insulina en músculo, tejido adiposo e hígado por aumento de transcripción de genes involucrados en el transporte y uso de glucosa.</p>
<p>Inhibidores de α glucosidasas</p> <p>Acarbosa (7)</p> 	<p>Bloquean las enzimas que hidrolizan carbohidratos complejos a glucosa, retardando su absorción a nivel intestinal.</p>

Es muy común que los hipoglucemiantes orales se administren en combinación; esto con la finalidad de obtener un tratamiento más eficaz ya que al combinar dos o más fármacos con diferentes blancos de acción se logra un efecto sinérgico. Entonces, la terapia de la DT2 es polivalente.

1.4. Inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas

Las glucosidasas son enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos de oligosacáridos o glicoconjugados; la mayoría de las glucosidasas son específicas para ciertos tipos de enlace, su actividad depende del número, posición y configuración de los grupos involucrados en los enlaces glucosídicos (Borges de Melo et al., 2006).

La función de las glucosidasas es esencial para algunos procesos bioquímicos como la degradación de los polisacáridos de la dieta en unidades monosacáridas, la biosíntesis

de oligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos; y el metabolismo lisosomal de glicoconjugados (Borges de Melo et al., 2006).

Las α -glucosidasas, también llamadas α -D-glucósido hidrolasas, son exoenzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos terminales y que liberan α -glucosa del extremo no reductor de la cadena del sustrato. Muchas de estas enzimas pueden hidrolizar no solo oligosacáridos sino también α -glicósidos sintéticos y α -glucanos como el almidón soluble en agua y el glucógeno (Krasikov et al., 2001).

Las α -glucosidasas se encuentran en la luz del intestino delgado sobre la membrana de los enterocitos, lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos. Estas enzimas hidrolizan oligosacáridos y liberan α -glucosa, la cual puede ser absorbida por los enterocitos y llevada a circulación.

Los inhibidores de α -glucosidasas bloquean a estas enzimas, de tal forma que se reduce la tasa de digestión de carbohidratos complejos en glucosa, y en consecuencia la hiperglucemia posprandial. Además, el uso a largo plazo de estos inhibidores reducen del 0.7-0.8% de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) (Israili, 2011).

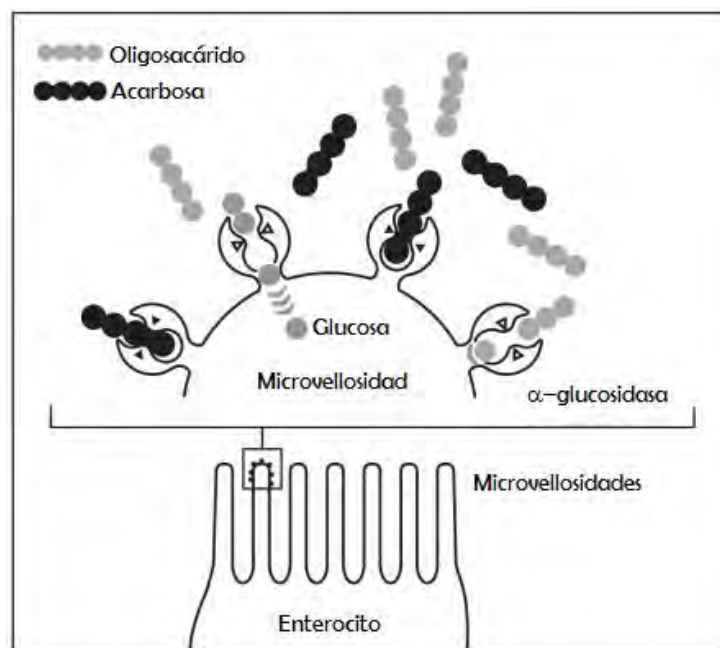
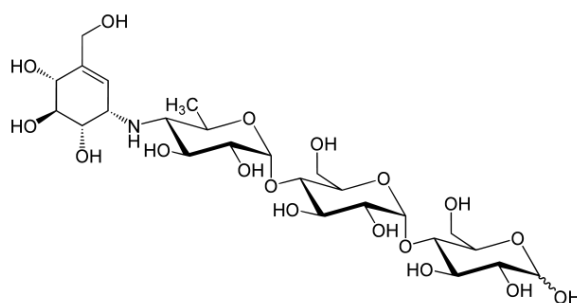
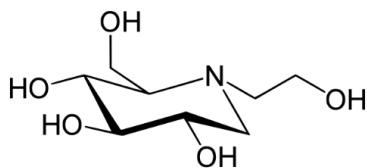
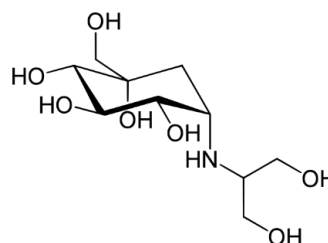


Figura 2. Ubicación de las enzimas α -glucosidasas en el intestino delgado.

Actualmente, existen en el mercado tres fármacos inhibidores de α -glucosidasas: acarbosa, miglitol y voglibosa. La acarbosa (**7**) es el inhibidor de α -glucosidasas más importante clínicamente, y se aisló inicialmente de *Actinoplanes* sp. SE-50. El miglitol (**8**) es un iminoazúcar, derivado de la desoxinojirimicina y de la nojirimicina, las cuales están presentes en varias especies de *Streptomyces*, como *S. roseochromogenes* R-468 y *Bacillus*. La desoxinojirimicina también se ha aislado de la morera (*Morus alba*, Moraceae), planta medicinal utilizada en las prácticas médicas populares para el tratamiento de la diabetes. A diferencia de la acarbosa, el miglitol se absorbe casi completamente en el tracto gastrointestinal. Finalmente, la voglibosa (**9**) es un derivado de la validamicina-A, molécula que fue aislada de *Streptomyces hygrosopicus* var. *limoneus* (Asano, 2003). Con base en esto se puede concluir que los principales inhibidores de α -glucosidasas son de origen natural o resultan de la modificación de uno de estos productos.

Acarbosa (**7**)Miglitol (**8**)Voglibosa (**9**)

Debido a que los inhibidores de las α -glucosidasas bloquean la degradación de carbohidratos complejos, éstos permanecen en el intestino y colon, donde son digeridos por las bacterias entéricas, liberando gases, lo que causa efectos adversos gastrointestinales como son flatulencias, diarrea y distensión abdominal (Israili, 2011).

1.5. Productos naturales como fuente de inhibidores de alfa-glucosidasas
La naturaleza es una fuente valiosa de compuestos bioactivos, incluyendo inhibidores de las enzimas α -glucosidasas como se indicó en el inciso anterior. En la **Tabla 2** se muestran ejemplos selectos de estos productos descubiertos en los últimos años.

Tabla 2. Inhibidores selectos de α -glucosidasas de origen natural.

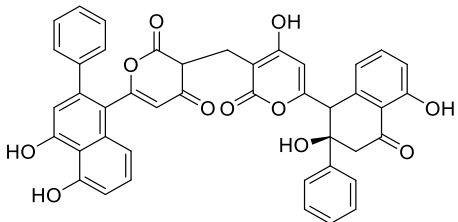
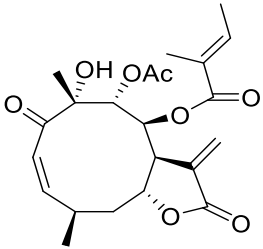
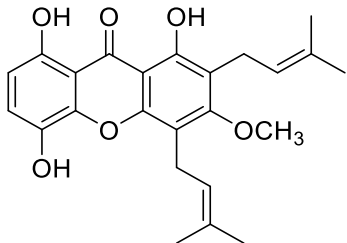
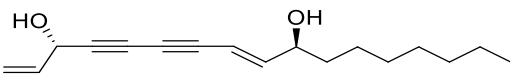
Molécula	Fuente de obtención	Referencia
<p>Wailupemicina I (10)</p> <p>CI₅₀= 8.3 μM</p> 	<p><i>Streptomyces</i> sp.</p> <p>OUCMDZ-3434 hongo derivado del alga marina <i>Enteromorpha prolifera</i></p>	(Chen et al., 2016)
<p>Caleína C (11)</p> <p>CI₅₀= 0.28 mM</p> 	<p><i>Brickellia cavanillesii</i> (planta)</p>	(Escandón-Rivera et al., 2012)
<p>8-hidroxicudraxantona G (12)</p> <p>CI₅₀= 76 μM</p> 	<p><i>Garcinia nobilis</i> (corteza)</p>	(Fouotsa et al., 2012)
<p>(3S,10S), 1,2-dehidropanaxydiol (13)</p> <p>CI₅₀= 22.2 μM</p> 	<p><i>Panax japonicus</i> (raíz)</p>	(Chan et al., 2010)

Tabla 2. Inhibidores selectos de α -glucosidasas de origen natural (continuación).

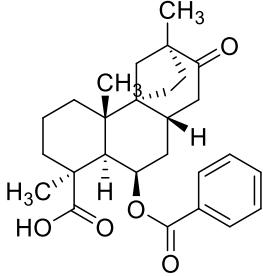
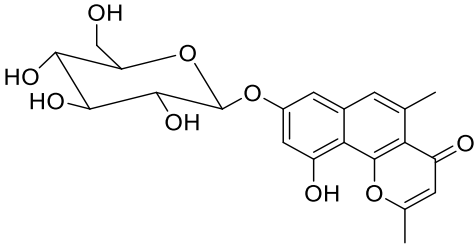
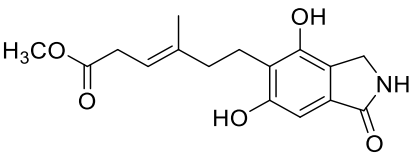
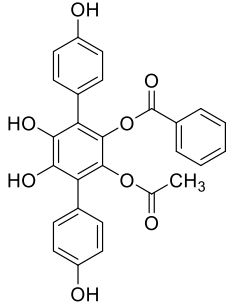
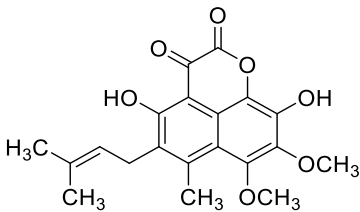
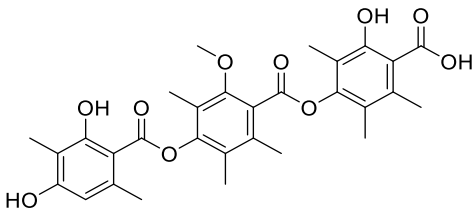
Molécula	Fuente de obtención	Referencia
<p>Ácido 4-<i>epi</i>-scopadulcico B (14)</p> <p>Cl₅₀= 14.6 μM</p> 	<i>Scoparia dulcis</i> (planta)	(Liu et al., 2014)
<p>Eleuterinósido A (15)</p> <p>Cl₅₀= 0.5 mM</p> 	<i>Eleutherine americana</i> (planta)	(Ieyama et al., 2011)
<p>Erinacerina H (16)</p> <p>Cl₅₀= 10.3 μM</p> 	<i>Hericium erinaceus</i> (hongo)	(Wang et al., 2015)
<p>Concrescenina A (17)</p> <p>Cl₅₀= 0.9 μM</p> 	<i>Hydnellum concrescens</i> (hongo)	(Wang et al., 2014)

Tabla 2. Inhibidores selectos de α -glucosidasas de origen natural (continuación).

Molécula	Fuente de obtención	Referencia
<p>Flavifenalenona C (18)</p> <p>Cl_{50}= 78.9 μM</p> 	<p><i>Aspergillus flavipes</i> (hongo)</p>	<p>(Zhang et al., 2016)</p>
<p>Thielavina J (19)</p> <p>Cl_{50}= 15.8 μM</p> 	<p>MEXU27095 hongo endófito de <i>Hintonia</i> <i>latiflora</i></p>	<p>(Rivera-Chávez et al., 2013)</p>

1.6. Antecedentes del género *Malbranchea*

El género *Malbranchea* fue descrito en 1899; inicialmente solo incluía a *Malbranchea pulchella* Saccardo & Penig; sin embargo en 1976, Sigler y Carmichael propusieron nuevas especies con características morfológicas similares a *M. pulchella*, de tal forma que el número de especies del género incrementó hasta 15 (Okada et al., 1995).

De acuerdo a la literatura, los hongos del género *Malbranchea* son una fuente importante de compuestos con actividad biológica y de enzimas de interés biotecnológico. En la **Tabla 3** se muestra una revisión de los metabolitos secundarios aislados a la fecha de las especies analizadas del género *Malbranchea*. En la tabla se incluyen la fuente natural y las propiedades biológicas de los diferentes compuestos aislados.

Los metabolitos secundarios de este género fúngico pertenecen a diferentes categorías estructurales, incluyendo esteroides modificados designados con el nombre trivial de antraesteroides (**20-22**), alcaloides indólicos (**33-36**, **53-57**), purinas (**32**), sesquiterpenoides (**30-31**), eremofilanos (**38**), dímeros de compuestos C6C3-C6-C2 (**23-25**), y policétidos varios.

Los antraesteroides son productos naturales de escasa distribución; Hussler y Albrecht los aislaron por primera vez a partir de rocas del periodo cretácico y posteriormente se encontraron en hongos y garrapatas de oveja (Wakana et al., 2014). Los antraesteroides de *M. filamentosa* se designaron con los nombres comunes de malsterósidos (**20-22**), todos son de carácter glicosídico y como particularidad el anillo B de estos productos es de carácter aromático. Los malsterósidos A y C (**20** y **22**) demostraron efectos citostáticos contra las líneas celulares Hela y A549 (carcinoma de pulmón), mientras que el malsterósido B (**21**) no presentó actividad. Esto indica que la presencia de un hidroxilo libre en el anillo A es fundamental para la actividad biológica.

En contraste con los antraesteroides, la adenosina (**32**) aislada de *M. filamentosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Así, por ejemplo el cártamo (*Carthamus tinctorius*), el tomate y los hongos *Auricularia auricula* y *Ganoderma lucidum* contienen grandes cantidades de este producto. La adenosina (**32**) inhibe la agregación plaquetaria.

Los dímeros de compuestos C6C3-C6-C2 (**23-25**) de *M. filamentosa* tienen la particularidad de presentar una lactona de cinco miembros α,β -insaturada. De estos productos, los malfilamentósidos A (**24**) y B (**25**) son de naturaleza glicosídica. El gymnoascólido A (**23**) es el más simple de estos productos y tiene propiedades vasodilatadoras, debido a que bloquea los canales de calcio dependientes de voltaje; este compuesto se obtuvo por vez primera de *Gymnoascus reesii* y en esa ocasión se comprobó su actividad antifúngica frente a *Septoria nodorum* (Clark et al., 2005).

Entre los sesquiterpenoides se han aislado los malfilanoles A (**30**) y B (**31**) de *M. filamentosa* y el eremofilano (**33**) de *M. aurantiaca*. Los primeros poseen actividad antifúngica específica contra *Cryptococcus neoformans*, y citotóxica contra la línea celular HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical) (Wakana et al., 2009). El eremofilano **33** interfiere con las propiedades moduladoras de la calmodulina, ya que en un ensayo funcional utilizando la enzima fosfodiesterasa (PDE1) como monitora inhibió su activación con un valor de CI_{50} de 10.2 μ M (Martínez-Luis et al., 2005). Este compuesto también presentó una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento y la germinación de la especie *Amaranthus hypochondriacus*. Este efecto fue similar al del ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D). Cabe destacar que los eremofilanos son metabolitos comunes en las plantas, sin embargo en hongos se han aislado principalmente en el género *Penicillium*.

Otros terpenoides del género son los malbranqueósidos A-D (**26-29**), glicósidos de triterpenoides modificados que contienen D-glucosamina como glicona; este hecho resulta sin precedentes en el reino fúngico (Wakana et al., 2008b).

De *M. aurantiaca* y *M. graminicola* se aislaron una serie de alcaloides de tipo indol-terpenoides que presentan un bicyclo [2.2.2] diazaoctano, las malbranqueamidas (**33-36**, **53**, **56-57**). Esta familia de compuestos representa los únicos metabolitos con el sistema de anillo bicíclico [2.2.2] diazaoctano obtenidos de una fuente fúngica fuera de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*; además son los únicos que presentan halogenación en el anillo indólico. El halógeno puede ser cloro, o bien bromo como en el caso de los metabolitos obtenidos de *M. graminicola*. Se caracterizan también por la presencia de una monocetopiperazina en el bicyclo y la configuración *sin* en el puente del bicyclo (Finefield et al., 2012).

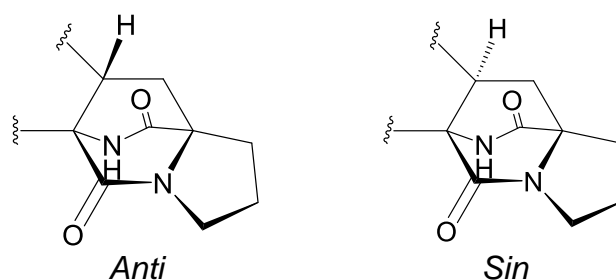


Figura 3. Configuración *sin* y *anti* del bicyclo diazaoctano.

Biogenéticamente, estos alcaloides derivan de una unidad de L-triptófano, una de L-prolina y un residuo isopreno. El bicyclo [2.2.2] diazaoctano de los alcaloides antes mencionados se cree que se genera a través de una reacción intramolecular de Diels-Alder vía el intermediario IV que se indica en la **Figura 4**, el dieno se encuentra en la porción isoprenoide, y el dienófilo en el anillo heterociclo superior del intermediario (Finefield et al., 2012).

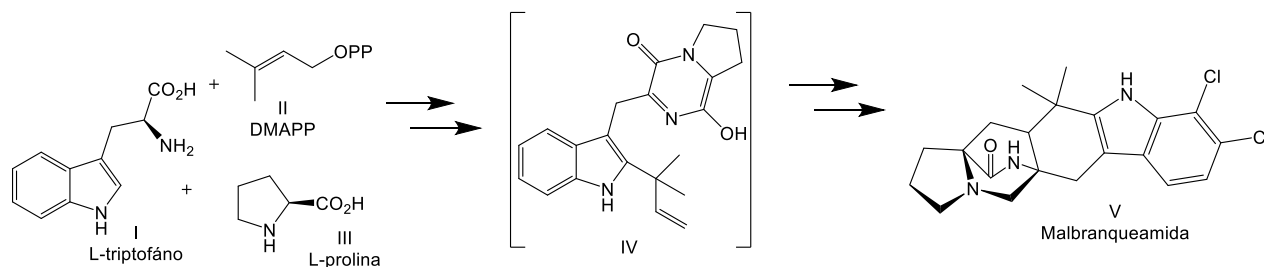


Figura 4. Biogénesis propuesta para la malbrancheamida.

En cuanto a su actividad biológica, las malbrancheamidas son inhibidoras de la calmodulina, en particular los productos **33-35**. La malbrancheamida (**33**) posee además propiedades vaso-relajantes y fitotóxicas ya que inhibe la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*. Este compuesto también presentó un efecto antibrasinoesteroide significativo al inhibir de manera competitiva el efecto de los brasinoesteroides en las hojas de trigo (Martínez-Luis, 2007; Martínez-Luis et al., 2006).

Además de las malbrancheamidas, *M. graminicola* contiene otros alcaloides indolterpenoides como son la paraherquamida B (**54**) y notoamida B (**55**). Estos también presentan el bicyclo [2.2.2] diazaoctano. Las paraherquamidas son potentes antihelmínticos, mientras que las notoamidias son insecticidas, antibacterianos y citotóxicos moderados (Finefield et al., 2012).

Los malbranpirroles A-F (**39-44**) aislados de *Malbranchea sulfurea*, una especie termófila, son metabolitos secundarios fotosensibles que presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares PANC-1 (carcinoma epitelioide de páncreas), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria) (Yang et al., 2009). Los malbranpirroles presentan en sus estructuras un anillo de tipo α - o γ - pirona. De esta misma especie se aisló el compuesto Tf-26Vx (**45**), un dímero de isocumarinas que presentó actividad como antibiótico frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas estrictamente anaerobias (Saito et al., 1979).

De *Malbranchea cinnamomea*, otra de las especies termófilas del género, fue aislado un compuesto de tipo benzofurano: el 7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (**52**), el cual presentó actividad antioxidante frente a xantina oxidasa y peroxidasa (Schlegel et al., 2003b).

Finalmente, existe un grupo de benzoquinonas e hidroquinonas (**46-51**) aisladas también de *M. cinnamomea*, cuya molécula base es la malbracinina (**46**) que posee actividad antibiótica frente a bacterias Gram positivas y citotóxica en las líneas celulares P388 (linfoma de monocitos) y KB (carcinoma/papiloma). Cabe mencionar que esta molécula, es la primera en presentar un sustituyente acetil-etil dentro de las benzoquinonas (Chiung et al., 1993). En cuanto a los demás derivados, el único compuesto que demostró relevancia biológica fue la 7-metoximalbracinina (**48**) que presentó actividad inhibitoria del activador transcripcional del retrovirus HTLV-I causante de la leucemia de las células T de adulto. Es importante destacar que las quinonas presentes en este grupo son *p*-benzoquinonas con excepción del producto **51** que es una *o*-benzoquinona (Schlegel et al., 2003a).

El género *Malbranchea* es también relevante como fuente de enzimas con varias aplicaciones biotecnológicas. Así, *M. cinnamomea* produce lipasas de triacilglicerol regioselectivas (Tong et al., 2015), liquenasas (Yang et al., 2014), glicosilhidrolasas (celulasa y hemicelulasa), liasasas de polisacáridos, esterasas de carbohidratos (Mahajan et al., 2016), y α -amilasa (Han et al., 2013), entre otras.

Tabla 3. Perfil metabólico del género *Malbranchea*.

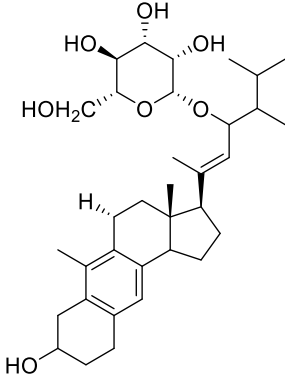
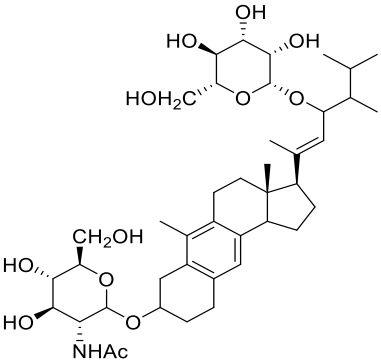
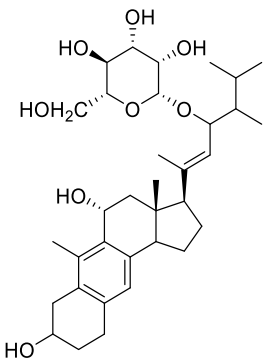
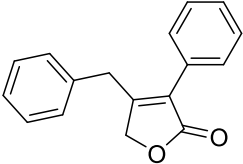
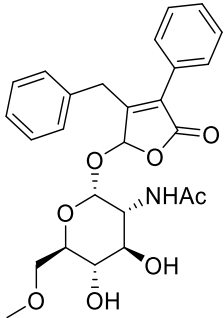
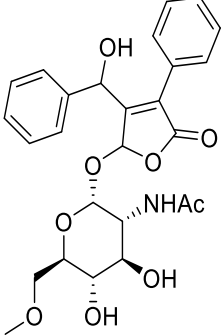
<i>Malbranchea filamentosa</i>			Actividad biológica	Referencia
Metabolito secundario				
Malsterósido A (20) 	Malsterósido B (21) 	Malsterósido C (22) 	Citostáticos (20, 22)	(Wakana et al., 2014)
Gymnoascólido A (23) 			Vaso-relajante Antifúngico	(Hosoe et al., 2005)
Malfilamentósido A (24) 	Malfilamentósido B (25) 		No se ha reportado	(Wakana et al., 2008a)

Tabla 3. Perfil metabólico del género *Malbranchea* (continuación).

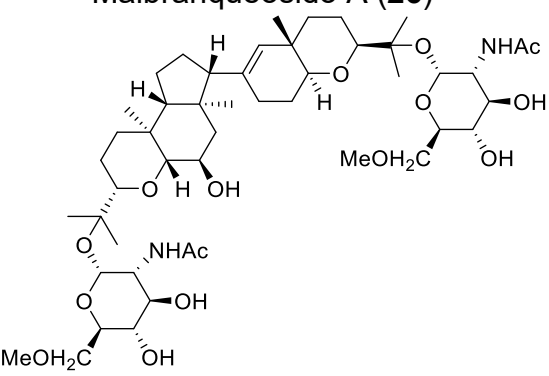
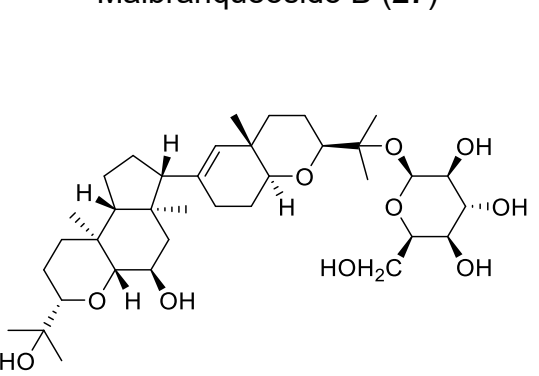
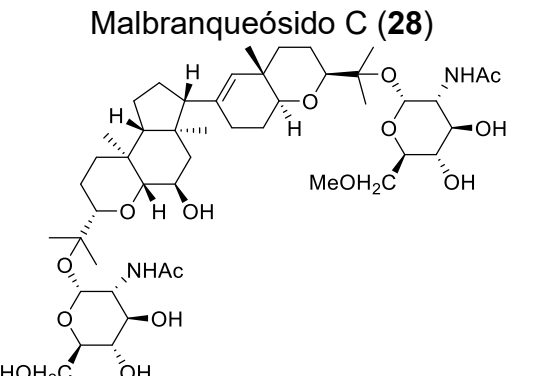
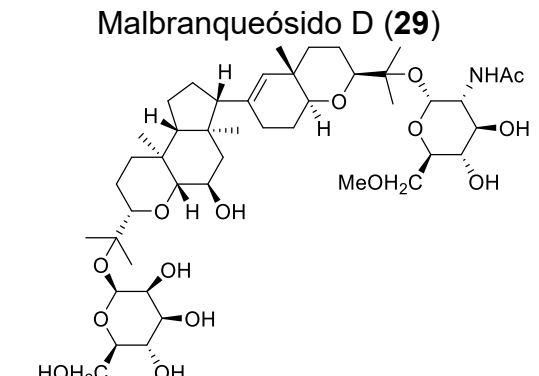
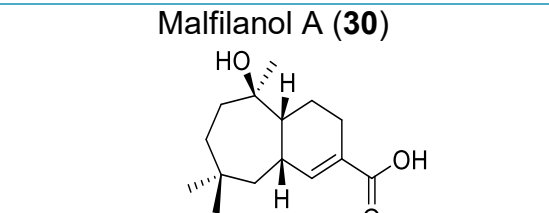
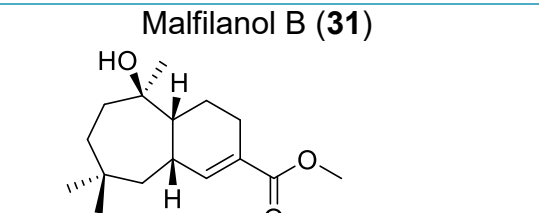
Metabolito secundario		Actividad biológica	Referencia		
<p>Malbranqueósido A (26)</p> 	<p>Malbranqueósido B (27)</p> 	No se ha reportado	(Wakana et al., 2008b)		
<p>Malbranqueósido C (28)</p> 	<p>Malbranqueósido D (29)</p> 				
<p>Malfilanol A (30)</p> 	<p>Malfilanol B (31)</p> 			Antifúngicos	(Wakana et al., 2009)
				Citotóxicos	(Clark et al., 2005)

Tabla 3. Perfil metabólico del género *Malbranchea* (continuación).

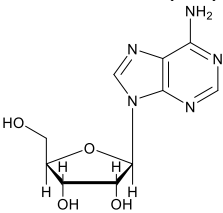
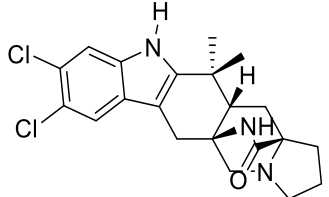
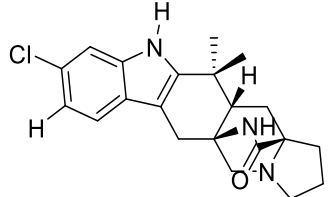
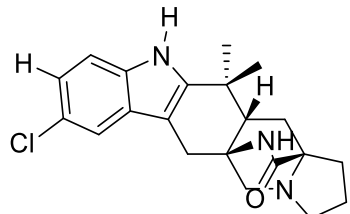
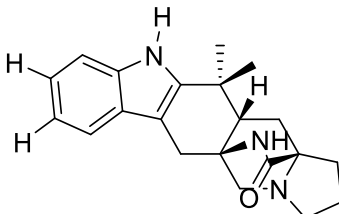
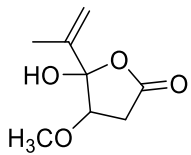
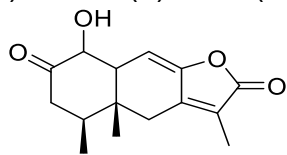
Metabolito secundario		Actividad biológica	Referencia
Adenosina (32) 		Inhibidor de la agregación plaquetaria	(Moriyama et al., 2009)
<i>Malbranchea aurantiaca</i>			
Metabolito secundario		Actividad biológica	Referencia
Malbranqueamida (33) 	Malbranqueamida B (34) 	Vaso-relajantes	(Madariaga-Mazón et al., 2015)
Isomalbranqueamida B (35) 	Premalbranqueamida (36) 	Inhibidores de la calmodulina	(Figuerola et al., 2011)
		Fitotóxico (33)	(Martínez-Luis et al., 2006)
Ácido penicílico (37) 	1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10), 7(11), 8(9)-tien-12(8)-ólido (38) 	Fitotóxicos	(Martínez-Luis et al., 2005)
		Inhibidor de la calmodulina (38)	

Tabla 3. Perfil metabólico del género *Malbranchea* (continuación).

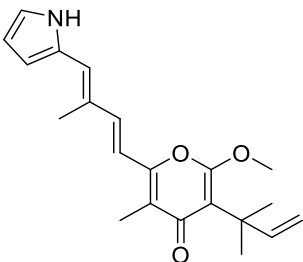
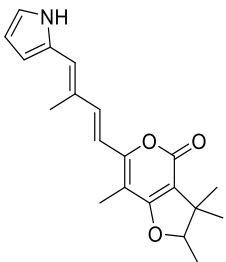
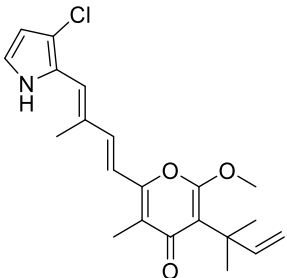
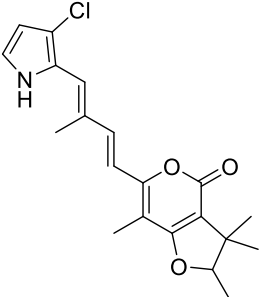
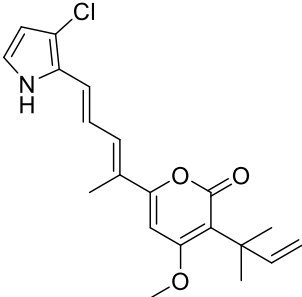
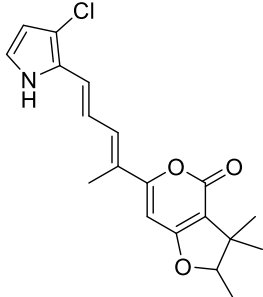
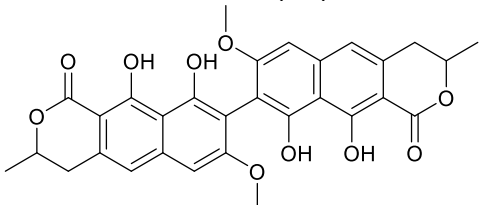
<i>Malbranchea sulfurea</i>			Actividad biológica	Referencia		
Metabolito secundario						
Malbranpirrol A (39)	Malbranpirrol B (40)	Malbranpirrol C (41)	Citotóxicos (41-44)	(Yang et al., 2009)		
						
Malbranpirrol D (42)	Malbranpirrol E (43)	Malbranpirrol F (44)				
						
Tf-26Vx (45)					Antibiótico	(Saito et al., 1979)
						

Tabla 3. Perfil metabólico del género *Malbranchea* (continuación).

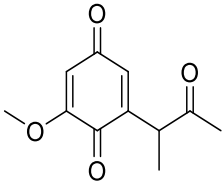
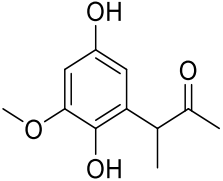
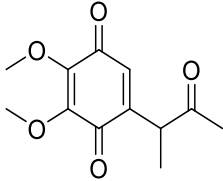
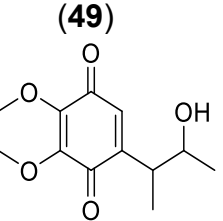
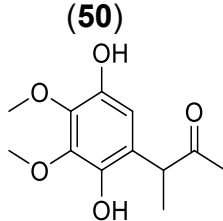
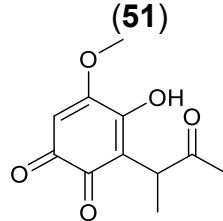
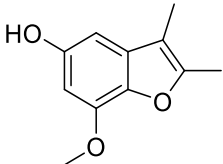
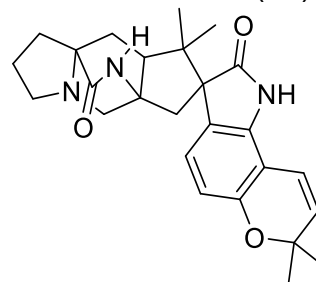
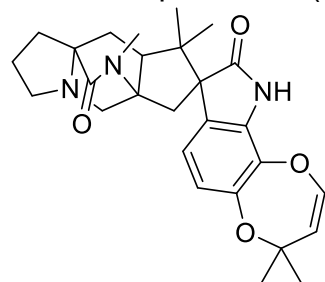
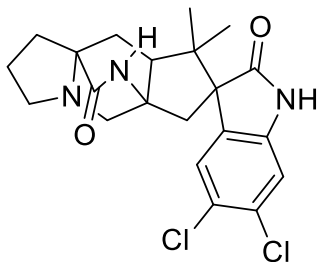
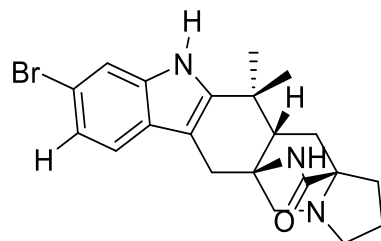
<i>Malbranchea cinnamomea</i>		Actividad biológica	Referencia
Metabolito secundario			
Malbracinina (46)		Antibiótico Citotóxico	(Chiung et al., 1993)
Dihidromalbracinina (47)			
7-metoximalbracinina (48)			
Derivados de malbracinina		Inhibidor del gen de transcripción viral HTLV-I (48)	(Schlegel et al., 2003a)
(49)			
(50)			
(51)			
7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (52)		Antioxidante	(Schlegel et al., 2003b)

Tabla 3. Perfil metabólico del género *Malbranchea* (continuación).

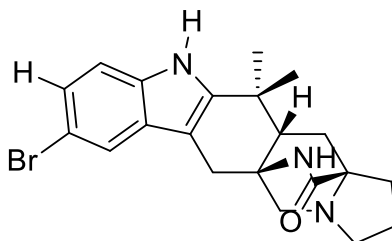
<i>Malbranchea graminicola</i>			Actividad biológica	Referencia
Metabolito secundario				
Espiromalbramida (53)	Paraherquamida B (54)	Notoamida B (55)	No se ha reportado	(Watts et al., 2011)
Malbranqueamida C (56)	Isomalbranqueamida C (57)			



Malbranqueamida C (56)



Isomalbranqueamida C (57)



2. Planteamiento del Problema

Como se indicó en los antecedentes, la diabetes representa el problema de salud más grave a nivel global. De acuerdo a la OMS el impacto de esta enfermedad en la economía de sus países miembros, y en particular de los países de bajos recursos, ha sido devastador. De tal forma que el 12% del presupuesto de salud global se utiliza para el tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones. México, que ocupa el sexto lugar de prevalencia de diabetes, emplea la mayor parte del presupuesto asignado al sector salud en el tratamiento y prevención de esta afección, que hoy día afecta por igual a niños y adultos. El control exitoso de la enfermedad se basa en el tratamiento con fármacos y hábitos de vida saludables. Muchos de los fármacos empleados actualmente presentan efectos adversos, lo cual hace necesario la búsqueda continua de nuevas alternativas terapéuticas.

En este sentido, la naturaleza representa una fuente invaluable de productos útiles *per se* o como moléculas líderes para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la DT2. Estos productos cuentan con un efecto sobre diferentes dianas terapéuticas, incluyendo a las enzimas α -glucosidasas.

Las α -glucosidasas se encuentran en la luz del intestino delgado y su función consiste en hidrolizar oligosacáridos para liberar glucosa, la cual se absorbe y pasa a la circulación. Los inhibidores de α -glucosidasas bloquean a estas enzimas, de tal forma que se reduce la tasa de digestión de carbohidratos y, en consecuencia, la hiperglucemia posprandial. Este tipo de fármacos se prescriben comúnmente en conjunto con estimulantes de la secreción de insulina o sensibilizadores a su acción. Los buenos resultados de estas combinaciones han estimulado la búsqueda de nuevos inhibidores de α -glucosidasas con menores efectos secundarios. En el proceso de búsqueda de nuevos inhibidores de α -glucosidasas, los microorganismos fúngicos constituyen una fuente importante de estos agentes.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo se generó como parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de inhibidores de las α -glucosidasas de origen natural con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos. Tras realizar un tamizaje

a través de la evaluación espectrofotométrica contra α -glucosidasa de levadura de varios extractos fúngicos, el hongo *Malbranchea flavorosea* fue seleccionado como una fuente prometedora de inhibidores de estas enzimas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Descubrir nuevos inhibidores de la enzima α -glucosidasa de utilidad para el desarrollo de fármacos innovadores y/o herramientas de investigación a partir de la especie fúngica *Malbranchea flavorosea*.

3.2. Objetivos particulares

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

- ♣ Cultivar en mediana escala la especie fúngica activa y preparar sus extractos orgánicos con el fin de comprobar su efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas de levadura y de raspado intestinal de rata.
- ♣ Obtener el extracto crudo y proceder al aislamiento y purificación de los metabolitos activos en forma pura, para la determinación de sus estructuras químicas y realización de ensayos biológicos.
- ♣ Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. El cumplimiento de este objetivo conducirá a la caracterización de sustancias que representen prototipos estructurales innovadores para el desarrollo de agentes inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.
- ♣ Evaluar la interacción de los principios activos puros con las enzimas α -glucosidasas mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico *in vitro*. Este ensayo permitirá la detección de principios activos que inhiban la actividad de las enzimas α -glucosidasas.
- ♣ Comprobar el efecto inhibitorio sobre las α -glucosidasas de al menos uno de los compuestos aislados *in vivo*, utilizando una prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normo e hiperglucémicos de la cepa ICR.

4. Parte Experimental

4.1. Material fúngico

El hongo *Malbranchea flavorosea* Sigler et Carmichael fue obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC No. 34529).



Figura 5. *Malbranchea flavorosea*.

4.2. Procedimientos cromatográficos generales

Los análisis cromatográficos en capa delgada (CCD) se realizaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (0.25 mm de espesor, Merck®) de diferentes dimensiones.

Para la visualización de las placas se utilizó una lámpara UV con dos longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico como agente cromógeno.

La cromatografía en columna rápida (tipo “flash”) se realizó en un cromatógrafo Teledyne ISCO CombiFlashRfLumen equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), donde se utilizó como fase estacionaria un cartucho de 80 gramos de sílice RediSepRf high performance GOLD y como fase móvil un gradiente de Hex-CHCl₃-MeOH.

El análisis cromatográfico en columna abierta (CCA) se realizó con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (2:8).

4.3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron por la técnica de reflectancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400. El registro de este espectro se realizó en la Unidad de Apoyo a la Investigación e Industria (USAII) de la Facultad de Química (FQ) de la UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H, 500 MHz) y de carbono (RMN-¹³C, 125 MHz) se registraron en un equipo Bruker AVANCE III HD, utilizando DMSO- δ_6 como disolvente y tetrametilsilano como estándar interno. Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Perkin Elmer 343 a 25°C en metanol y a la longitud de onda de la línea D-sodio ($\lambda=589$ nm). El análisis por difracción de rayos X se realizó en un difractor Nicolet R3m. Estas tres determinaciones se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM.

Los análisis por cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (CLUE-EM) se realizaron empleando un cromatógrafo Waters ACQUITY UPLC®, equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA), una bomba cuaternaria, y un inyector automático, acoplado a un detector de masas SQ2 (Waters). Se utilizó una columna BEH Shield RP18 de 2.1 mm de diámetro interno, 100 mm de longitud y 1.7 μm de tamaño de partícula. Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc®) de 0.2 μm \times 13 mm antes de ser inyectadas al cromatógrafo para su análisis. Como sistema de elución se empleó un gradiente lineal de acetonitrilo-agua (0.1% ácido fórmico; HCOOH) (15:85 \rightarrow 100:0). La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen de inyección de muestra fue de 3 μL . Para la obtención de los espectros en el UV, se realizó un barrido de 200 a 500 nm, lo que determinó las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos en el perfil cromatográfico.

Para el uso del detector de masas por la técnica de electrospray en modalidad positiva (ESI⁺) se utilizaron las siguientes condiciones: voltaje del capilar de 4.0 kV, voltaje de cono de 35 V, temperatura de desolvatación de 350 °C y un flujo de gas (N₂) de 500 L/h.

En el modo de ESI negativo (ESI⁻), el voltaje del capilar fue de 4.0 kV, voltaje de cono de 45 V, temperatura de desolvatación de 350 °C y un flujo de gas de 500 L/h. Todos los datos obtenidos fueron procesados con el programa MassLynx v 4.1.

4.4. Estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea flavorosea*

4.4.1. Fermentación de *M. flavorosea* a mediana escala

Malbranchea flavorosea fue cultivada en medio semisólido de arroz durante un mes, en condiciones estáticas, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad normales. El medio de cultivo empleado consistió de una mezcla 1:1 de 84 g de arroz blanco e integral y 200 mL de agua destilada. En total se utilizaron 420 gramos de la mezcla repartidas en cinco matraces Erlenmeyer de 500 mL.

4.4.2. Preparación de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo de *M. flavorosea*

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, a cada matraz se le adicionaron 350 mL de una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (8:2), y el medio de cultivo se maceró durante siete días; posteriormente el extracto se filtró y secó sobre sulfato de sodio anhidro; al concentrar *in vacuo* se obtuvo un residuo café oscuro. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones y cada uno de los extractos se analizó por cromatografía en capa delgada (CCD) para comprobar su homogeneidad cromatográfica.

4.4.3. Fraccionamiento del extracto orgánico de *M. flavorosea*

El extracto seco se sometió a un proceso de reparto entre hexano y una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) para así generar dos fracciones, una no polar (hexánica) y otra polar (MeCN-MeOH). Ambas fracciones se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío.

El extracto desgrasado (fase MeCN-MeOH) se fraccionó utilizando un cromatógrafo flash con un sistema de elución entre mezclas de hexano-CHCl₃, CHCl₃ y mezclas de CHCl₃-MeOH (Tabla 4 y Gráfica 1). De este fraccionamiento secundario se obtuvieron 191 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica en 22 fracciones secundarias (A-V). En la Tabla 5 se muestra el resumen del fraccionamiento secundario del extracto desgrasado.

Tabla 4. Resumen del sistema de elución empleado en el fraccionamiento secundario del extracto desgrasado.

Mezcla de disolventes	Gradiente	Fracciones obtenidas
Hex:CHCl ₃	100:0 → 0:99	1-35
CHCl ₃	100	36-65
CHCl ₃ :MeOH	100:0 → 98:2	66-102
CHCl ₃ :MeOH	98:2 → 95:5	103-120
CHCl ₃ :MeOH	95:5 → 90:10	121-142
CHCl ₃ :MeOH	90:10 → 80:20	143-159
CHCl ₃ :MeOH	80:20 → 0:99	160-167
MeOH	100	168-191

Gráfica 1. Sistema de elución Hexano-CHCl₃-MeOH empleado en el fraccionamiento secundario del extracto desgrasado.

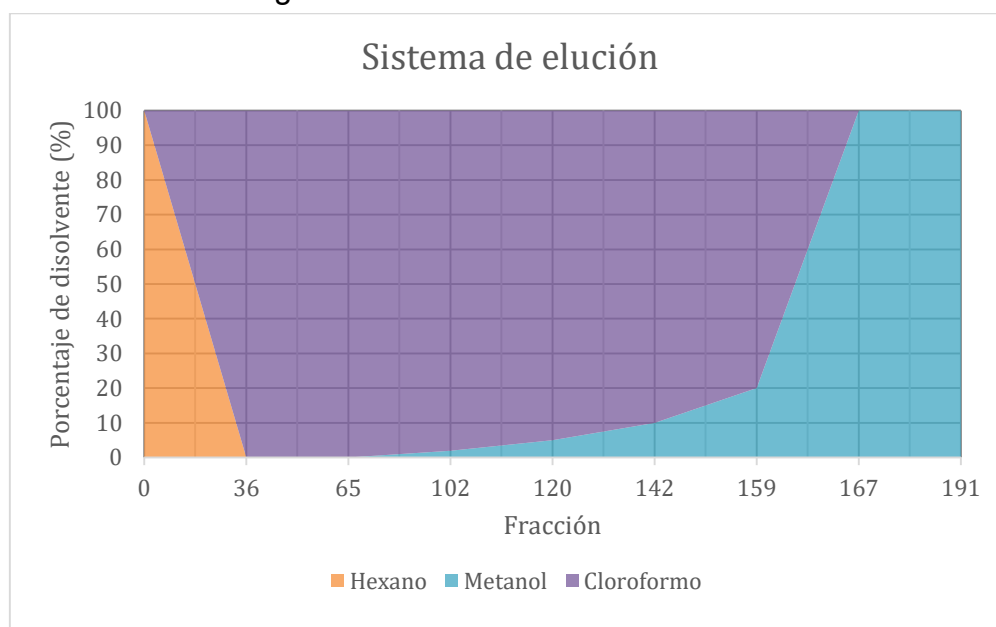


Tabla 5. Reunión de las fracciones secundarias del fraccionamiento del extracto desgrasado.

Fracciones combinadas	Clave de la fracción	Fracciones combinadas	Clave de la fracción
1-16	A	140-146	L
17-52	B	147-148	M
53-58	C	149-154	N
59-60	D	155-157	O
61-62	E	158-159	P
63-102	F	160-162	Q
103-114	G	163-166	R
115-123	H	167-168	S
124-130	I	169-173	T
131-133	J	174-178	U
134-139	K	179-191	V

4.4.4. Aislamiento, purificación y elucidación estructural del xylarinol A (**58**) y la massarigenina C (**59**)

En la fracción H (115-123) se observó la presencia de un precipitado blanco (**58**). El producto se purificó mediante un lavado con hexano y posterior recristalización de una mezcla de Hex-CH₂Cl₂-MeOH. A continuación se recopilaron sus constantes físicas y espectroscópicas.

En las fracciones J (131-133) y K (134-139) se observó a través de una CCD un compuesto mayoritario; estas fracciones se combinaron y procesaron mediante una CCA de Sephadex, utilizando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (2:8). De la fracción J-K_{iv} de esta columna cristalizó espontáneamente el compuesto **59**.

4.5. Ensayos de actividad biológica

4.5.1. Evaluación *in vitro* del extracto desgrasado y los compuestos puros **58** y **59** sobre las enzimas alfa-glucosidasas de levadura y raspado intestinal de rata

La evaluación del extracto desgrasado y los productos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas se realizó espectrofotométricamente en placas de 96

pozos con un equipo iMark (BioRad®) a una longitud de onda de 415 nm y una temperatura de 37°C.

Se prepararon soluciones en MeOH de las tres muestras objeto de ensayo: extracto desgrasado (500 ppm), y compuestos puros (**58** y **59**, 10 mM). Como control positivo se empleó acarbosa 10 mM, disuelta en buffer de fosfatos 100 mM pH 7. En cada pozo se colocó buffer de fosfatos, alícuotas crecientes de 0-20 µL del compuesto de prueba (inhibidor) y 20 µL de enzima de raspado intestinal de rata (40 mg del lisado intestinal en 1 mL de buffer) o 1 U/mL de α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en buffer de fosfatos. La placa se incubó durante 10 minutos a 37°C; posteriormente se adicionaron 10 µL de sustrato [α-D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG)] a una concentración de 10 mM en el caso de la enzima de mamífero y de 5 mM para la enzima de levadura. En este punto se tomó la lectura al tiempo cero, e inmediatamente la placa con la mezcla de reacción se incubó 30 minutos a 37°C. Al término de este tiempo se obtuvo la lectura final.

Los valores de absorbancias se obtuvieron mediante el programa Microplate Manager 6, y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición empleando la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \frac{A_f - A_i}{A_b} \right] \cdot 100$$

Donde A_f corresponde al valor de absorbancia final (30 minutos), A_i al valor de absorbancia al tiempo cero de cada muestra y A_b la absorbancia del blanco (pozo sin inhibidor). Los datos obtenidos de esta ecuación fueron procesados con Origin 9 para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

4.5.2. Evaluación *in vivo* del compuesto **59** a través de una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones ICR

La evaluación biológica *in vivo* de uno de los compuestos aislados de *M. flavorosea* se realizó a través de una prueba oral de tolerancia a la sacarosa (PTSO) en ratones macho ICR de 25-30 g de peso corporal, normoglucémicos e hiperglucémicos.

Los ratones utilizados se obtuvieron del Centro UNAM-Envigo (Envigo México, S.A. de C.V.). Los animales se mantuvieron a temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al alimento y agua. Todos los estudios fueron realizados de acuerdo a los principios y recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química (FQ/CICUAL/132/16).

La inducción del estado hiperglucémico se realizó administrando vía intraperitoneal (i.p.) 50 mg/kg de nicotinamida en solución salina (NaCl al 0.9%); después de 15 minutos los ratones recibieron vía i.p. 120 mg/kg de estreptozotocina en solución amortiguadora de citrato 100 mM (pH 4.5). Después de siete días de la inducción, los niveles de glucosa en sangre fueron cuantificados utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson). Los ratones con niveles de glucosa ≥ 190 mg/dL fueron considerados como hiperglucémicos y se incluyeron en el estudio.

Para llevar a cabo la prueba de tolerancia a la sacarosa, los ratones normoglucémicos o hiperglucémicos se dividieron en cinco grupos ($n = 8$). Después de 4 horas de ayuno, el grupo I fue tratado con el vehículo mientras que el grupo II fue administrado con el fármaco de referencia acarbosa (5 mg/kg), empleado como control positivo. Los grupos III-V fueron tratados con 3.2, 10 y 31.6 mg/kg del compuesto puro **59**. Treinta minutos después de la administración de los tratamientos, los animales recibieron una carga oral de sacarosa (3 g/kg). Los niveles de glucosa en sangre fueron determinados al tiempo cero y a los 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de la administración del carbohidrato. El porcentaje de variación de la glucemia fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Variación de glucemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \cdot 100$$

Donde, G_i es el valor de la glucemia inicial y G_t es el valor de la glucemia al tiempo de determinación (horas o días) posterior a la administración de los tratamientos.

5. Resultados y Discusión

El presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado al descubrimiento de nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas a partir de especies fúngicas y vegetales. En este caso, la especie objeto de estudio fue *Malbranchea flavorosea* adquirida comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC). Esta especie se seleccionó para su estudio con base en los resultados de una serie de evaluaciones biológicas preliminares contra α -glucosidasas de levadura. El extracto obtenido del medio semisólido del hongo inhibió de manera importante la actividad de la enzima.

La presentación de los resultados, así como la discusión de los mismos se realizará en tres partes. En la primera se presenta la evaluación del extracto desgrasado sobre las enzimas α -glucosidasas de mamífero, y así confirmar los resultados preliminares; en la segunda se abordará todo lo correspondiente al estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea flavorosea*; y finalmente, en la tercera parte, se discutirán los resultados obtenidos de la evaluación de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa tanto de levadura como de mamífero, así como de la prueba de tolerancia a la sacarosa realizada *in vivo*.

5.1. Comprobación de la actividad inhibitoria contra α -glucosidasas del extracto fúngico desgrasado

El efecto de extractos y productos sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa (tanto de mamífero como de levadura) se determinó mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico que se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG). La cantidad de *p*-nitrofenol liberado se detecta a 415 nm y es directamente proporcional a la actividad de la enzima α -glucosidasa.

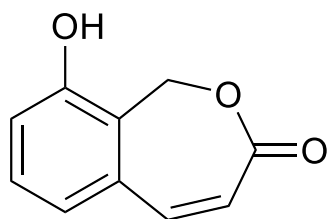
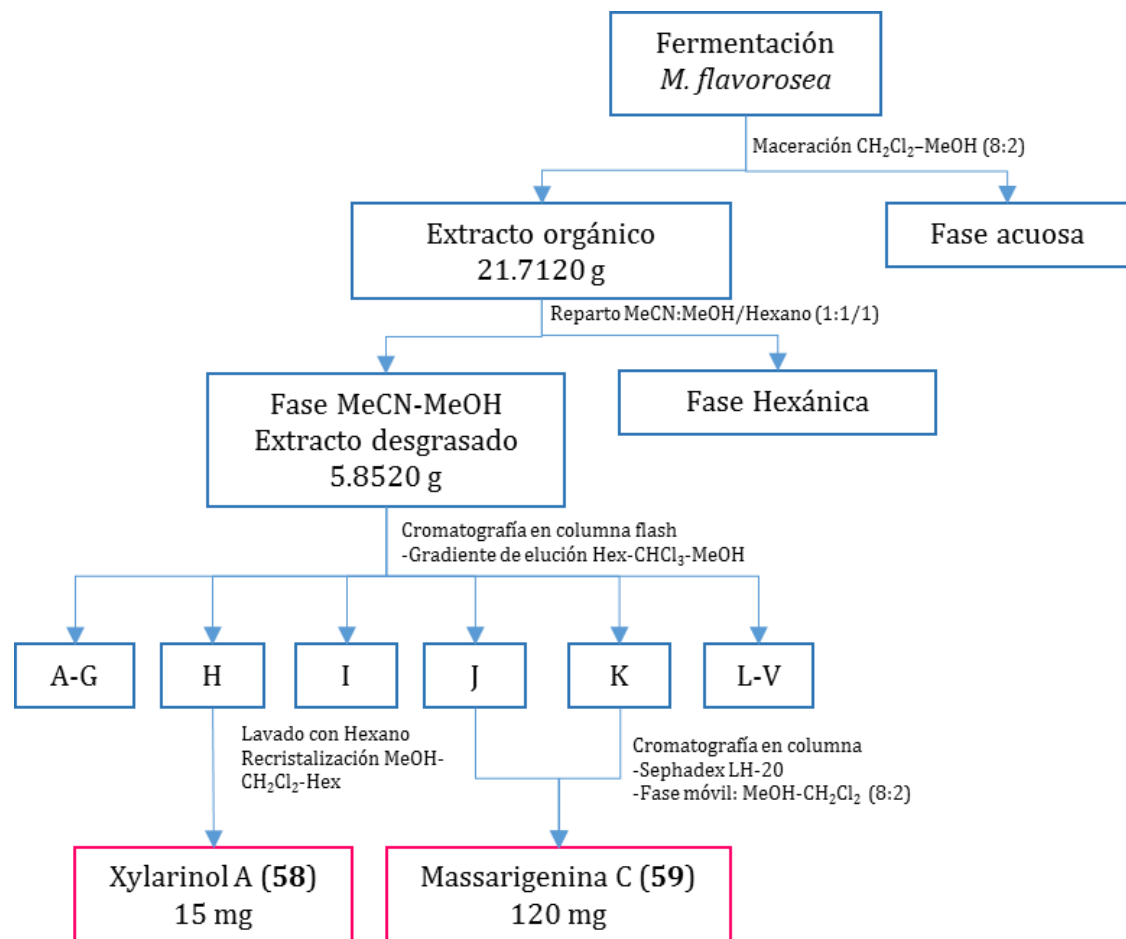
Así, la fracción primaria obtenida luego de un proceso de desgrase del extracto crudo, fue evaluada cualitativamente a 500 ppm utilizando a la enzima α -glucosidasa de mamífero. El efecto inhibitorio fue del 50 % y resultó comparable al de la acarbosa (1

mM), utilizada como control positivo. Este resultado, aunque preliminar, permitió comprobar la presencia en el extracto de metabolitos inhibidores de la enzima y dio la pauta para iniciar el estudio químico de la especie fúngica con el propósito de obtener los principios activos. Cabe mencionar que este proceso de evaluación se encuentra perfectamente estandarizado para organismos fúngicos que crecen en medio semisólido de arroz (Rivera-Chávez et al., 2015).

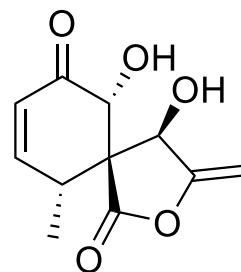
5.2. Estudio químico del extracto activo de *Malbranchea flavorosea*

El extracto orgánico (21.7120 g) obtenido a partir de la maceración del medio de cultivo, se sometió a un proceso de reparto con hexano y una mezcla de MeCN-MeOH (1:1). Este proceso permitió el fraccionamiento primario del extracto orgánico y generó dos fracciones, una de hexano que contenía los compuestos grasos del medio de cultivo, y otra que contenía los metabolitos presentes en el hongo [MeCN-MeOH (5.8520 g)]. La fracción primaria obtenida de la fase MeCN-MeOH se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna rápida (tipo “flash”) como se describió en la sección experimental. Este proceso generó veintidós fracciones (A-V). A partir de tres fracciones secundarias H, J, y K se aislaron y purificaron los compuestos **58** y **59**. Estas fracciones se seleccionaron en el presente estudio debido a que contenían un producto mayoritario. El **Esquema 1** resume el proceso de obtención de los metabolitos **58** y **59** de *M. flavorosea*, y se ilustran sus estructuras químicas.

La caracterización de los metabolitos **58** y **59** se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (IR, ^1H y ^{13}C -RMN, HSQC, HMBC, NOESY, COSY) y espectrometría de masas. En el caso del compuesto **59** fue posible comprobar la estructura propuesta mediante un análisis por difracción de rayos X. A continuación se describe brevemente la caracterización de los metabolitos.

Esquema 1. Estudio químico del extracto orgánico del hongo *M. flavorosea*.

Xylarinol A (58)



Massarigenina C (59)

5.2.1. Xylarinol A (**58**)

El metabolito **58** se obtuvo como un sólido blanco, soluble en MeOH. Su fórmula molecular se estableció como C₁₀H₈O₃ a partir del análisis de los espectros de RMN (¹H y ¹³C) y de espectrometría de masas. Esta fórmula permite un índice de deficiencia de hidrógenos de siete. El espectro en el IR evidenció la presencia de bandas típicas de un grupo hidroxilo (3315 cm⁻¹) y de un carbonilo de lactona α,β-insaturada (1689 cm⁻¹). El espectro en el UV es consistente con un compuesto aromático conjugado ya que se aprecia una banda intensa en una λ_{max} de 280 nm. Las constantes físicas y espectroscópicas selectas del compuesto **58** se muestran en la **Tabla 6**. Las señales correspondientes a los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 6. Constantes físicas y espectroscópicas del xylarinol A (**58**).

Fórmula Molecular	C ₁₀ H ₈ O ₃
Peso Molecular	176 g/mol
Punto de fusión	163-166 °C
UV (λ _{max})	220 y 280 nm
IR	3315, 1689, 1577, 1278 cm ⁻¹
EM	[M+H] ⁺ = 177.59 m/z [M+H] ⁻ = 175.58 m/z

Los espectros correspondientes se muestran en el apéndice.

El espectro de RMN-¹³C (**Figura 6**) presenta señales para diez carbonos en congruencia con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas; uno corresponde al grupo carbonilo de una lactona insaturada en δ_C 167.5 (C-3); ocho a carbonos aromáticos y olefínicos, de los cuales tres son cuaternarios [δ_C 154.4 (C-9), 137.0 (C-5a) y 121.5 (C-9a)], y uno de ellos (C-9) unido a una función fenólica; los cinco carbonos restantes corresponden a metinos [δ_C 140.7 (C-5), 130.1 (C-7), 122.5 (C-4), 120.5 (C-6), 117.2 (C-8)] que muestran una clara correlación en espectro bidimensional HSQC (**Figura 8**) con los hidrógenos localizados entre δ_H 6.25 y 7.35. De acuerdo al patrón de acoplamiento y desplazamientos químicos observados para las señales en δ_H 6.28 [H-4, (1H, d, J= 12.0)] y 7.33 [H-5, (1H, d, J= 12.0)] en el espectro de RMN-¹H (**Figura 7**), se estableció que las mismas correspondían a una doble ligadura conjugada de tipo *cis* (C-4, C-5). El espectro tipo COSY (**Figura 9**) permitió evidenciar una clara correlación entre estos hidrógenos.

Por otro lado, las señales de los tres metinos restantes [δ_{H} 6.97 (H-8), 6.99 (H-6) y 7.28 (H-7)] podían asignarse entonces a un anillo aromático trisustituido, ya que conformaban un sistema ABC típico de anillos aromáticos 1, 2, 3-trisustituidos. De nueva cuenta en el espectro COSY estas señales mostraron correlación y de acuerdo al espectro HSQC las señales de carbono correspondientes a estos hidrógenos se encuentran en δ_{C} 117.2 (C-8), 120.5 (C-6) y 130.1 (C-7), respectivamente. El último carbono que se observa en el espectro corresponde al de un metileno [δ_{C} 60.7 (C-1)] unido a una función oxigenada. Los hidrógenos correspondientes se observan como un singulete en δ_{H} 5.12. Cabe señalar, que el espectro de RMN- ^1H presenta una señal intercambiable por D_2O en δ_{H} 10.17 (9-OH), ese protón corresponde al hidroxilo que tiene como base al carbono aromático en δ_{C} 154.4 (C-9).

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para el xylarinol A (**58**) en $\text{DMSO}-d_6$ (^1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz).

	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY
1	60.7	5.12 (2H, s)	3, 5a, 9, 9a	-
3	167.5	-	-	-
4	122.5	6.28 (1H, d, $J= 12.0$)	3, 5, 5a	5
5	140.7	7.33 (1H, d, $J= 12.0$)	3, 4, 5a, 9a	4
5a	137.0	-	-	-
6	120.5	6.99 (1H, d, $J= 8.1$)	5, 5a, 7, 8, 9a	7
7	130.1	7.28 (1H, t, $J= 7.9$)	5a, 6, 8, 9	6, 8
8	117.2	6.97 (1H, d, $J= 7.5$)	6, 7, 9, 9a	7
9	154.4		-	-
9a	121.5	-	-	-
9-OH	-	10.17 (1H, s)	-	-

La información recabada a este punto de la discusión permitió proponer los elementos estructurales que se resumen en la **Figura 10**. Estos elementos satisfacen seis de las insaturaciones requeridas por la fórmula molecular, por lo tanto la estructura debe tener un ciclo adicional correspondiente al de la lactona.

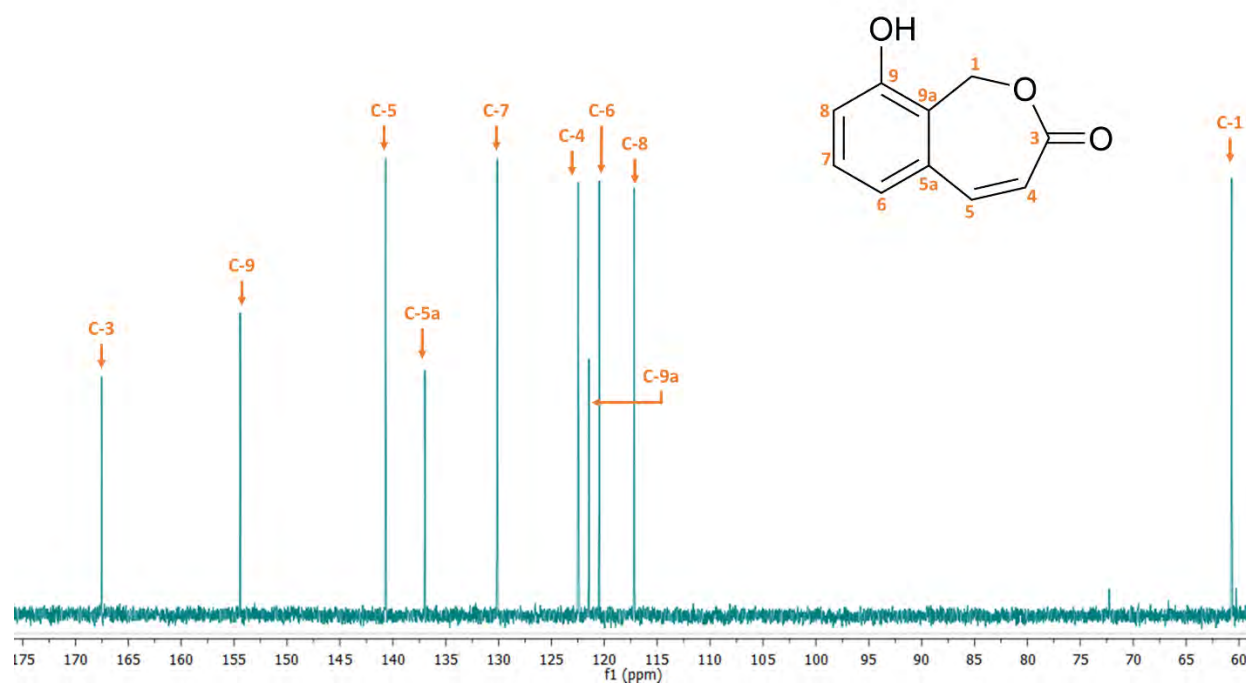


Figura 6. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del xylarinol A (58).

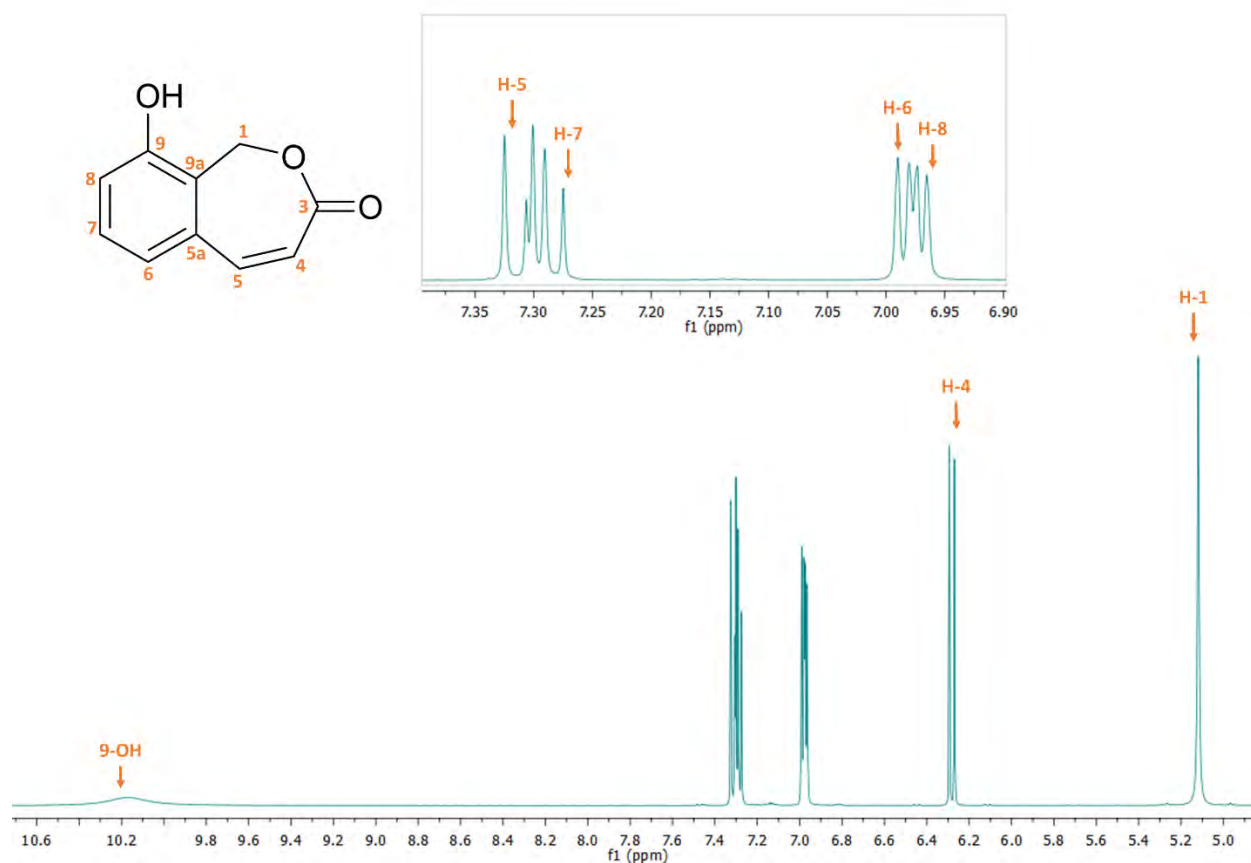


Figura 7. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del xylarinol A (58).

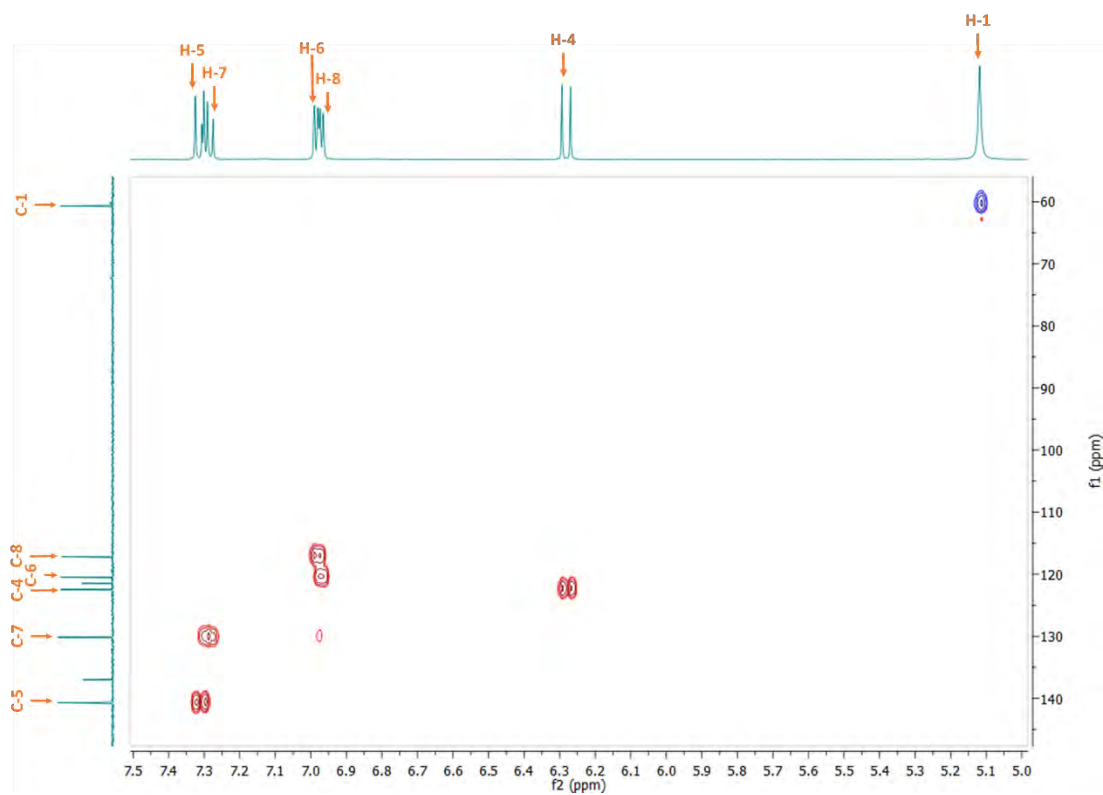


Figura 8. Espectro bidimensional HSQC del xylarinol A (**58**).

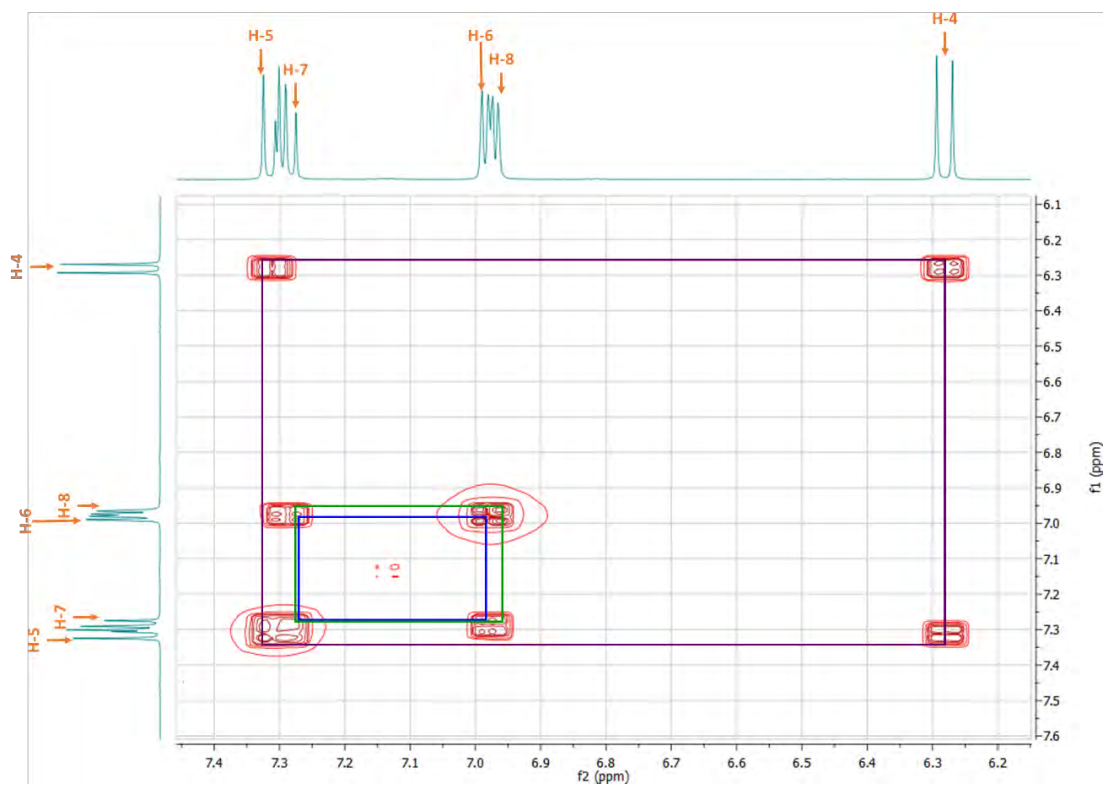


Figura 9. Espectro bidimensional COSY del xylarinol A (**58**).



Figura 10. Elementos estructurales parciales del compuesto **58**.

Las correlaciones observadas en el espectro HMBC (**Figura 11**), y que se indican en la **Tabla 7** permitieron la integración de las estructuras parciales propuestas. Las más relevantes son las correlaciones de los hidrógenos del metileno (C-1) en δ_H 5.12 con los carbonos correspondientes al carbonilo (C-3), C-9, C-5a, C-9a, mismas que indican que el metileno es bencílico y que se encuentra *orto* al hidroxilo fenólico; y las correlaciones del hidrogeno vinílico en δ_H 7.33 (H-5) con el carbonilo de la lactona (C-3), C-5a, C-9a; estas últimas indicaron que la doble ligadura se une al anillo aromático en el carbono *orto* al metileno bencílico y que por ende, la lactona es heptacíclica (**Figura 12**).

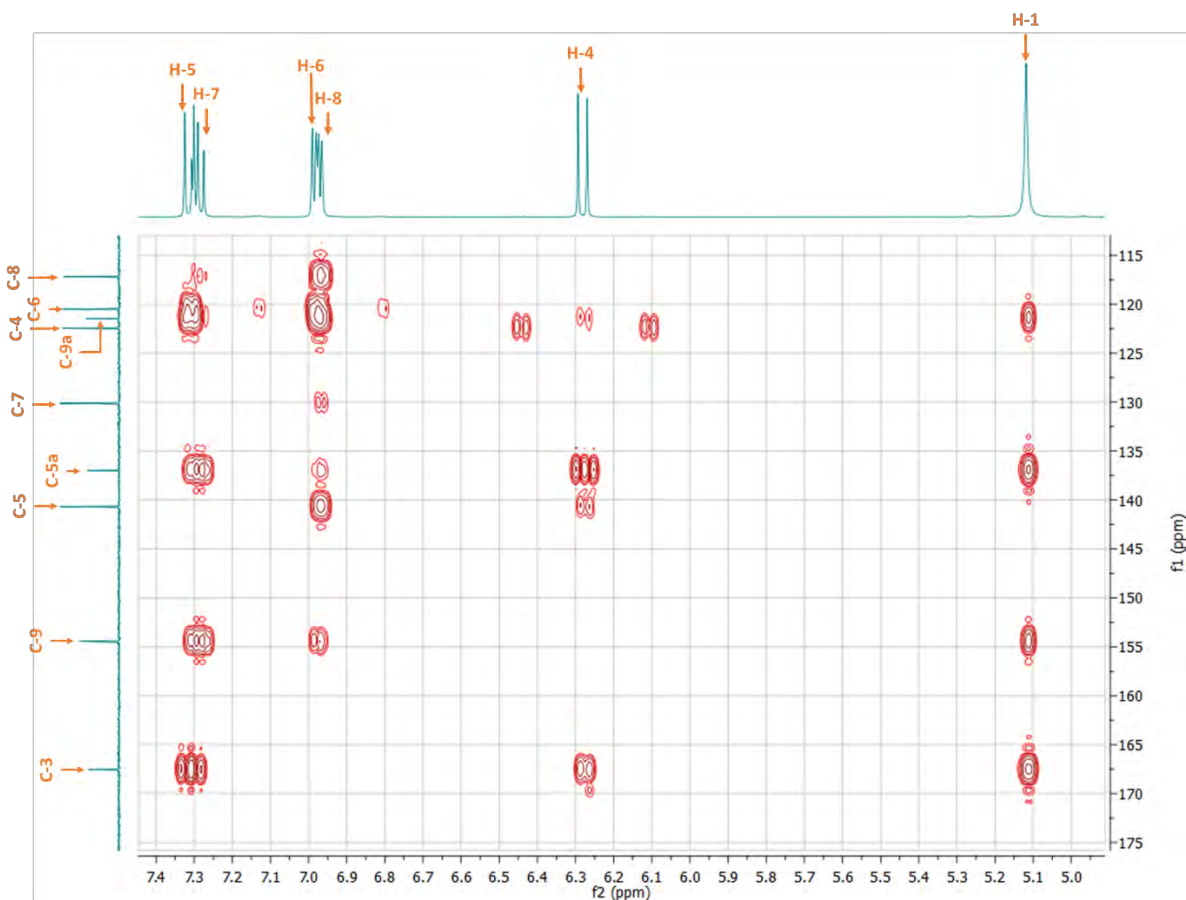


Figura 11. Espectro bidimensional HMBC del xylarinol A (**58**).

Con base en la discusión anterior se propuso la estructura del compuesto **58** como la de la 9-hidroxi-1H-benzo[*c*]oxepin-3-ona, compuesto conocido con el nombre de trivial de xylarinol A. Este metabolito se aisló previamente del basidiomiceto *Xylaria polymorpha*, por lo que el presente hallazgo constituye el segundo reporte de este producto natural. Cabe mencionar que en el primer reporte acerca de este metabolito se describieron sus propiedades como secuestrador moderado de radicales libres al presentar un 40% de inhibición en el ensayo empleado para su evaluación (Lee et al., 2009).

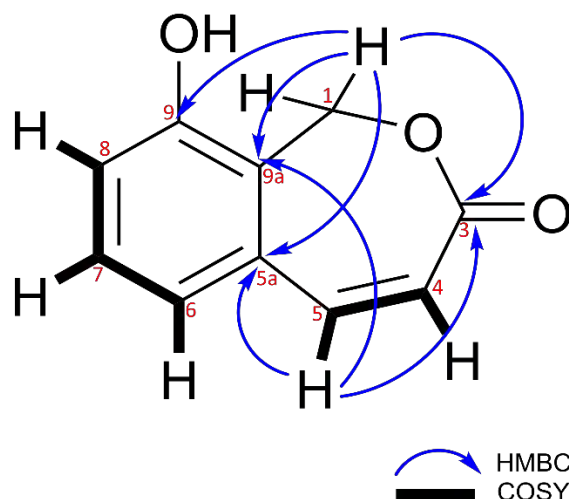


Figura 12. Correlaciones HMBC y COSY selectas para el xylarinol A (**58**).

5.2.2. Massarigenina C (**59**)

El compuesto **59** fue aislado como un sólido cristalino soluble en MeOH. Su fórmula molecular se determinó como $C_{11}H_{12}O_5$ a partir del análisis de los espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C y de masas. El espectro de masas obtenido por ESI $^+$ mostró el ion pseudomolecular $[M+H]^+$ en una relación de masa carga (m/z) de 247.63. El espectro en el IR mostró bandas características de grupos hidroxilo (3458 cm^{-1}), carbonilo (1794 cm^{-1}) y carbonilo α,β -insaturado (1670 cm^{-1}). En la **Tabla 8** se muestra un resumen con las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **59**. Las señales correspondientes a los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la massarigenina C (**59**).

Fórmula Molecular	C ₁₁ H ₁₂ O ₅ (ii= 6)
Peso Molecular	246 g/mol
Punto de fusión	77-80 °C
UV (λ_{\max})	230 nm
IR	3643, 3458, 1794, 1670 cm ⁻¹
EM (ESI ⁺)	[M+H] ⁺ = 247.63 <i>m/z</i>
Rotación Óptica Específica [α] _D ²⁵	-198.1 °

Los espectros correspondientes se muestran en el apéndice.

El espectro de RMN-¹³C (**Figura 14**) presenta señales para once carbonos, lo cual concuerda con la fórmula mínima establecida a través de espectrometría de masas. De estos once carbonos, dos son carbonilos [δ_c 195.5 (C-1) y 173.9 (C-7)], el primero de una cetona conjugada y el otro de una lactona; y cuatro son olefínicos (δ_c 87.7, 127.1, 150.0 y 158.34). Dentro de este grupo, los carbonos en δ_c 127.1 (C-2) y 150.0 (C-3) mostraron correlación en el espectro HSQC con los dobletes de protones en δ_H 5.96 y 6.63, respectivamente; las constantes de acoplamiento ($J = 10, 3.2$ ó 2 Hz) observadas para estos dos protones indicaron su relación *cis* y su acoplamiento con un tercer hidrógeno, que podía ser vecinal o alílico. Estas afirmaciones se comprobaron mediante la interacción de estos dos hidrógenos vinílicos entre sí y, con un multiplete en δ_H 3.24 en el espectro COSY. El desplazamiento químico de las señales en δ_c 150.0 (C-3) y 195.5 (C-1), indicó que esta doble ligadura se encuentra conjugada a la función cetona. Los otros dos carbonos vinílicos [δ_c 87.7 (C-10) y δ_c 158.3 (C-8)] se asignaron a una doble ligadura disustituida asimétricamente; la primera señal de carbono mostró correlación en el espectro HSQC con dos protones [δ_H 4.48 (H-10b) y 4.73 (H-10a)] por lo que se asignó a un metileno terminal; en tanto que el desplazamiento del segundo indicaba que se encontraba unido a una función oxigenada, posiblemente el oxígeno que esterifica el carbonilo de la lactona. El espectro de RMN-¹³C presentó a campo más alto cinco señales adicionales; dos son metinos base de oxígeno en δ_c 75.6 (C-6) y 66.9 (C-9), y correlacionan en el espectro HSQC con los hidrógenos en δ_H 4.89 [1H, d, $J = 5.10$ Hz, (H-9)] y 4.36 [señal múltiple, (H-6)]. Las tres señales restantes corresponden a carbonos alifáticos en δ_c 59.9 (C-5), 35.8 (C-4) y 15.2 (C-11); el primero de ellos de tipo cuaternario y los dos últimos correlacionaron con los protones de un metino en δ_H 3.24 [señal múltiple,

(H-4)] y de un metilo en δ_H 1.09 [3H, d, $J = 7.44$ Hz, (H-11)], respectivamente, en el espectro HSQC. Las señales de estos dos últimos protones correlacionaron en el espectro COSY, indicando su relación vecinal. Cabe mencionar que en el espectro de RMN- 1H (**Figura 15**) se observaron también dos señales intercambiables por D₂O en δ_H 5.94 (9-OH) y 5.36 (6-OH), que se asignaron a dos grupos hidroxilo. Los hidrógenos de estos hidroxilos muestran un cuadro de conectividad en el espectro COSY con los hidrógenos H-9 y H-6, respectivamente, indicando que el hidroxilo e hidrógeno, en cada caso, se encuentran sobre el mismo carbono.

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN- 1H y de RMN- ^{13}C para la massarigenina C (**59**) en DMSO- δ_6 (1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz).

	δ_C	δ_H (J en Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	NOESY
1	195.5	-	-	
2	127.1	5.96 (1H, dd, $J = 3.2, 10.1$)	4, 6	
3	150.0	6.63 (1H, dd, $J = 2.0, 10.1$)	1, 4, 5, 11	
4	35.8	3.24 (1H, m)	2, 3, 5, 7, 9, 11	
5	59.9	-	-	
6	75.6	4.36 (1H, d, $J = 5.10$)	1, 4, 5, 7, 9	
7	173.9	-	-	
8	158.3	-		
9	66.9	4.89 (1H, m)	4, 5, 6, 8, 10	H-11
10	87.7	4.48 (1H, dd, $J = 2.30$) 4.73 (1H, t, $J = 2.52$)	8, 9	
11	15.2	1.09 (3H, d, $J = 7.44$)	3, 4, 5	H-9
6-OH	-	5.36 (1H, d, $J = 5.42$)	1, 5, 6	9-OH
9-OH	-	5.94 (1H, d, $J = 7.10$)	5, 8, 9	6-OH

Los espectros bidimensionales se muestran en el apéndice.

Del análisis anterior se propusieron las estructuras parciales que se ilustran en la **Figura 13**.

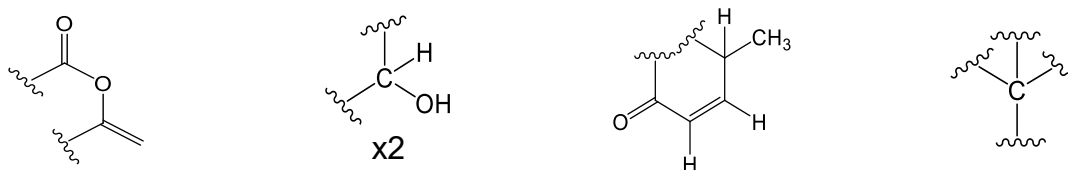


Figura 13. Estructuras parciales del compuesto **59**.

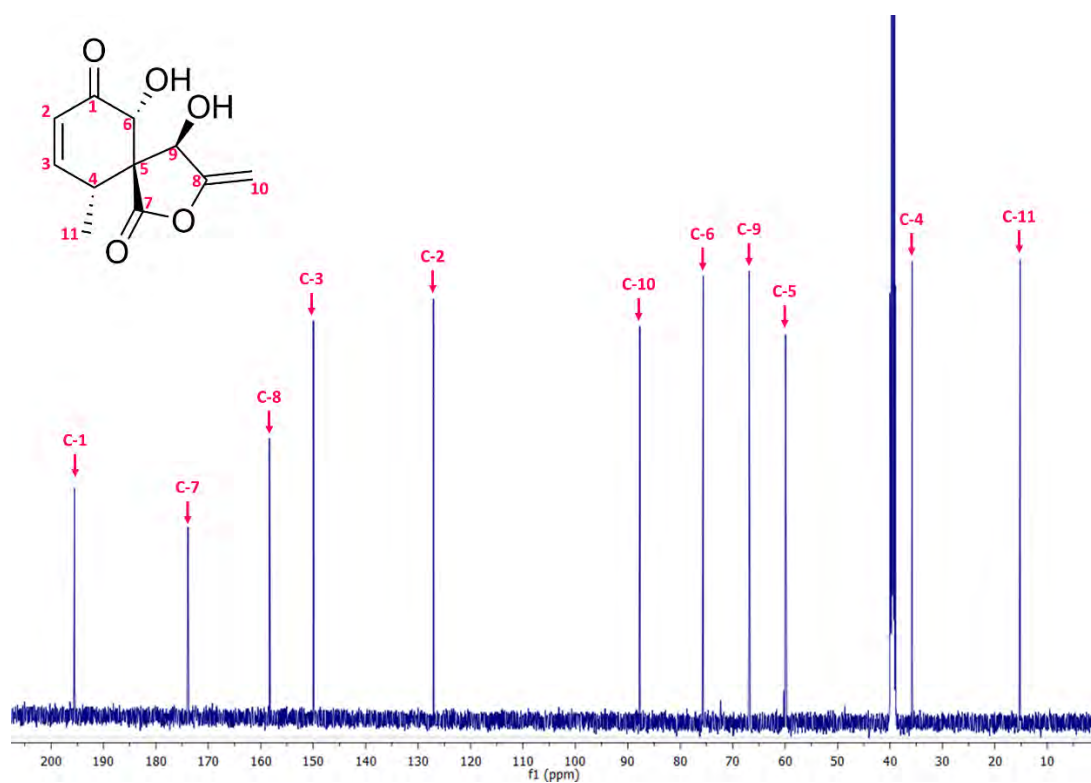


Figura 14. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de la massarigenina C (59).

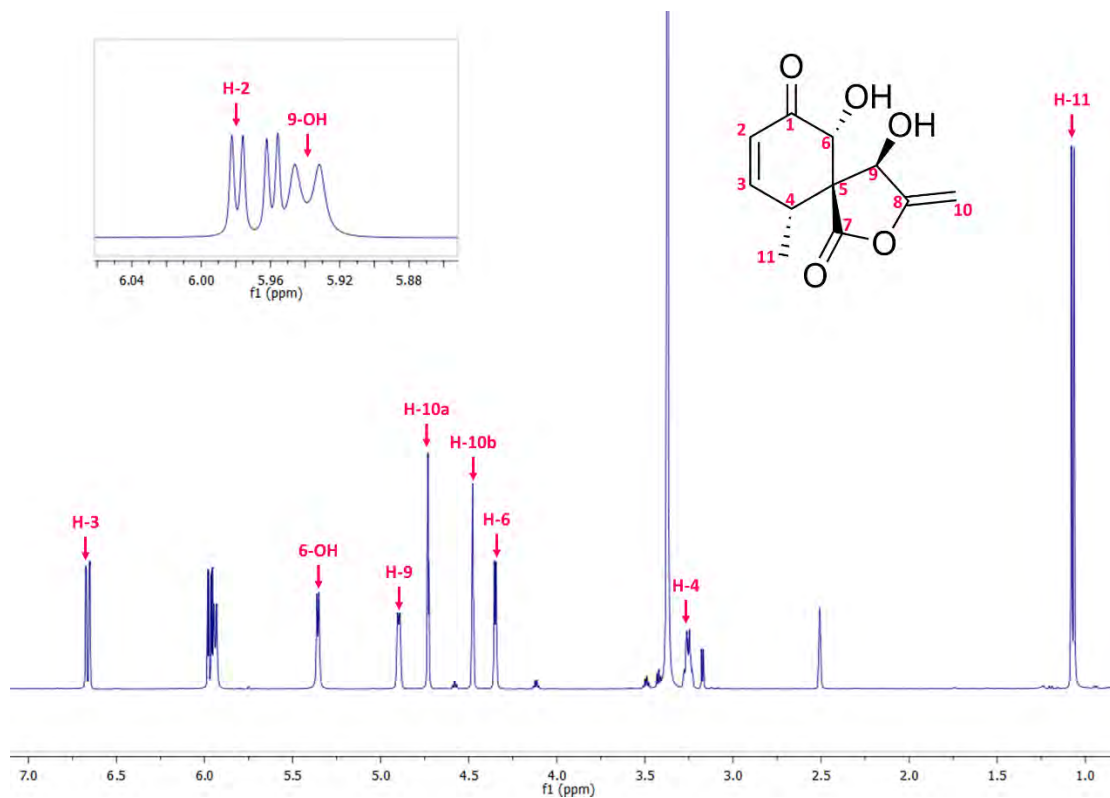


Figura 15. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de la massarigenina C (59).

Las correlaciones observadas en los experimentos de tipo HMBC y NOESY permitieron la integración de las estructuras parciales en dos ciclos, unidos por un carbono de tipo espiro [δ_C 59.9 (C-5)]. Cabe destacar que la ubicación de los dos hidroxilos se realizó con base en las correlaciones observadas en el espectro HMBC y que bien se resumen en la **Tabla 9** y **Figura 16**. Asimismo, en el experimento NOESY se observó la correlación de los hidrógenos de los dos hidroxilos, por lo tanto estos debían encontrarse de un mismo lado en la estructura. Otra correlación importante en el espectro NOESY es la que se observa entre la señal del metilo (C-11) y uno de los hidrógenos geminales a uno de los hidroxilos [δ_H 4.89, (H-9)], indicando también su presencia en la misma cara de la molécula.

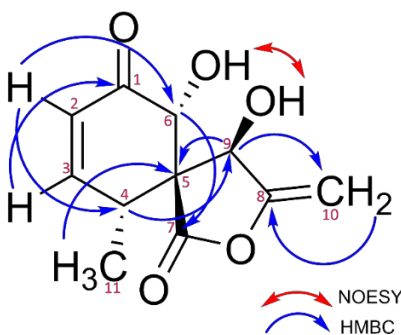


Figura 16. Correlaciones de HMBC y NOESY selectas para la massarigenina C (**59**).

Un análisis de difracción de rayos X permitió comprobar la estructura propuesta (**Figura 17**). Además, mediante el cálculo del parámetro de Flack se estableció la configuración absoluta de los cuatro centros quirales de la molécula como $4R$, $5R$, $6R$ y $9R$.

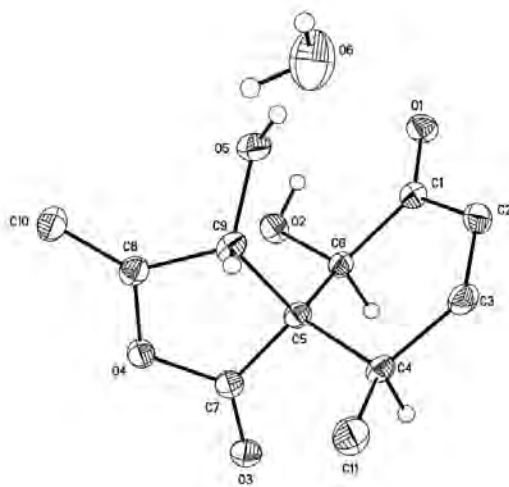


Figura 17. Estructura generada por el análisis de difracción de rayos X del compuesto **59**.

El fenómeno que permite el cálculo de este parámetro se basa en un proceso de dispersión anómala de las radiaciones utilizadas durante la ejecución del análisis. El valor de este parámetro oscila entre 1 y 0. Cuando el valor es cercano a cero la configuración de los centros estereogénicos es idéntica a la observada en la estructura refinada. Cuando el valor es igual a 0.5, el producto es una mezcla racémica y, cuando es cercano a 1, la configuración es contraria a la observada en la estructura refinada. En este caso el valor fue de 0.2, por lo que la configuración es idéntica a la que se aprecia en la **Figura 17**.

De acuerdo con estos resultados, se determinó que el compuesto **59** correspondía a la massarigenina C, metabolito aislado previamente del hongo acuático *Massarina tunicata*, el cual presentó actividad antibiótica contra *Bacillus subtilis* (Oh et al., 2003). Para este compuesto, el presente trabajo también constituye el segundo reporte de su aislamiento.

5.3. Evaluación biológica de los compuestos aislados

5.3.1. Evaluación *in vitro* del efecto de los compuestos aislados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas

Con la finalidad de comprobar si el xylarinol A (**58**) y la massarigenina C (**59**) eran los responsables de la actividad biológica detectada en el extracto desgrasado, se procedió a determinar su efecto contra las α -glucosidasas de raspado intestinal de rata y de levadura.

Los metabolitos **58** y **59** fueron evaluados contra las α -glucosidasas de mamífero en un rango de concentraciones entre 0 y 3 mM. Los dos compuestos inhiben las enzimas del raspado intestinal de rata con una CI_{50} del orden de 1 mM, en comparación con la acarbosa utilizada como control positivo ($CI_{50} = 0.36 \pm 0.065$ mM). En ambos casos se llegó aproximadamente al 80% de inhibición con la concentración más alta. A continuación se muestran las figuras con las curvas concentración-respuesta (C-R) así como la CI_{50} de los compuestos **58** y **59**.

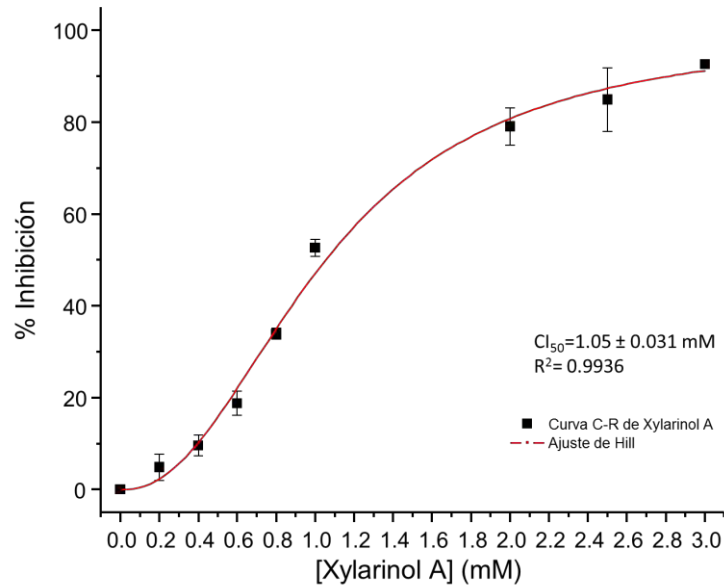


Figura 18. Curva C-R del compuesto **58** en enzima de mamífero.

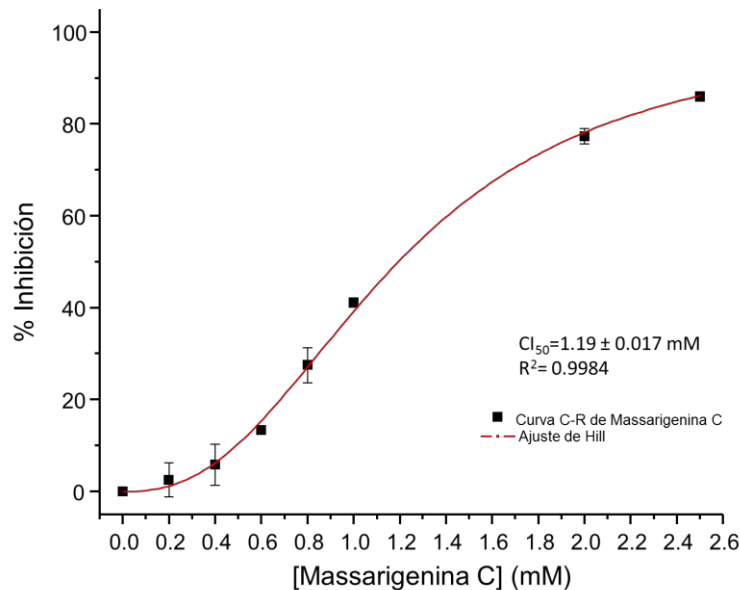


Figura 19. Curva C-R del compuesto **59** en enzima de mamífero.

En el caso de enzima de levadura, los compuestos se evaluaron en un rango de concentración entre 0 y 2.0 mM. El porcentaje de inhibición a las concentraciones máximas fue prácticamente del 100% y las CI_{50} también fueron del orden de 1 mM, en comparación con la acarbosa ($CI_{50} = 0.50 \pm 0.015$ mM). Las **Figuras 20 y 21** muestran la curva concentración-respuesta, así como la CI_{50} de cada metabolito.

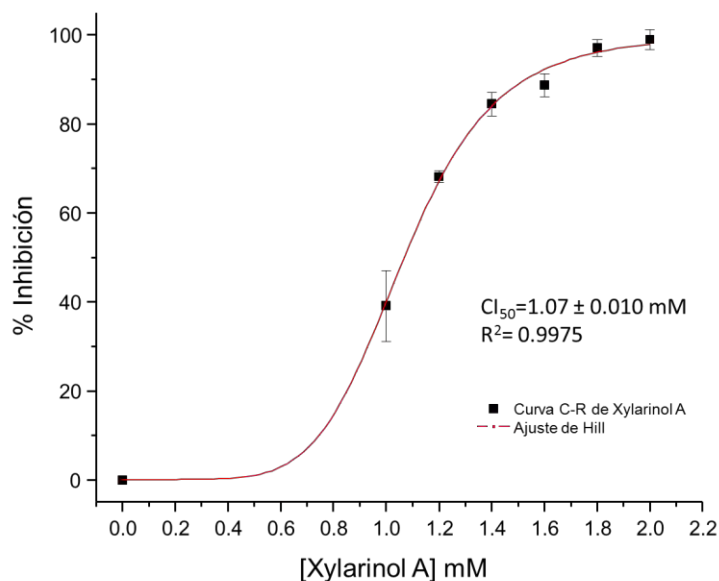


Figura 20. Curva C-R del compuesto **58** en enzima de levadura.

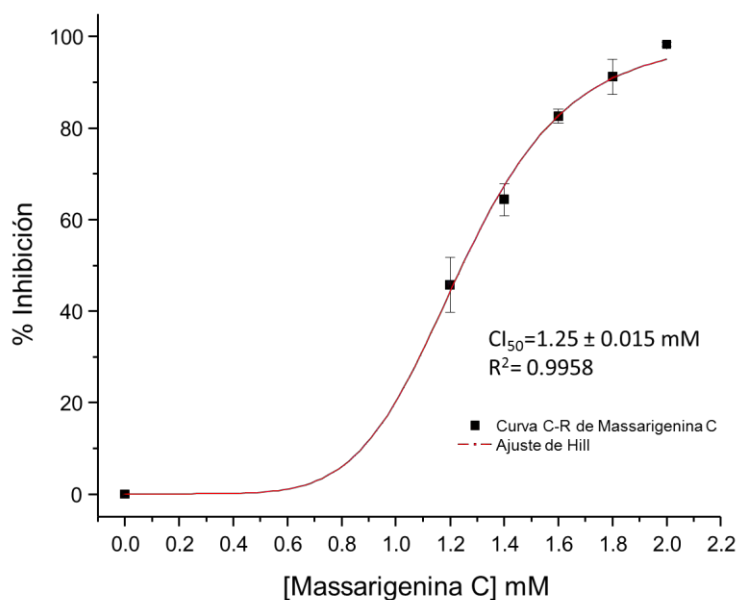
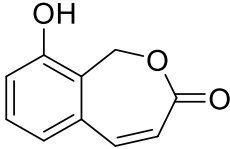
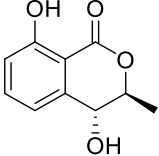
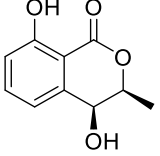


Figura 21. Curva C-R del compuesto **59** en enzima de levadura.

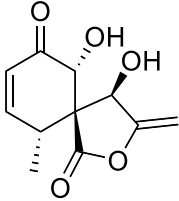
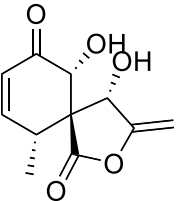
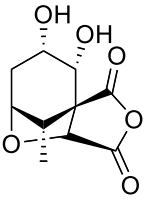
La inhibición ejercida por el xylarinol A (**58**) contra α -glucosidasa de levadura podría ser de tipo alostérica al igual que la de los compuestos **60-61** estructuralmente relacionados (**Tabla 10**) (Rivera-Chávez et al., 2015). Claro está, es necesario realizar los estudios de cinética enzimática correspondientes para comprobar esta hipótesis.

Tabla 10. Metabolitos activos estructuralmente parecidos al xylarinol A (**58**).

 <p>Xylarinol A (58)</p>	 <p>3S,4R-(+)-4-hydroximeleína (60)</p>	 <p>3S,4S-(+)-4-hydroximeleína (61)</p>
Cl ₅₀ 1.07 mM	Cl ₅₀ 441 μM	Cl ₅₀ 549 μM

Los productos naturales tipo massarigenina C (**59**) han sido evaluados contra líneas celulares y bacterias, y en todos los casos las actividades reportadas no fueron buenas, por lo tanto, el hallazgo de su efecto inhibitorio contra las enzimas α -glucosidasas podría ser de relevancia para compuestos con el mismo núcleo estructural (Fukami et al., 1999; Oh et al., 2001).

Tabla 11. Metabolitos activos con estructuras similares a la massarigenina C (**59**).

 <p>Massarigenina C (59)</p>	 <p>6-epi-5'-hidroxi-mycosporulona (62)</p>	 <p>Massarilactona A (63)</p>
Inhibidor de α -glucosidasas Cl ₅₀ = 1.25 mM	Citotóxico Cl ₅₀ > 100 μg/mL	Antibacteriano 19 mm (200 μg/disco)

Como los compuestos inhibieron ambos tipos de glucosidasas se puede concluir que no son selectivos para algún tipo específico de α -glucosidasa. Sin embargo, su importante efecto sobre la enzima de mamífero sugiere una actividad antihiper glucémica potencial *in vivo*.

5.3.2. Evaluación *in vivo* del efecto de la massarigenina C (**59**) en una prueba oral de tolerancia a la sacarosa

Con base en los resultados previos se procedió a realizar la evaluación *in vivo* del compuesto **59**, que fue el que se obtuvo en mayor cantidad.

El compuesto **59** se evaluó mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos. En esta prueba se observó la disminución significativa del pico posprandial a las tres dosis ensayadas (3.2, 10 y 31.6 mg/kg). A la dosis más alta, la disminución del pico fue mejor que la provocada por la acarbosa. En los tiempos subsiguientes al pico posprandial solo algunas dosis presentaron efecto importante respecto al vehículo, sin embargo, se nota la misma tendencia que la del fármaco de referencia, acarbosa (**Figura 22**).

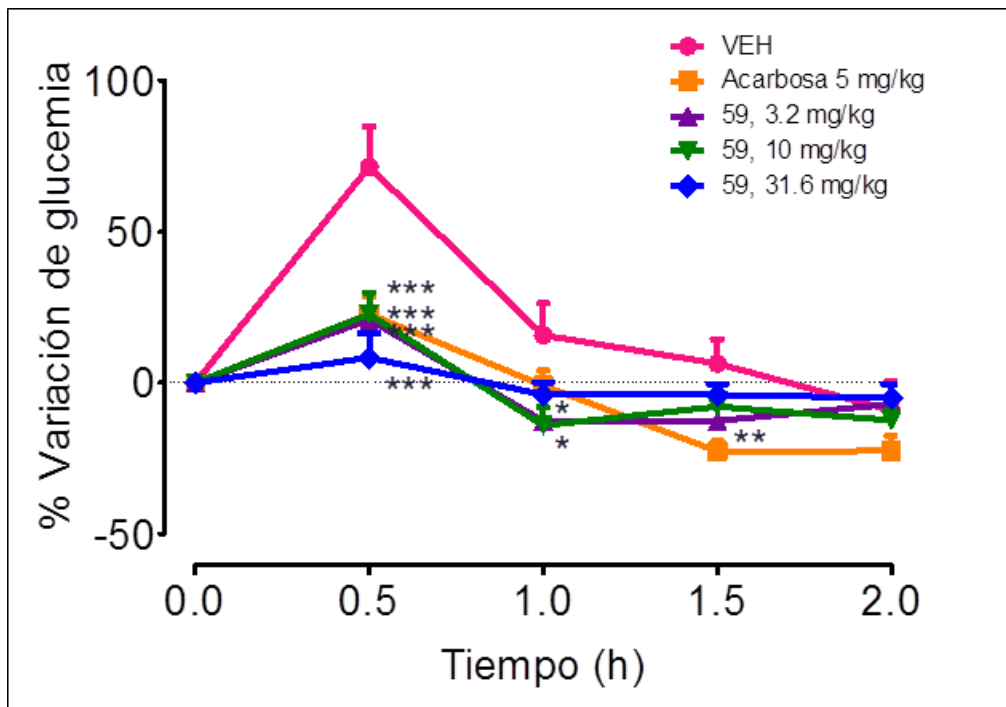


Figura 22. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Cabe mencionar que el efecto antihiperoglucémico no fue dosis dependiente, sin embargo, se puede notar que a todas las dosis el efecto está presente. Esta falta de relación dosis-respuesta podría deberse a la afinidad muy alta del compuesto por la enzima, ya que incluso a concentraciones muy pequeñas del compuesto, se observa el efecto máximo; Esta alta afinidad puede provocar que los receptores se saturen a concentraciones aún más bajas que la mínima trabajada, y aunque se aumente la concentración del compuesto, el efecto observado será el mismo. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis, es necesario realizar la cinética enzimática de este compuesto (Nelson & Cox, 2008).

Al realizar el experimento en ratones hipoglucémicos (**Figura 23**), se observó la misma tendencia mostrada en los ratones normoglucémicos, ya que todas las dosis evaluadas presentaron diferencia significativa en el pico posprandial y después de una hora de monitoreo. Cabe destacar que nuevamente, el efecto no fue dosis dependiente, no obstante, la dosis más baja (3.2 mg/kg) presentó significancia a todos los tiempos.

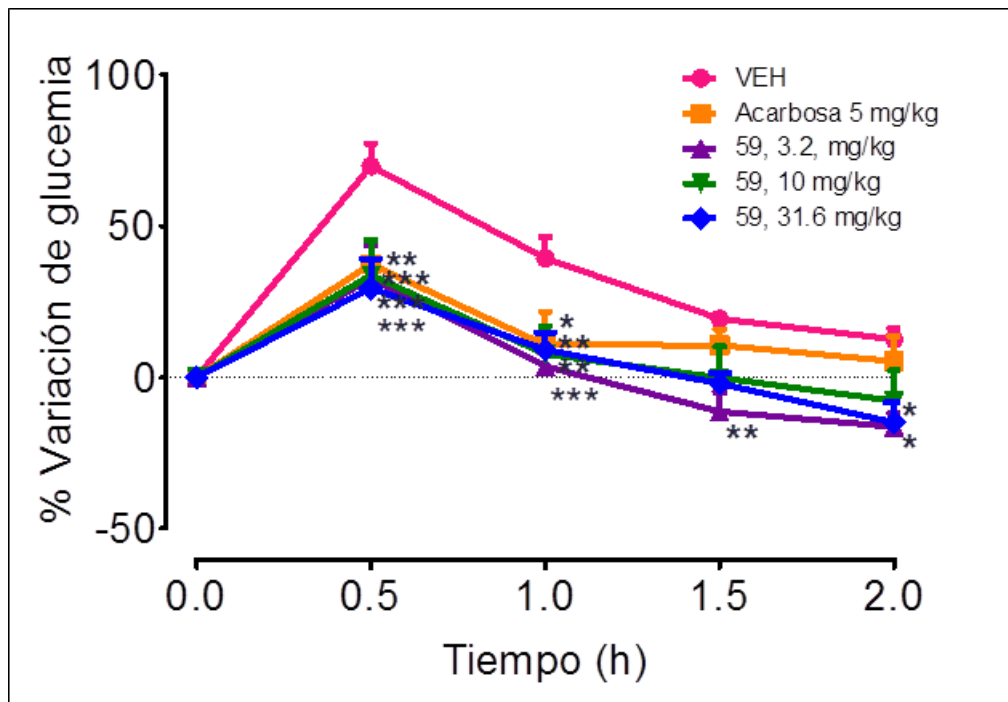


Figura 23. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones hiperglucémicos.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Con estos resultados se comprobó que el compuesto massarigenina C (**59**) inhibe las enzimas α -glucosidasas *in vivo* en un modelo estandarizado de tolerancia a la sacarosa.

6. Conclusiones

- ♣ Se comprobó el efecto inhibitorio del extracto orgánico de *Malbranchea flavorosea* sobre las enzimas α -glucosidasas de raspado intestinal de rata.
- ♣ Se logró el aislamiento y purificación de dos de los metabolitos activos de la especie fúngica mediante la aplicación de técnicas cromatográficas.
- ♣ La estructura molecular de compuestos se determinó como xylarinol A (**58**) y massarigenina C (**59**) a través de la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales; un análisis por difracción de rayos x permitió corroborar inequívocamente la estructura de la massarigenina C (**59**).
- ♣ El xylarinol A (**58**) y la massarigenina C (**59**) presentaron actividad inhibitoria en contra de las enzimas α -glucosidasas, tanto de raspado intestinal de rata como de levadura; los valores de CI_{50} se encuentran en el intervalo de 1 a 1.3 mM, respectivamente.
- ♣ La massarigenina C (**59**) presentó actividad antihiper glucémica en ratones normoglu cémicos e hiper glucémicos tras una prueba oral de tolerancia a la sacarosa.
- ♣ *Malbranchea flavorosea* constituye una fuente importante de nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. De manera adicional, esta investigación constituye el primer estudio químico de la especie y la primera ocasión en que se aíslan metabolitos de tipo benzoxepina y del tipo de la massarigenina C en el género *Malbranchea*.

7. Referencias

- Asano, N. (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, 13(10), 93-104.
- Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., Carvalho, I. (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62(44), 10277-10302.
- Clark, B., Capon, R. J., Lacey, E., Tennant, S., Gill, J. H., Bulheller, B., Bringmann, G. (2005). Gymnoascolides A-C: Aromatic Butenolides from an Australian Isolate of the Soil Ascomycete *Gymnoascus reessii*. *J Nat Prod*, 68, 1226-1230.
- Chan, H. H., Sun, H. D., Reddy, M. V., Wu, T. S. (2010). Potent alpha-glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1360-1364.
- Chen, Z., Hao, J., Wang, L., Wang, Y., Kong, F., Zhu, W. (2016). New alpha-glucosidase inhibitors from marine algae-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434. *Sci Rep*, 6, 20004.
- Chiung, Y. M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., Chen, G. Y., Chen, Z.C., Nakayama, M. (1993). A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *J Antibiot (Tokyo)*, 46(12), 1819-1826.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R. (2012). α -Glucosidase Inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *J Nat Prod*, 75(5), 968-974.
- Figuroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Rio-Portilla, F., González M del C., Mata, R. (2011). Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 26(3), 378-385.
- Finefield, J. M., Frisvad, J. C., Sherman, D. H., Williams, R. M. (2012). Fungal origins of the bicyclo[2.2.2]diazaoctane ring system of prenylated indole alkaloids. *J Nat Prod*, 75(4), 812-833.

- Fouotsa, H., Lannang, A. M., Mbazoa, C. D., Rasheed, S., Marasini, B. P., Ali, Z., Devkota, K. P., Kengfack A. E., Shaheen, F., Choudhary, M. I., Sewald, N. (2012). Xanthones inhibitors of α -glucosidase and glycation from *Garcinia nobilis*. *Phytochem Lett*, 5(2), 236-239.
- Fukami, A., Taniguchi, Y., Nakamura, T., Rho, M. C., Kawaguchi, K., Hayashi, M., Komiyama, K., Omura, S. (1999). New members of the macrosphelides from *Microsphaeropsis* sp. FO-5050 IV. *J Antibiot (Tokyo)*, 52(5), 501-504.
- Han, P., Zhou, P., Hu, S., Yang, S., Yan, Q., Jiang, Z. (2013). A novel multifunctional alpha-amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: biochemical characterization and three-dimensional structure. *Appl Biochem Biotechnol*, 170(2), 420-435.
- Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K. (2005). 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry*, 66(23), 2776-2779.
- IDF. (2015). *International Diabetes Federation Atlas* (7th ed.).
- IDF. (2016). Factores de Riesgo. Obtenido el 14 marzo de 2016, de <http://www.idf.org/node/26455>
- Ieyama, T., Gunawan-Puteri, M. D., Kawabata, J. (2011). alpha-Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chem*, 128(2), 308-311.
- INEGI. (2013). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Obtenido el 14 marzo de 2016, de <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- Israilli, Z. H. (2011). Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Ther*, 18, 117-152.
- Krasikov, V. V., Karellov, D. V., Firsov, L. M. (2001). α -Glucosidases. *Biochemistry*, 66(3), 267-281.

- Lee, I. K., Jang, Y. W., Kim, Y. S., Yu, S. H., Lee, K. J., Park, S. M., Oh, B. T., Chae, J. C., Yun, B. S. (2009). Xylarinols A and B, two new 2-benzoxepin derivatives from the fruiting bodies of *Xylaria polymorpha*. *J Antibiot (Tokyo)*, 62(3), 163-165.
- Liu, Q., Yang, Q. M., Hu, H. J., Yang, L., Yang, Y. B., Chou, G. X., Wang, Z. T. (2014). Bioactive diterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Scoparia dulcis*. *J Nat Prod*, 77(7), 1594-1600.
- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., Mata, R. (2015). Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide. *J Pharm Pharmacol*, 67(4), 551-558.
- Mahajan, C., Basotra, N., Singh, S., Di Falco, M., Tsang, A., Chadha, B. S. (2016). *Malbranchea cinnamomea*: A thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. *Bioresour Technol*, 200, 55-63.
- Martínez-Luis, S. (2007). *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmichael, una fuente novedosa de fitotoxinas antagonistas de la proteína calmodulina. (Tesis de Doctorado), UNAM, México, D.F.
- Martínez-Luis, S., González, M. C., Ulloa, M., Mata, R. (2005). Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry*, 66(9), 1012-1016.
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M. C., Lira-Rocha, A., Mata, R. (2006). Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron*, 62(8), 1817-1822.
- Moriyama, H., Hosoe, T., Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K., Iizuka, T., Hoshi, K., Fukushima, K., Chun Lau, F. (2009). Assay-guided Informatory Screening Method for Antiplatelet Effect of Adenosine Isolated from IFM 41300: Inhibitory Behaviors of Adenosine in Different Solvents. *Journal of Health Science*, 55(1), 103-108.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2008). *Lehninger, principles of biochemistry* (5th ed.) U.S.A.: W. H. Freeman and Company.

Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Oh, H., Swenson, D. C., Gloer, J. B., Shearer, C. A. (2001). Massarilactones A and B: novel secondary metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*. *Tetrahedron Letters*, 42, 975-977.

Oh, H., Swenson, D. C., Gloer, J. B., Shearer, C. A. (2003). New bioactive rosigenin analogues and aromatic polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*. *J Nat Prod*, 66, 73-79.

Okada, K., Takizawa, K., Maebayashi, Y., Nishimura, K., Miyaji, M., Fukushima, K. (1995). Ubiquinone system, GC contents and cellular fatty acid composition of species of the form-genus *Malbranchea* and *Coccidioides immitis* for chemotaxonomic study. *Mycoscience*, 36, 385-389.

OMS. (2016). Complicaciones de la diabetes. Obtenido el 16 de marzo de 2016, de http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index3.html

Rivera-Chávez, J., Figueroa, M., González M del C., Glenn, A. E., Mata, R. (2015). alpha-Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* Associated with *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod*, 78(4), 730-735.

Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., González M del C., Glenn, A. E., Mata, R. (2013). Thielavins A, J and K: alpha-Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, 94, 198-205.

Saito, M., Matsuura, I., Okazaki, H. (1979). Tf-26Vx, an antibiotic produced by a thermophilic fungus. *J Antibiot (Tokyo)*, 32(22), 1210-1212.

Schlegel, B., Hänel, F., Gollmick, F. A., Saluz, H. P., Gräfe, U. (2003a). New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast. *J Antibiot (Tokyo)*, 56(11), 917-922.

- Schlegel, B., Härtl, A., Gollmick, F. A., Gräfe, U. (2003b). 7-methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286. *J Antibiot (Tokyo)*, 56(9), 792-794.
- Thulé, P. M. (2012). Mechanisms of current therapies for diabetes mellitus type 2. *Advances in Physiology Education*, 36, 275-283.
- Tong, X., Busk, P. K., Lange, L. (2015). Characterization of a new sn-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Malbranchea cinnamomea*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1-8.
- Wakana, D., Hosoe, T., Fukushima, K., Itabashi, T., Kawai, K. (2008a). Two new furanone glycosides, malfilamentosides A and B, from *Malbranchea filamentosa*. *Mycotoxins*, 58(1), 1-6.
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Okada, K., Fukushima, K., Kawai, K. (2008b). Structures of New Triterpene Glycosides, Malbrancheosides A - D, from *Malbranchea filamentosa*. *Heterocycles*, 75(5), 1109-1122.
- Wakana, D., Hosoe, T., Wachi, H., Itabashi, T., Fukushima, K., Yaguchi, T., Kawai, K. (2009). The cytotoxic and antifungal activities of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*. *J Antibiot (Tokyo)*, 62(4), 217-219.
- Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K., Yaguchi, T., Fukushima, K., Goda, Y., Hosoe, T. (2014). Cytotoxic anthrasteroid glycosides, malsterosides A-C, from *Malbranchea filamentosa*. *J Antibiot (Tokyo)*, 67(8), 585-588.
- Wang, K., Bao, L., Qi, Q., Zhao, F., Ma, K., Pei, Y., Liu, H. (2015). Erinacerins C-L, isoindolin-1-ones with alpha-glucosidase inhibitory activity from cultures of the medicinal mushroom *Hericium erinaceus*. *J Nat Prod*, 78(1), 146-154.
- Wang, S. M., Han, J. J., Ma, K., Jin, T., Bao, L., Pei, Y. F., Liu, H. W. (2014). New alpha-glucosidase inhibitors with p-terphenyl skeleton from the mushroom *Hydnellum conrescens*. *Fitoterapia*, 98, 149-155.
- Watts, K. R., Loveridge, S. T., Tenney, K., Media, J., Valeriote, F. A., Crews, P. (2011). Utilizing DART mass spectrometry to pinpoint halogenated metabolites from a marine invertebrate-derived fungus. *J Org Chem*, 76(15), 6201-6208.

- Yang, S., Xiong, H., Yan, Q., Yang, H., Jiang, Z. (2014). Purification and characterization of a novel alkaline beta-1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(10), 1487-1495.
- Yang, Y. L., Liao, W. Y., Liu, W. Y., Liaw, C. C., Shen, C. N., Huang, Z. Y., Wu, S. H. (2009). Discovery of new natural products by intact-cell mass spectrometry and LC-SPE-NMR: malbranpyrroles, novel polyketides from thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea*. *Chemistry*, 15(43), 11573-11580.
- Zhang, L.H., Feng, B.M., Sun, Y., Wu, H.H., Li, S.G., Liu, B., Liu, F., Zhang, W.Y., Chen, G., Bai, J., Hua, H.M., Wang, H.F., Pei, Y.H. (2016). Flaviphenalenones A–C, three new phenalenone derivatives from the fungus *Aspergillus flavipes* PJ03-11. *Tetrahedron Letters*, 57(6), 645-649.

8. Apéndice

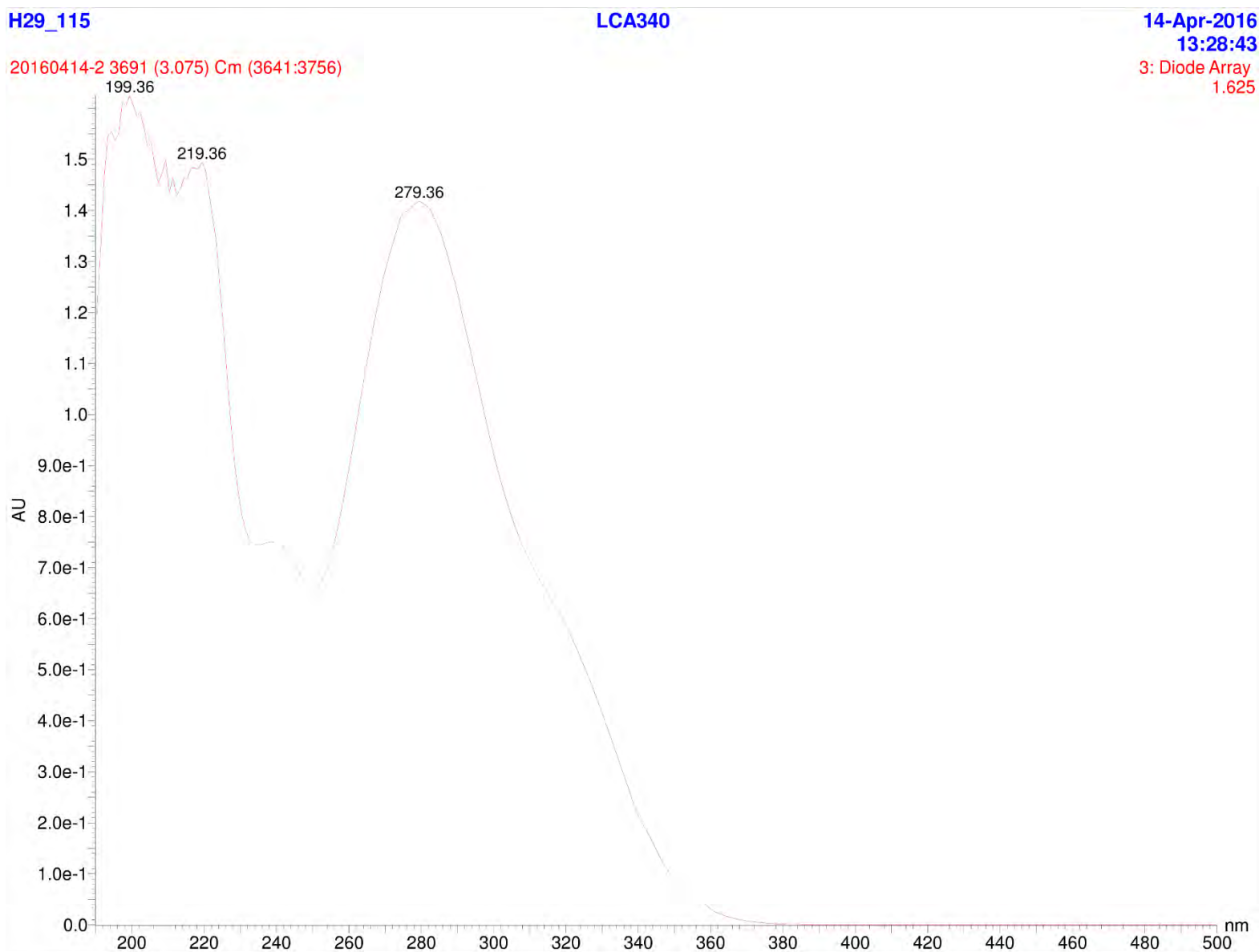


Figura A1. Espectro en el UV del xylarinol A (58).

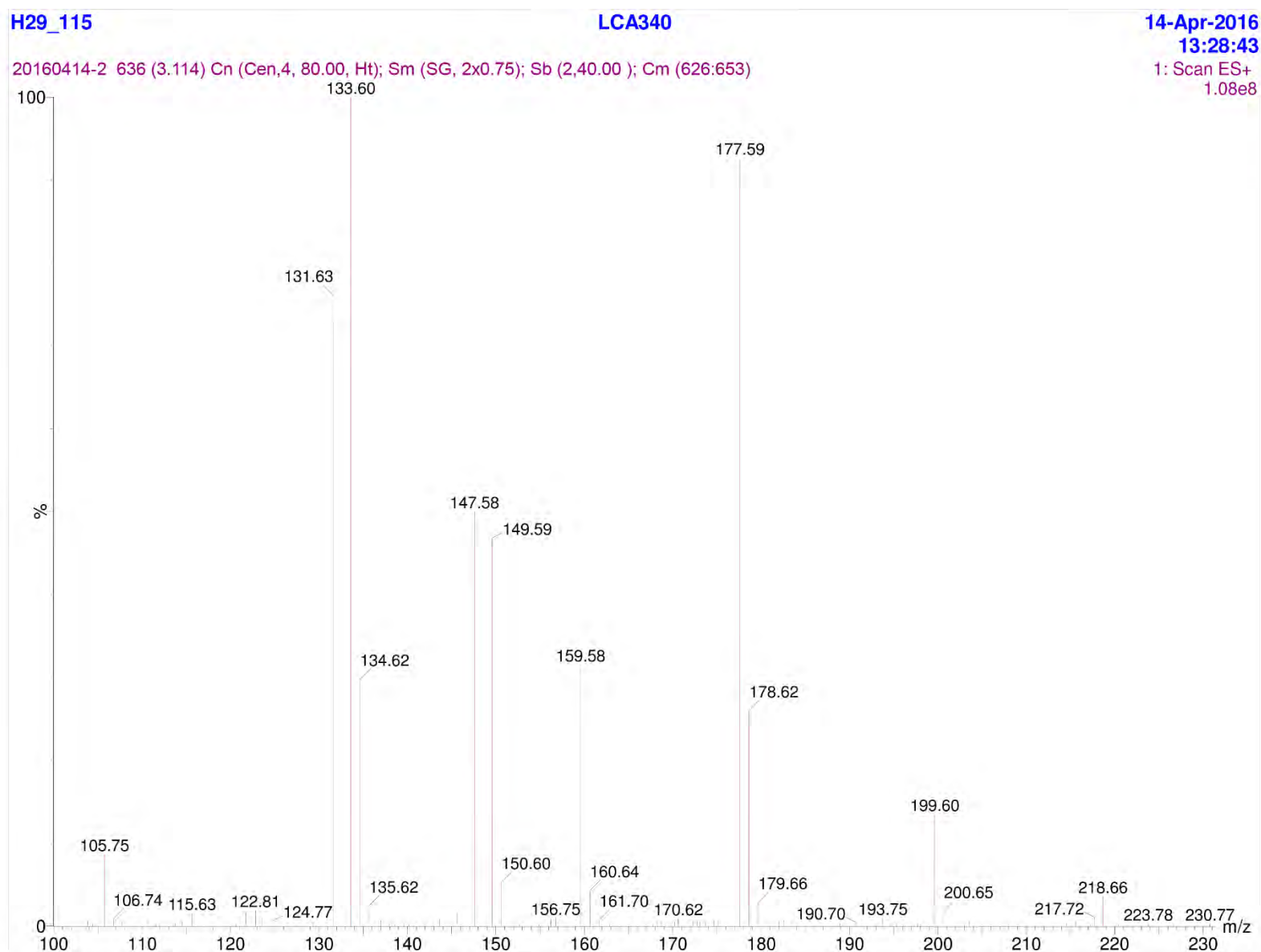


Figura A2. Espectro de masas por la técnica de electrospray en modalidad positiva (ESI⁺) del xylarinol A (58).

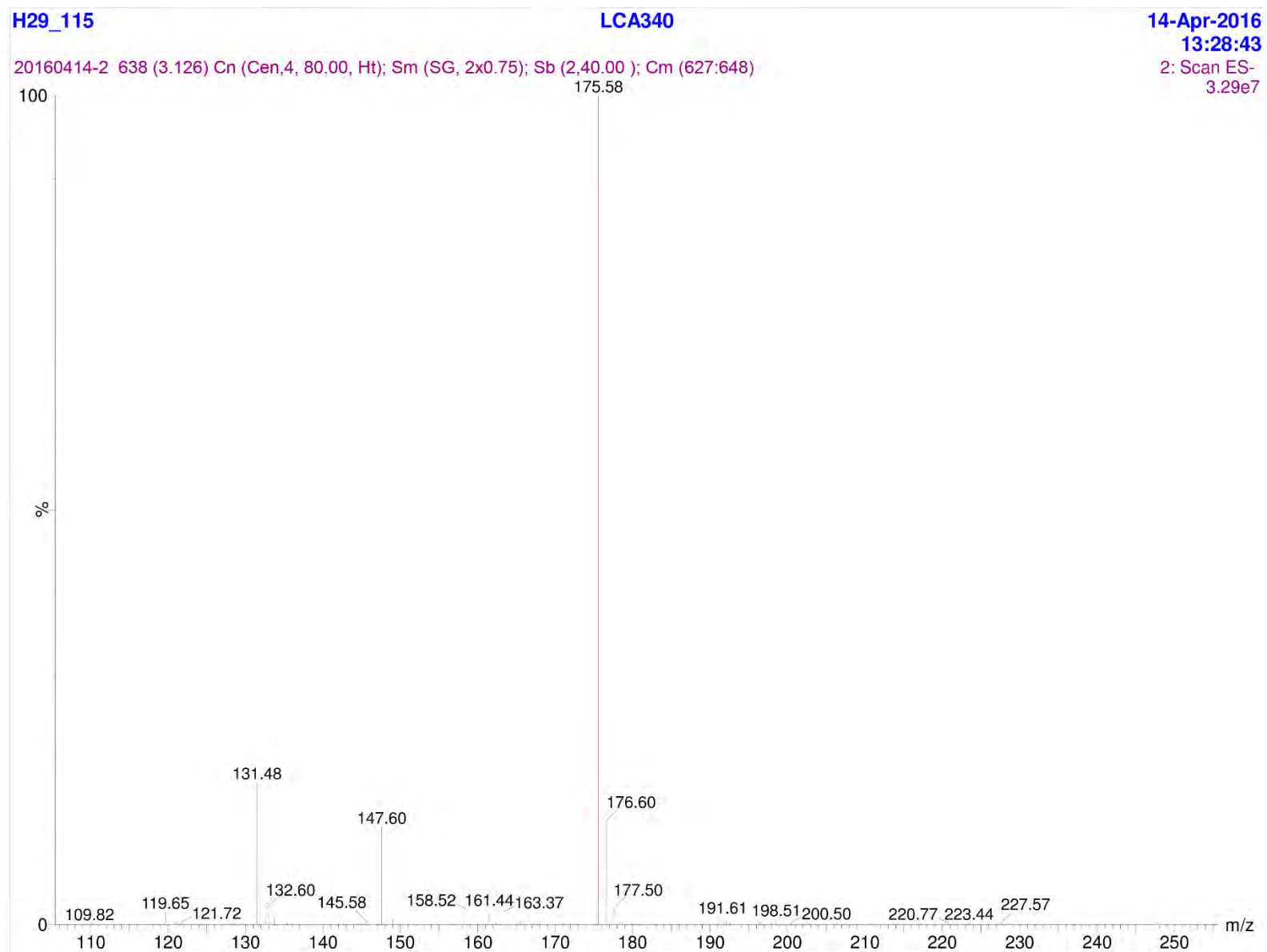
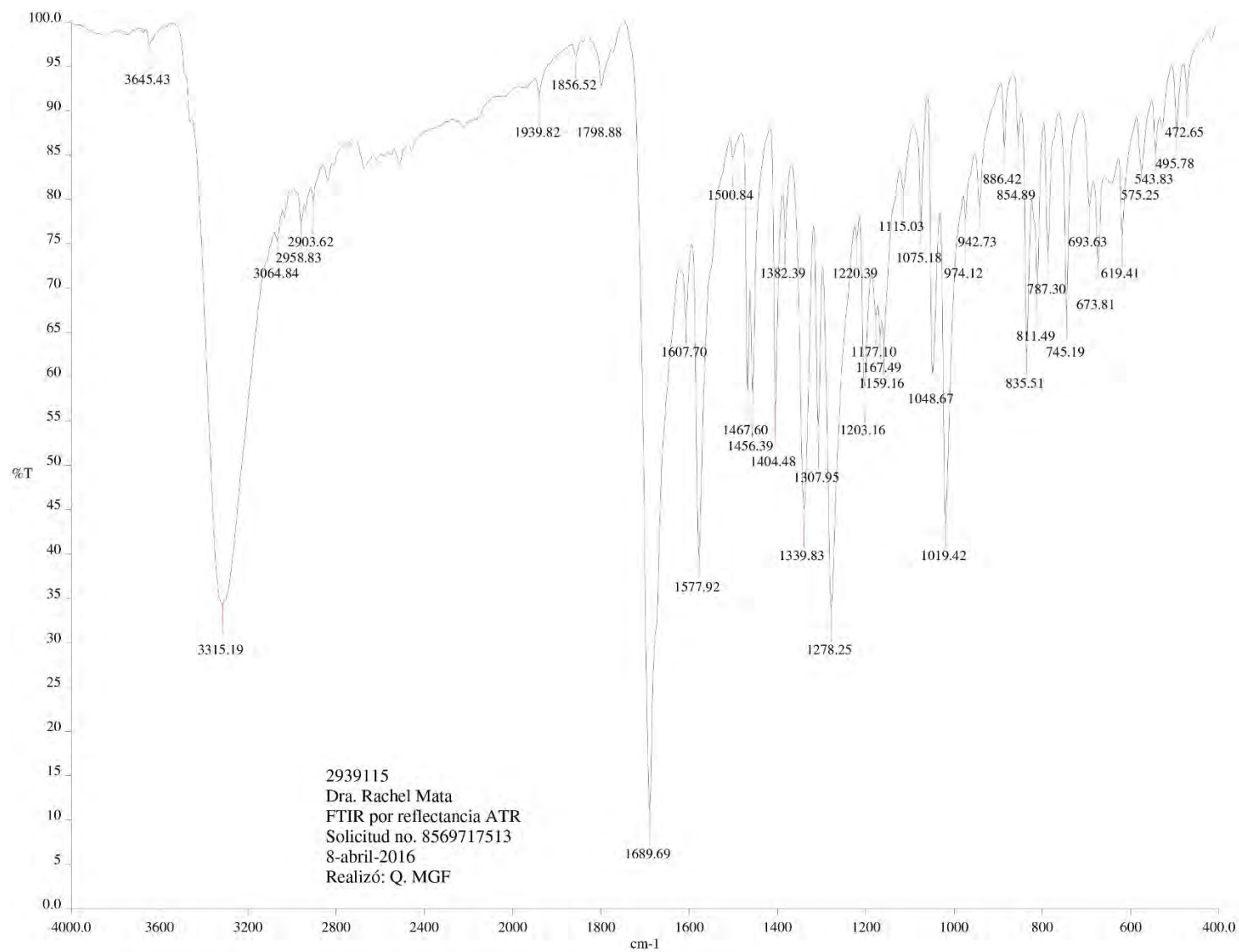


Figura A3. Espectro de masas por la técnica de electrospray en modalidad negativa (ESI⁻) del xylarinol A (58).



c:\documents and settings\peservice\my documents\zip ir-uv\farmacia\dra. rachel mata\2939115.asc

Figura A4. Espectro en el IR del xylarinol A (58).



Figura A5. Espectro en el UV de la massarigenina C (59).

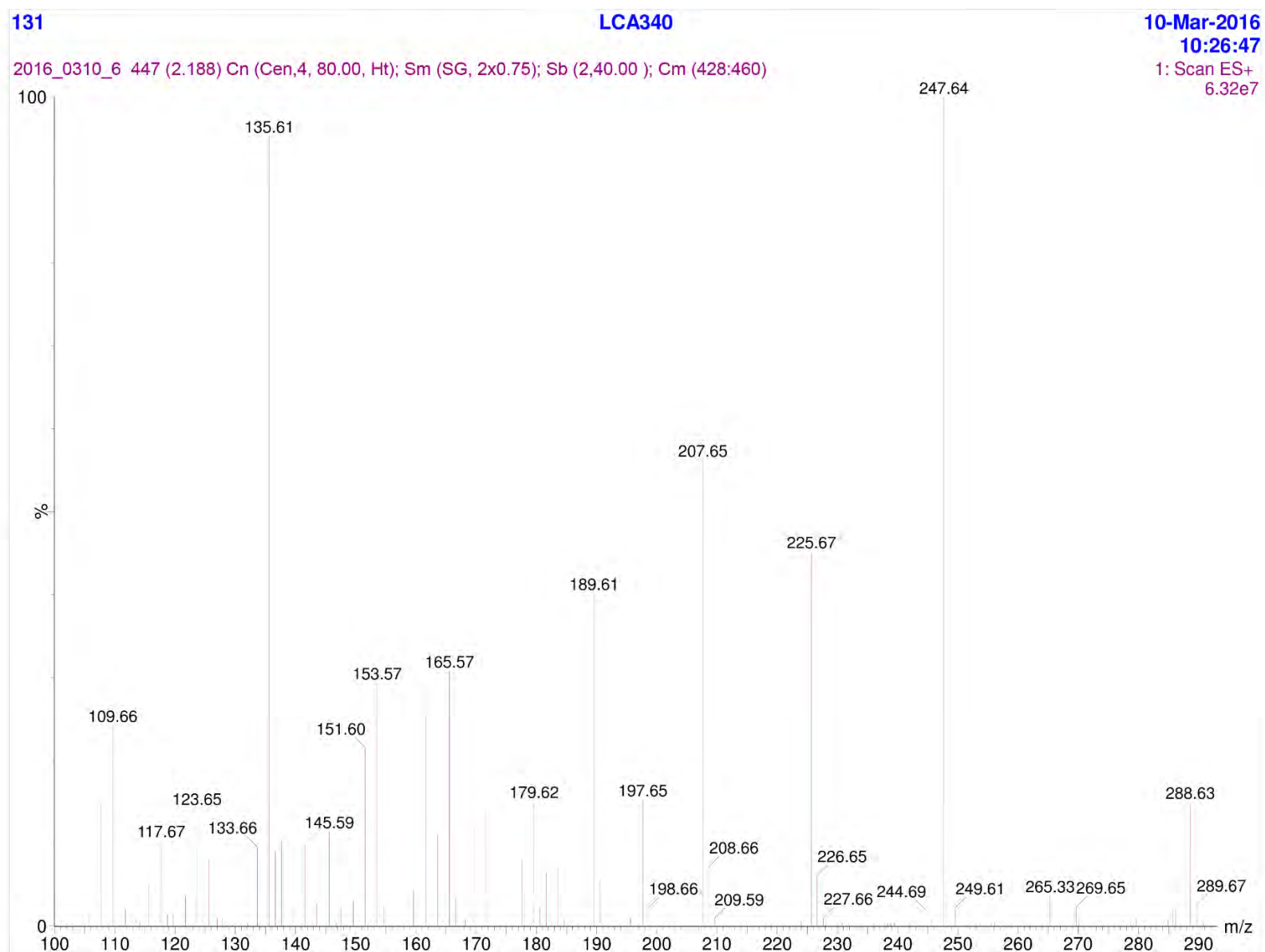


Figura A6. Espectro de masas por la técnica de electrospray en modalidad positiva (ESI⁺) de la massarigenina C (59).

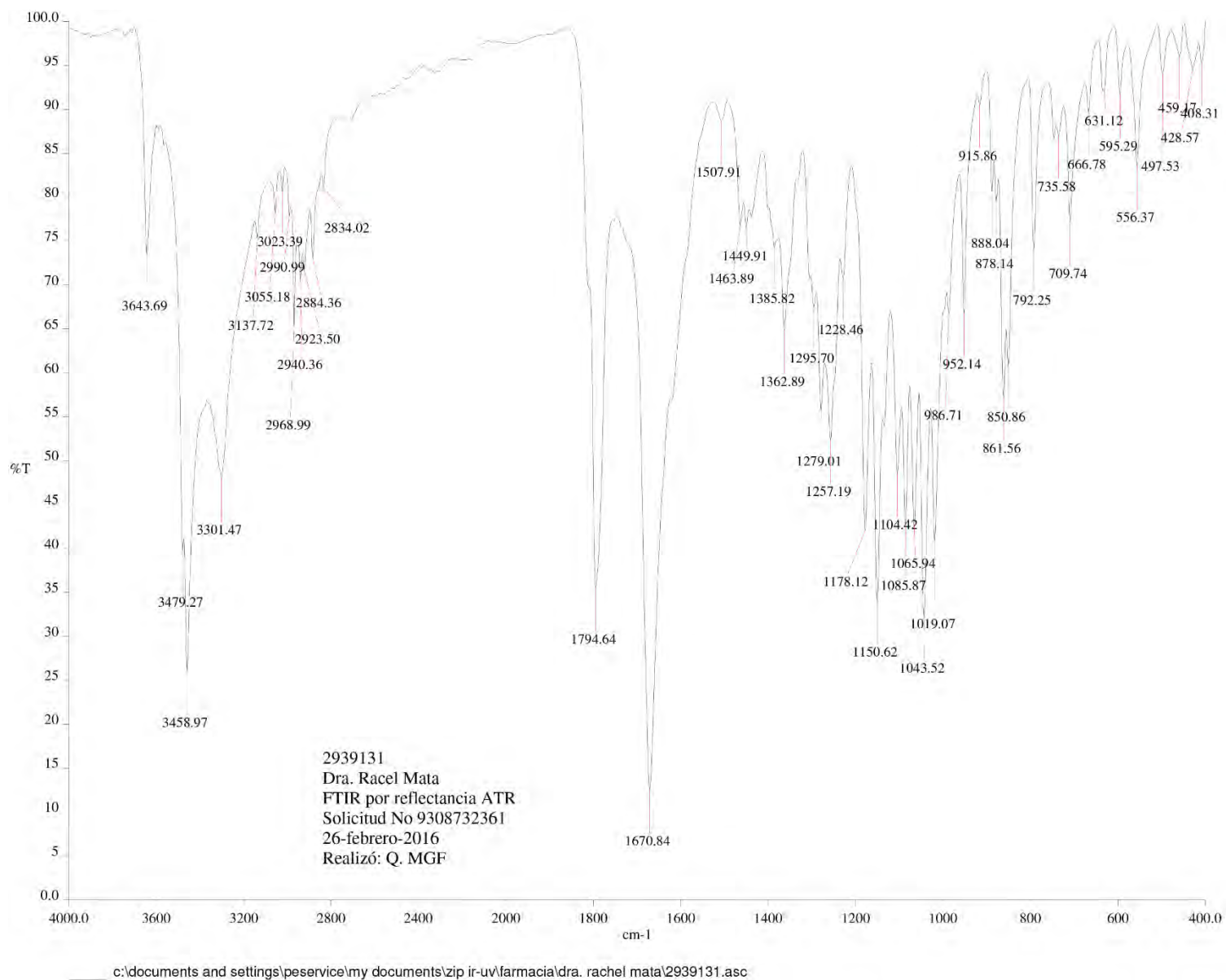


Figura A7. Espectro en el IR de la massarigenina C (59).

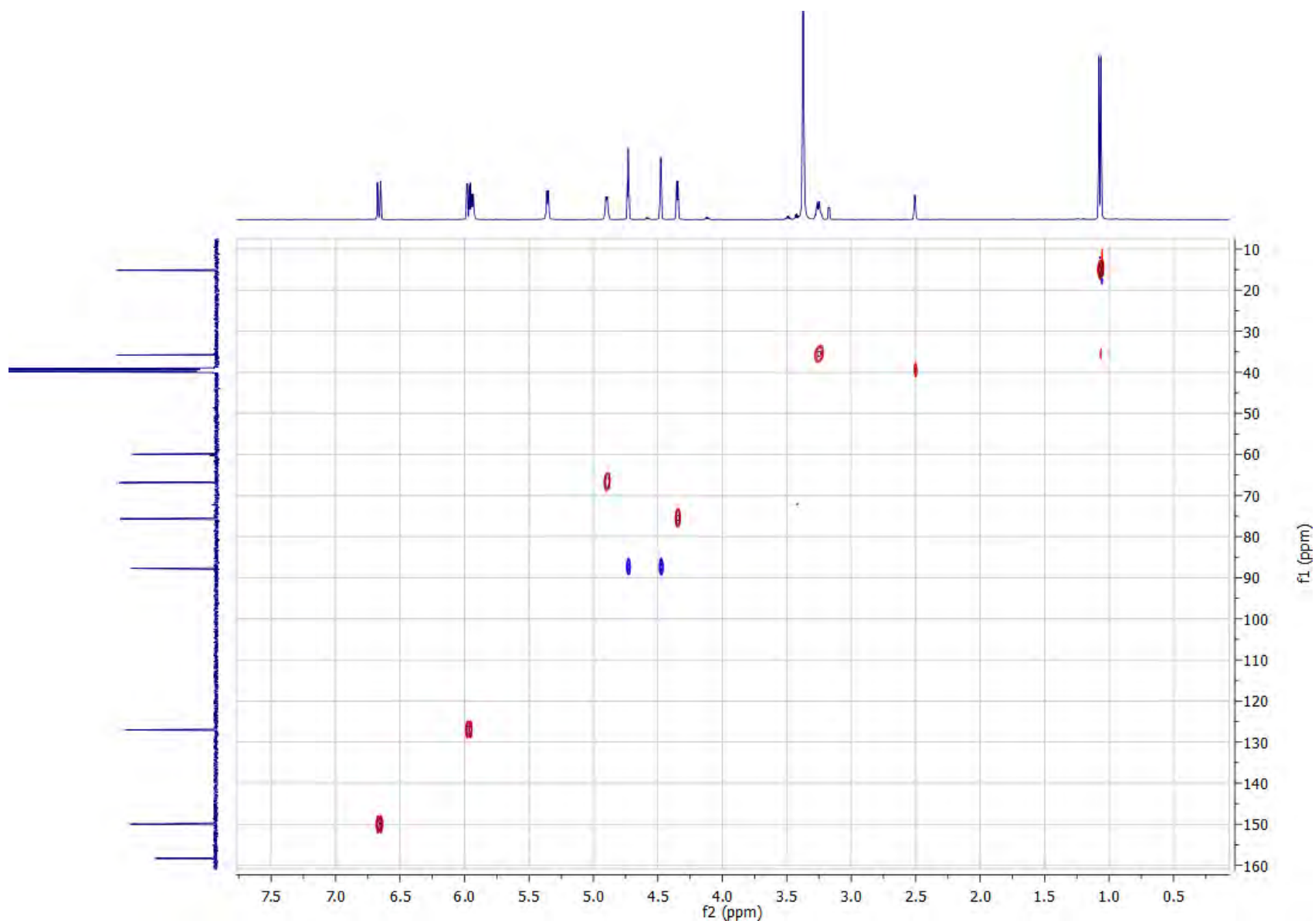


Figura A8. Espectro bidimensional HSQC de la massarigenina C (59).

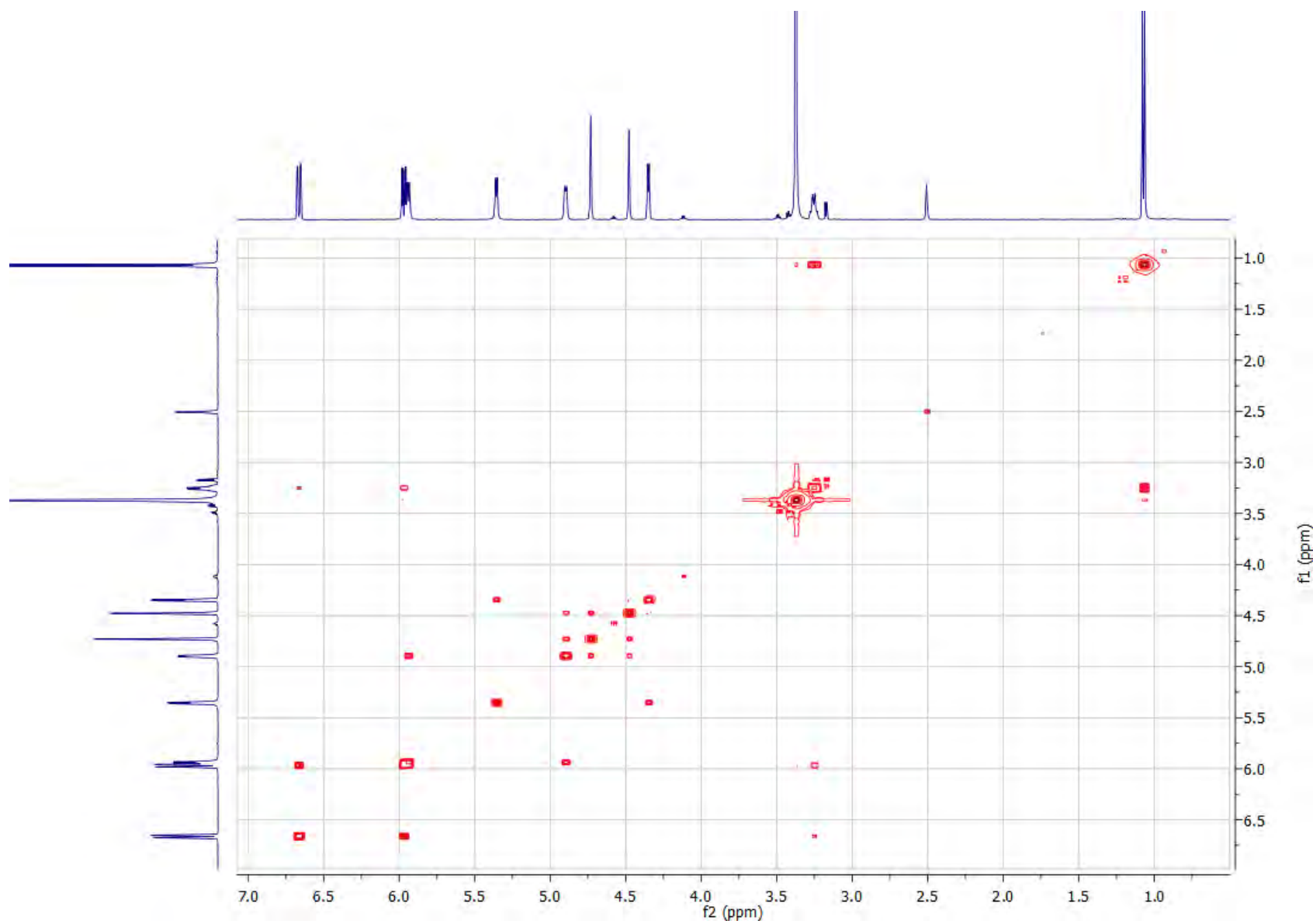


Figura A9. Espectro bidimensional COSY de la massarigenina C (**59**).

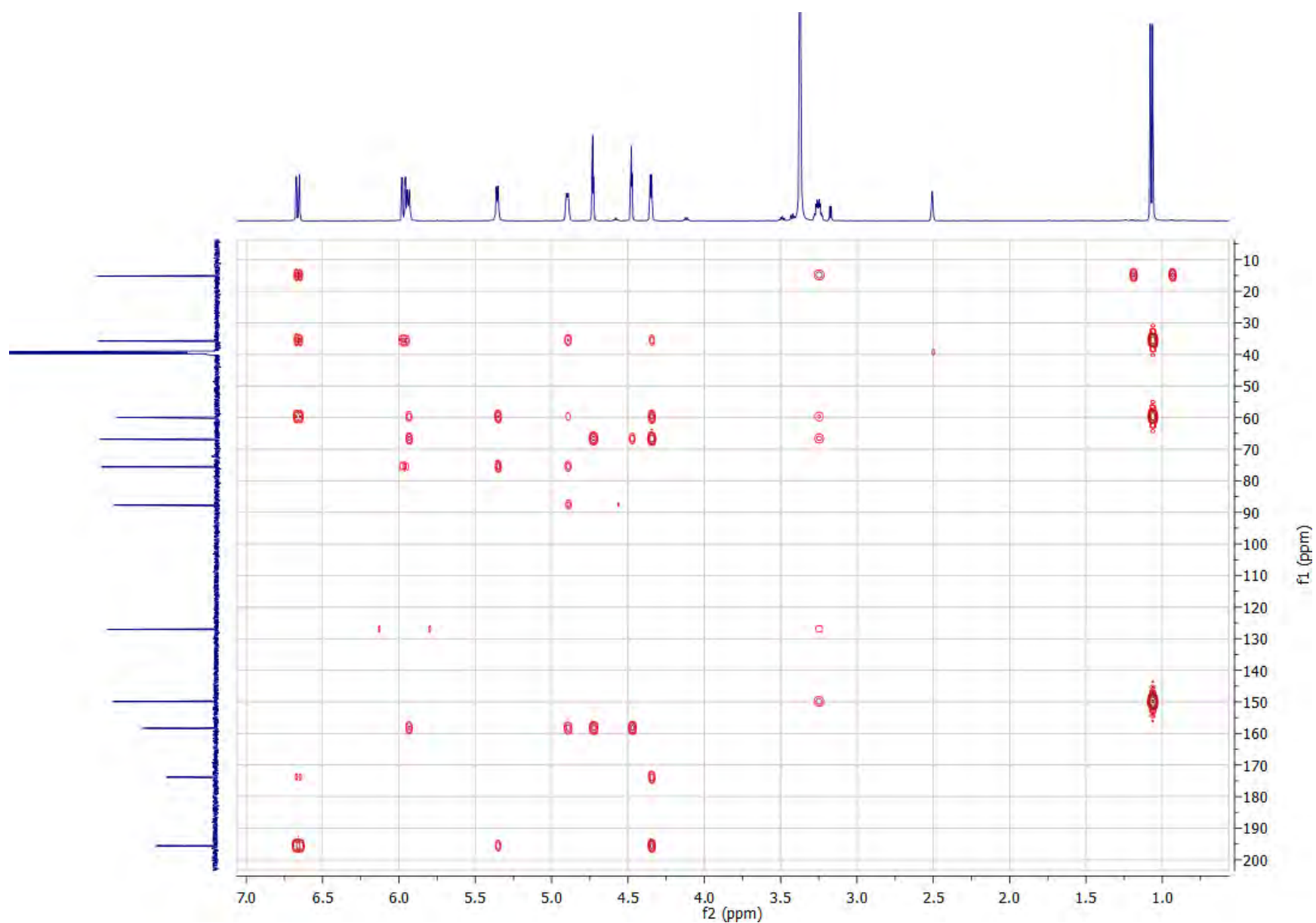


Figura A10. Espectro bidimensional HMBC de la massarigenina C (**59**).

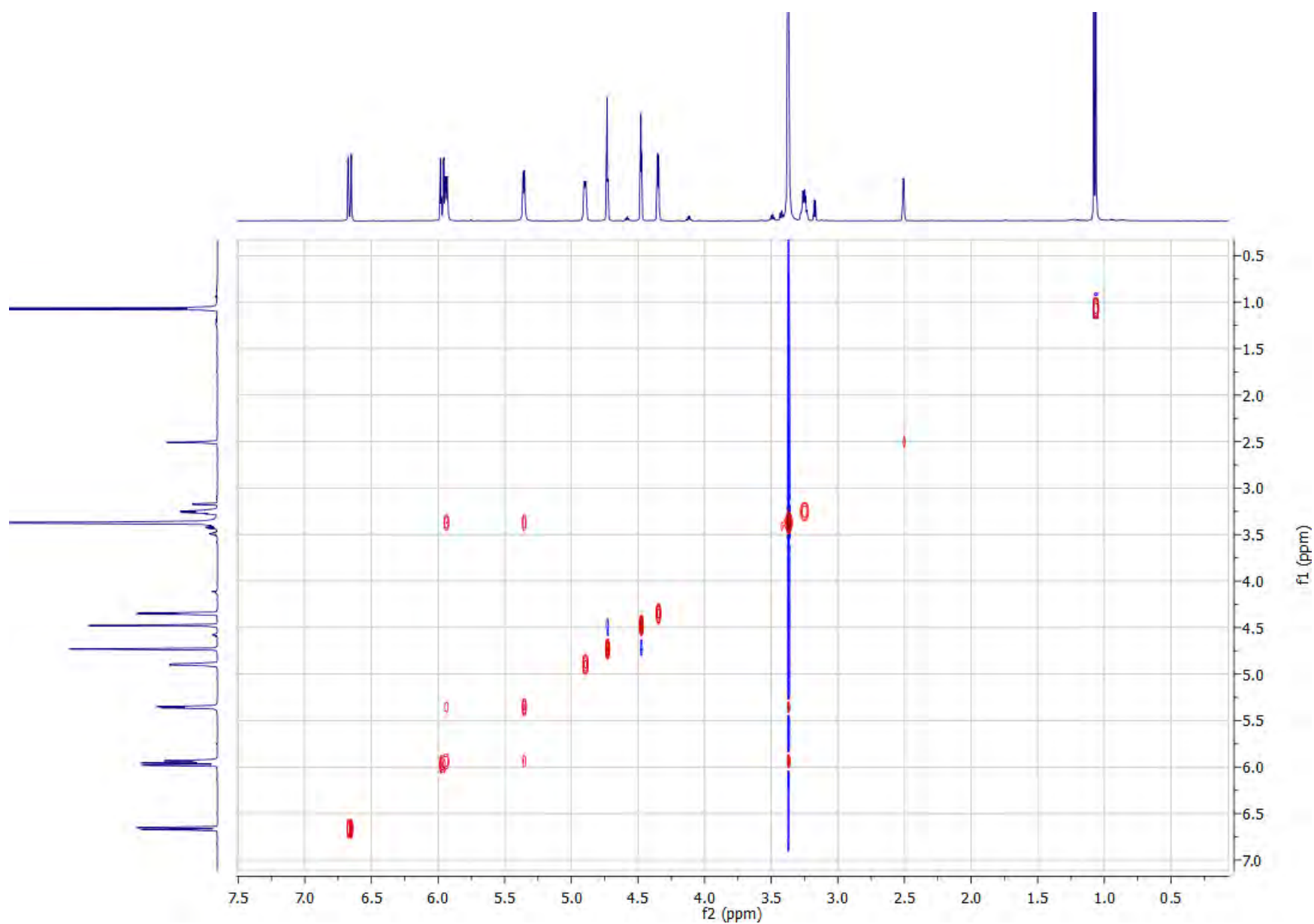


Figura A11. Espectro bidimensional NOESY de la massarigenina C (**59**).

Identification code	077XYZ16	
Empirical formula	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₁	
Formula weight	466.43	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C2	
Unit cell dimensions	a = 20.881(3) Å	α = 90°.
	b = 7.2139(11) Å	β = 95.201(4)°.
	c = 7.1436(11) Å	γ = 90°.
Volume	1071.7(3) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.445 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.996 mm ⁻¹	
F(000)	492	
Crystal size	0.403 x 0.256 x 0.188 mm ³	
Theta range for data collection	4.252 to 68.255°.	
Index ranges	-23 ≤ h ≤ 24, -8 ≤ k ≤ 8, -8 ≤ l ≤ 7	
Reflections collected	6426	
Independent reflections	1971 [R(int) = 0.1126]	
Completeness to theta = 67.679°	99.8 %	
Absorption correction	Integration	
Max. and min. transmission	0.8612 and 0.7801	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1971 / 5 / 160	
Goodness-of-fit on F ²	1.080	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0501, wR2 = 0.1291	
R indices (all data)	R1 = 0.0503, wR2 = 0.1293	
Absolute structure parameter	0.2(3)	
Largest diff. peak and hole	0.267 and -0.327 e.Å ⁻³	

Figura A12. Parámetros obtenidos de la difracción de rayos X del cristal de la massarigenina C (**59**).

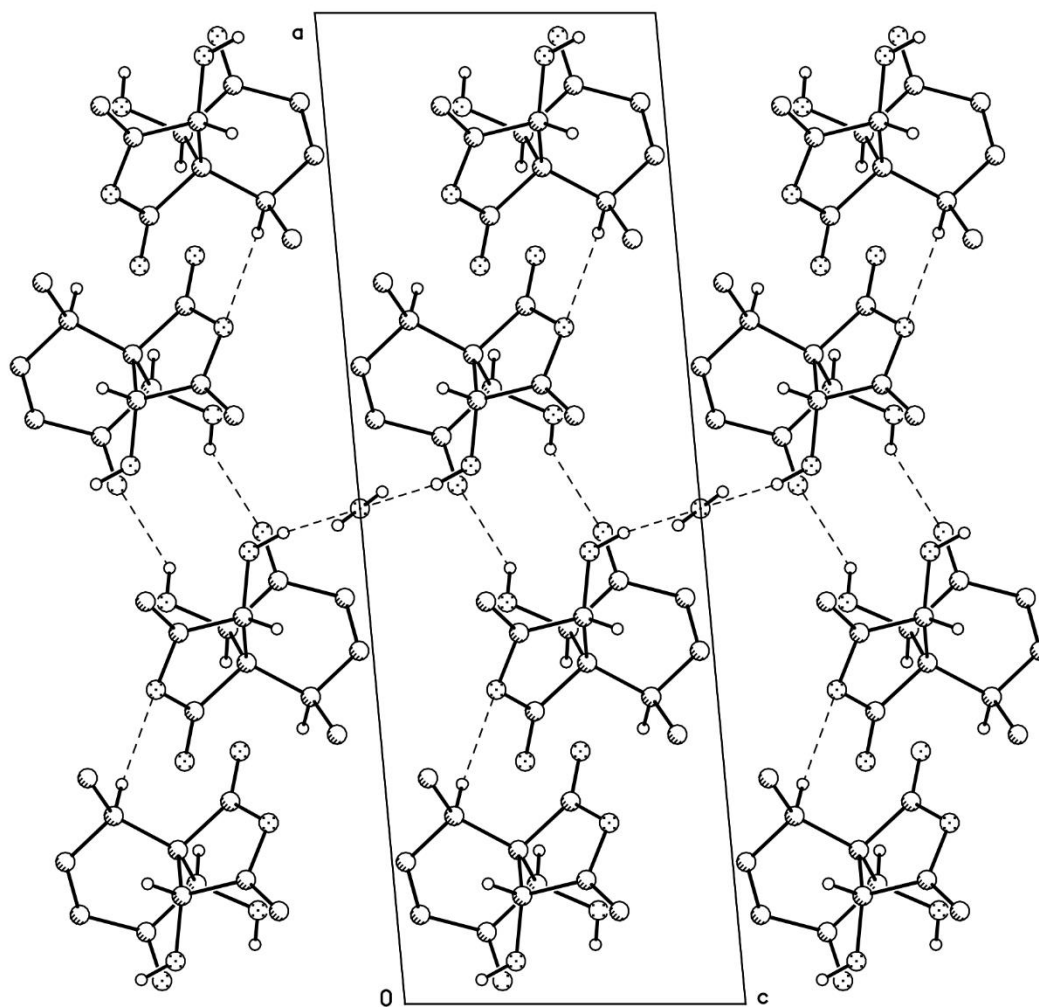


Figura A13. Celda unitaria del cristal de massarigenina C (**59**).