



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

"Policétidos y benzodiazepindionas de la especie fúngica
Malbranchea flavorosea Sigler et Carmichael"

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Daniela Rebollar Ramos

Dra. Rachel Mata Essayag
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, junio 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

PRESIDENTE Dr. Leovigildo Quijano

VOCAL Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

VOCAL Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

VOCAL Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

SECRETARIO Dr. José Alberto Rivera Chávez

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio 124, Edificio E, Departamento de Farmacia.

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Q.F.B. Daniela Rebollar Ramos
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

CONGRESOS

52° Congreso Mexicano de Química y 36° Congreso Nacional de Educación Química.
Cartel "Inhibidores de las alfa glucosidasas de *Malbranchea flavorosea*". Septiembre de
2017, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo brindado para continuar con mis estudios de posgrado, con la finalidad de tener una mejor preparación académica y profesional.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. de becario 604019) y por el financiamiento otorgado a través del proyecto CONACyT-219765.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus valiosas enseñanzas y por depositar en mí la confianza para desarrollar este trabajo, por ser un gran ejemplo a seguir como académica y como persona. Muchas gracias.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez por el apoyo técnico proporcionado para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Laura C. Flores Bocanegra por su valiosa enseñanza para la realización de los ensayos enzimáticos, por su paciencia para resolver mis dudas y por brindarme su amistad.

A la Dra. Martha L. Macías Ruvalcaba por el apoyo brindado a lo largo del presente trabajo.

Al Dr. José A. Rivera Chávez por el registro de los espectros de dicroísmo circular, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de algunos de los compuestos aislados.

Al Dr. Martín González Andrade por proporcionar la enzima de *R. obeum*, la cual brindó valiosa información en los estudios de actividad biológica, así como por su apoyo en la realización de los experimentos de acoplamiento y dinámica molecular.

A los miembros del jurado por sus observaciones y comentarios, los cuales permitieron enriquecer este trabajo.

A mis amigos del laboratorio 124, por todas las enseñanzas brindadas y por hacer del trabajo diario en el laboratorio una de las mejores experiencias de mi vida, porque es difícil encontrar personas tan extraordinarias como ustedes.

DEDICATORIAS

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Lista de Figuras | IV |
| Lista de Tablas | V |
| Lista de Esquemas | VI |
| Lista de Abreviaturas | VI |
| | |
| Resumen | 1 |
| Abstract | 3 |
| | |
| 1 Antecedentes | 4 |
| 1.1 Diabetes..... | 4 |
| 1.2 Panorama mundial y nacional de la diabetes..... | 5 |
| 1.3 Tratamiento de la diabetes..... | 6 |
| 1.4 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas..... | 10 |
| 1.4.1 Generalidades de las enzimas α -glucosidasas..... | 10 |
| 1.4.2 Inhibidores de las α -glucosidasas | 12 |
| 1.4.3 Productos naturales como fuente de inhibidores de α -glucosidasas | 14 |
| 1.5 Antecedentes del género <i>Malbranchea</i> | 16 |
| 1.6 Antecedentes de la especie <i>Malbranchea flavorosea</i> | 24 |
| | |
| 2 Justificación | 26 |
| | |
| 3 Hipótesis | 26 |
| | |
| 4 Objetivos | 27 |
| 4.1 Objetivo general..... | 27 |
| 4.2 Objetivos particulares..... | 27 |
| | |
| 5 Parte Experimental | 28 |
| 5.1 Material fúngico..... | 28 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 5.2 | Procedimientos cromatográficos generales | 28 |
| 5.3 | Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas | 29 |
| 5.4 | Estudio químico de la especie fúngica <i>Malbranchea flavorosea</i> | 29 |
| 5.4.1 | Fermentación de <i>M. flavorosea</i> a mediana escala | 29 |
| 5.4.2 | Preparación de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo de <i>M. flavorosea</i> | 29 |
| 5.4.3 | Fraccionamiento del extracto orgánico de <i>M. flavorosea</i> | 30 |
| 5.4.3.1 | Fraccionamiento terciario de la fracción L..... | 30 |
| 5.4.3.1.1 | Fraccionamiento cuaternario de la fracción L3 | 31 |
| 5.4.3.1.1.1 | Fraccionamiento de la fracción L3d | 31 |
| 5.4.3.1.2 | Fraccionamiento cuaternario de la fracción L5..... | 31 |
| 5.4.3.2 | Fraccionamiento de la fracción MN | 31 |
| 5.5 | Determinación del efecto de los compuestos asilados como inhibidores de las α -glucosidasas..... | 32 |
| 5.5.1 | Obtención de la enzima recombinante de <i>Ruminococcus obeum</i> | 32 |
| 5.5.2 | Evaluación enzimática de los compuestos como inhibidores de las α -glucosidasas | 32 |
| 5.6 | Síntesis del compuesto 76 | 33 |
| 5.7 | Estudios de acoplamiento y dinámica molecular | 34 |
| 6 | Resultados y Discusión | 36 |
| 6.1 | Aislamiento y caracterización de los metabolitos 68-73 | 36 |
| 6.2 | Flavorroseósido B (71)..... | 37 |
| 6.3 | 4-hidroxi-2-O- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (73)..... | 39 |
| 6.4 | (S)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (72) | 41 |
| 6.5 | Rosigenina (68)..... | 47 |
| 6.6 | Ribo-xylarinol B (69)..... | 48 |
| 6.7 | Masarilactona B (70)..... | 49 |
| 6.8 | Evaluación biológica | 51 |
| 6.9 | Estudios de acoplamiento y dinámica molecular | 52 |
| 7 | Conclusiones | 56 |

| | | |
|----------|---|----|
| 8 | Perspectivas | 56 |
| 9 | Referencias | 57 |
| | Apéndice I: Taxonomía del hongo <i>M. flavorosea</i> | 64 |
| | Apéndice II | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Panorama actual de la diabetes y proyección para el 2045 (IDF, 2017)..... | 6 |
| Figura 2. Sitio de acción de los fármacos más usados para el tratamiento de DT2..... | 7 |
| Figura 3. Hidrólisis enzimática mediada por las enzimas glucósido hidrolasas, i) conservando la configuración anomérica, ii) invirtiendo la configuración anomérica. | 10 |
| Figura 4. Ubicación de las enzimas α -glucosidasas en el intestino delgado. | 12 |
| Figura 5. Inhibidores de α -glucosidasas empleados en la terapéutica. | 13 |
| Figura 6. Fármacos aprobados de 1981 a 2014 (Newman & Cragg, 2016)..... | 14 |
| Figura 7. Antrasteroides aislados de <i>M. filamentosa</i> | 17 |
| Figura 8. Triterpenoides de <i>Malbranchea</i> | 18 |
| Figura 9. Sesquiterpenoides del género <i>Malbranchea</i> | 19 |
| Figura 10. Metabolitos C ₆ C ₃ -C ₆ C ₂ de <i>M. filamentosa</i> | 19 |
| Figura 11. Configuración <i>syn</i> y <i>anti</i> del biciclo diazaoctano. | 20 |
| Figura 12. Biogénesis propuesta para la malbranqueamida. | 20 |
| Figura 13. Metabolitos con el núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano. | 21 |
| Figura 14. Otros alcaloides del género <i>Malbranchea</i> | 21 |
| Figura 15. Policétidos prenilados del género <i>Malbranchea</i> | 22 |
| Figura 16. Policétido de <i>M. sulfurea</i> | 22 |
| Figura 17. Metabolitos tipo quinonas del género <i>Malbranchea</i> | 23 |
| Figura 18. Metabolitos varios del género <i>Malbranchea</i> | 23 |
| Figura 19. Metabolitos previamente aislados de <i>M. flavorosea</i> | 25 |
| Figura 20. <i>Malbranchea flavorosea</i> . A) Micelio, B) Vista microscópica, 40x, técnica de impronta, tinción con azul de metileno..... | 28 |
| Figura 21. Metabolitos aislados de <i>M. flavorosea</i> en el presente estudio..... | 37 |
| Figura 22. Flavorroseósido (67) y flavorroseósido B (71). | 38 |
| Figura 23. Correlaciones clave para la elucidación estructural del compuesto 71 | 39 |
| Figura 24. Dicroísmo circular comparativo del flavorroseósido B (71) y el flavorroseósido (67).. | 39 |
| Figura 25. Correlaciones clave para la asignación estructural del compuesto 73 | 41 |
| Figura 26. Confórmeros del compuesto 72 | 42 |
| Figura 27. Ciclopeptinas. | 42 |
| Figura 28. Benzodiazepindionas relacionadas a 72 | 44 |
| Figura 29. Diazepam y su análogo modificado. | 44 |
| Figura 30. (<i>R</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-1-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (76). | 45 |
| Figura 31. Rotación óptica específica de algunas benzodiazepindionas..... | 47 |
| Figura 32. Correlaciones selectas de HMBC para el compuesto 68 | 47 |
| Figura 33. Sordariol y sus derivados isobenzofuranos. | 49 |
| Figura 34. Correlaciones HMBC y COSY para el compuesto 70 | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 35. Comparación estructural de las enzimas α -glucosidasas de <i>R. obeum</i> (azul) y la maltasa glucoamilasa de humano (rojo). (A) Alineación 3D de las enzimas. (B) Aminoácidos conservados de ambos sitios catalíticos. | 51 |
| Figura 36. Curvas C-R de los metabolitos 72 y 76 frente a la enzima α -glucosidasa de <i>R. obeum</i> | 52 |
| Figura 37. (A) Modelo estructural de los complejos formados entre la α -glucosidasa de <i>R. obeum</i> con acarbosa (naranja), 72 (verde) y 76 (rosa). Representación 3D de los sitios de unión entre (B) acarbosa, (C) 72 , y (D) 76 con la enzima de <i>R. obeum</i> | 53 |
| Figura 38. Aminoácidos involucrados en la unión de (A) acarbosa, (B) 72 y (C) 76 con la enzima α -glucosidasa de <i>R. obeum</i> | 54 |
| Figura 39. RMSD en función del tiempo para una simulación de DM de 20 ns. | 55 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Fármacos más utilizados en el tratamiento de DT2. | 9 |
| Tabla 2. Ejemplos selectos de inhibidores de α -glucosidasas de origen natural. | 15 |
| Tabla 3. Actividad frente α -glucosidasas de metabolitos de <i>M. flavorosea</i> | 25 |
| Tabla 4. Reunión de las fracciones secundarias del fraccionamiento del extracto desgrasado. | 30 |
| Tabla 5. Identificación de metabolitos previamente aislados en las fracciones secundarias. | 36 |
| Tabla 6. Constantes espectroscópicas del compuesto 71 | 37 |
| Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para el flavorroseósido B (71) en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz). | 38 |
| Tabla 8. Constantes espectroscópicas del compuesto 73 | 40 |
| Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para 4-hidroxi-2- <i>O</i> - α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (73) en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz). | 40 |
| Tabla 10. Constantes espectroscópicas del compuesto 72 | 41 |
| Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para el (<i>S</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-4-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (72) y la 7-metoxiciclopeptina (77). | 43 |
| Tabla 12. Constantes espectroscópicas del compuesto 76 | 45 |
| Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para (<i>R</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-1-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (76) en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz). | 46 |
| Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para la rosigenina (68) en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz). | 48 |
| Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para el <i>ribo</i> -xylarinol B (69) en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz). | 49 |
| Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para la masarilactona B (70) en CD_3OD (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz). | 50 |
| Tabla 17. Cl_{50} de los compuestos evaluados contra α -glucosidasa de <i>R. obeum</i> | 52 |

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Diagrama del fraccionamiento del extracto orgánico del extracto de *M. flavorosea*.32

Esquema 2. Síntesis del compuesto **76**.33

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| $[\alpha]_D^{20}$ | Rotación óptica específica a 20°C |
| $[M+H]^+$ | Pseudoion molecular positivo |
| °C | Grados Celsius |
| 3D | Tercera dimensión |
| Å | Angstrom |
| A.F. | Ácido fórmico |
| A_{fc} | Absorbancia final del pozo control |
| A_{fp} | Absorbancia final de pozo de prueba |
| A_{ic} | Absorbancia inicial del pozo control |
| A_{ip} | Absorbancia inicial del pozo de prueba |
| Arg | Arginina |
| Asp | Aspartato |
| ATCC | American Type and Culture Collection |
| atm | Atmósfera |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| c | Concentración |
| CCA | Cromatografía en columna abierta |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| Cl_{50} | Concentración inhibitoria media |
| CLAE | Cromatografía de líquidos de alta eficiencia |
| cm^{-1} | Inverso de centímetro |
| COSY | Espectro bidimensional de correlación homonuclear |
| C-R | Concentración-Respuesta |
| CtMGAM | Dominio carboxi-terminal de la maltasa-glucoamilasa |
| CtSI | Dominio carboxi-terminal de la sacarasa-isomaltasa |
| d | Señal doble |
| dd | Señal doble de dobles |
| ddd | Señal doble de dobles de dobles |
| ddq | Señal doble de dobles de cuádruples |
| DFT | Teoría del funcional de la densidad |
| DG | Diabetes Gestacional |
| DM | Dinámica Molecular |
| DPP-4 | Dipeptidil peptidasa 4 |

| | |
|------------|---|
| dt | Señal doble de triples |
| DT1 | Diabetes Tipo 1 |
| DT2 | Diabetes 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 |
| GLUT-4 | Transportador de glucosa tipo 4 |
| HbA1c | Hemoglobina glicosilada |
| Hex | Hexano |
| His | Histidina |
| HMBC | Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces |
| HSQC | Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple |
| Hz | Hertz |
| IDF | Federación Internacional de la Diabetes |
| Ile | Isoleucina |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística y Geografía |
| IR | Infrarrojo |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| K | Kelvin |
| Kcal | Kilocaloría |
| m | Señal múltiple |
| <i>m/z</i> | Relación masa-carga |
| mg | Miligramo |
| MGAM | Maltasa-Glucoamilasa |
| MHz | Mega Hertz |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| mmol | Milimol |
| nm | Nanómetro |
| ns | Nanosegundos |
| NtMGAM | Dominio amino-terminal de la maltasa-glucoamilasa |
| NtSI | Dominio amino-terminal de la sacarasa-isomaltasa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| p | Señal quintuple |

| | |
|----------------------|---|
| PDA | Detector de arreglo de fotodiodos |
| PDB | Protein Data Bank |
| PDE1 | Fosfodiesterasa 1 |
| Phe | Fenilalanina |
| PN | Producto natural |
| <i>p</i> -NPG | Para-nitrofenilglucopiranosido |
| PPAR- γ | Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma |
| pq | Señal quintuple de cuádruples |
| qd | Señal cuádruple de dobles |
| qdd | Señal cuádruple de dobles de dobles |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| RMN- ¹³ C | Resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| RMN- ¹ H | Resonancia magnética nuclear de protón |
| RMSD | Desviación media cuadrática |
| ROESY | Espectro bidimensional de efecto Overhauser nuclear de cuadro giratorio |
| s | Señal simple |
| SGLT2 | Cotransportador de sodio y glucosa tipo 2 |
| SI | Sacarasa-Isomaltasa |
| SUR1 | Receptor de sulfonilurea 1 |
| t | Señal triple |
| TCI | Tres Canales Inversos |
| TEA | Trietilamina |
| TOCSY | Espectro bidimensional de espectroscopía de correlación total |
| t_R | Tiempo de retención |
| Trp | Triptófano |
| Tyr | Tirosina |
| UV | Ultravioleta |
| δ_C | Desplazamiento químico de carbono |
| ΔG | Energía libre de Gibbs |
| δ_H | Desplazamiento químico de protón |
| λ | Longitud de onda |
| μ l | Microlitro |
| μ M | Micromolar |
| μ m | Micrómetro |

RESUMEN

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de nuevos compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de la diabetes, específicamente inhibidores de α -glucosidasas. El hongo *Malbranchea flavorosea* demostró ser una fuente importante de metabolitos bioactivos, ya que en un estudio previo se descubrieron compuestos con actividad inhibitoria contra las α -glucosidasas. En este trabajo se investigó de nueva cuenta el extracto orgánico del medio de cultivo a base de arroz del hongo *M. flavorosea* con la finalidad de obtener los metabolitos minoritarios con actividad biológica.

El extracto orgánico fue obtenido mediante la técnica de maceración y fraccionado a través de un proceso de reparto y por cromatografía en columna de gel de sílice. Las fracciones terciarias donde no se identificaron los metabolitos previamente reportados fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, lo cual condujo al aislamiento de seis metabolitos secundarios. Los compuestos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales como rosigenina (**68**), *ribo*-xylarinol B (**69**), masarilactona B (**70**), flavorroseósido B (**71**), (*S*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**) y 4-hidroxi-2-*O*- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**). Los productos **71-73** son entidades químicas nuevas, y los demás metabolitos se describen por vez primera en el género *Malbranchea*.

Los compuestos flavorroseósido B (**71**) y 4-hidroxi-2-*O*- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**) son metabolitos análogos o derivados de los compuestos flavorroseósido y clavatul, respectivamente, los cuales se aislaron previamente de este hongo. Por otro lado, el compuesto (*S*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**), representa el primer ejemplo de una benzodiazepindiona aislada de un género distinto a *Aspergillus* y *Penicillium*. De manera adicional, este metabolito resultó activo frente a la α -glucosidasa de *Ruminococcus obeum* con una actividad comparable a la de la acarbosa (CI_{50} de 1.33 ± 0.051 mM).

El compuesto (*R*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-1-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**76**), un análogo del compuesto **72**, se sintetizó a partir de *D*-triptófano y el anhídrido *N*-metil

isatóico. El compuesto **76** también fue activo frente a la enzima de *R. obeum* con una CI_{50} de 1.68 ± 0.070 mM.

Para complementar la actividad biológica observada, se realizaron estudios de acoplamiento y dinámica molecular de los compuestos activos con la enzima α -glucosidasa de *R. obeum* (PDB: 3PHA). Para el caso del acoplamiento molecular, se observó que los metabolitos activos se unen en el sitio catalítico de la enzima. Por otro lado, los datos de energía (ΔG) obtenidos del análisis de dinámica molecular mostraron que los compuestos **72** y **76** tienen una alta afinidad por la enzima. Estos resultados correlacionan con la actividad observada *in vitro*.

Una vez más se comprueba que el hongo *M. flavorosea* es una fuente natural valiosa para la obtención de inhibidores de α -glucosidasas. Asimismo, se demuestra que en el metabolismo secundario de este hongo, bajo las condiciones de cultivo, predomina la biosíntesis de policétidos, aunque se aisló un dipéptido del tipo de las ciclopeptinas.

ABSTRACT

In a previous study the major α -glucosidase inhibitors of a grain-based culture extract of *Malbranchea flovorosea* were isolated and characterized. Thus, the present investigation was undertaken in order to isolate the minor active metabolites.

Extensive partitioning and chromatographic procedures of a newly prepared fungal extract led to the isolation of three new chemical entities, namely flavoroseoside B (**71**), (*S*)-3,4-dihydro-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-4-methyl-1*H*-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**72**) and 4-hydroxy-2-*O*- α -ribofuranosyl-5-methylacetophenone (**73**), along with the known compounds rosigenin (**68**), riboxylarinol B (**69**), and massarilactone B (**70**). All compounds were characterized by spectroscopic and spectrometric means.

Flavoroseoside B (**71**) is an analog of flavoroseoside, a glycosylated dihydrochromone isolated previously from this species. On the other hand, 4-hydroxy-2-*O*- α -ribofuranosyl-5-methylacetophenone (**73**) is related to clavatol, which was also previously isolated from this fungus.

Compound **72**, showed a cyclopeptine skeleton and represents the first benzodiazepinedione isolated outside the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Compound **72** showed activity against α -glucosidase from *Ruminococcus obeum*, with an $IC_{50} = 1.33 \pm 0.051$ mM. (*R*)-3,4-dihydro-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-1*H*-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**76**), synthesized from *D*-tryptophan and *N*-methyl isatoic anhydride also showed inhibitory activity ($IC_{50} = 1.68 \pm 0.070$ mM) against the *R. obeum* enzyme.

Docking studies showed that active compounds **72** and **76** might bind at the catalytic site of the enzyme. Moreover, the energetic data (ΔG) obtained from the molecular dynamics trajectory suggested that these compounds have a high affinity to the enzyme. These findings provided more information for the activity observed *in vitro*.

Malbranchea flovorosea is definitively a valuable source of α -glucosidase inhibitors. The secondary metabolism of this fungus is characterized for the biosynthesis of polyketides although a dipeptide of the cyclopeptine family is also produced.

1 ANTECEDENTES

1.1 DIABETES

La diabetes mellitus es una afección crónica caracterizada por la presencia de altos niveles de glucosa en sangre, debido a que el cuerpo no produce la cantidad suficiente de insulina o bien, no es capaz de utilizar esta hormona de forma eficaz.

Existen tres tipos principales de diabetes, la primera de ellas, Diabetes tipo 1 (DT1), es de carácter autoinmune ya que el propio sistema inmunológico destruye las células β -pancreáticas; el individuo afectado no produce insulina. La patogénesis de esta enfermedad es de carácter multifactorial, pero involucra una susceptibilidad genética de predisposición a respuestas inmunes anormales sobre los islotes pancreáticos. En la etiología de esta enfermedad pueden existir también factores ambientales y modificaciones epigenéticas (Kahaly & Hansen, 2016).

La Diabetes tipo 2 (DT2), es la más común (~90 % de los afectados); en este tipo, la hiperglucemia se produce por la incapacidad del cuerpo para usar insulina, es decir, existe una resistencia a su acción, o bien por una disminución en la secreción de la hormona. Las causas de la DT2 no se entienden plenamente, sin embargo, existen factores de riesgo como la obesidad, una dieta inadecuada, falta de actividad física, alteración de la tolerancia a la glucosa, tabaquismo y los antecedentes familiares (IDF, 2017).

La tercera clase es la diabetes gestacional (DG) que se presenta en algunas mujeres embarazadas durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, aunque puede presentarse en cualquier momento del mismo. Este tipo de diabetes surge por una resistencia a la insulina, debido a la producción de hormonas en la placenta. Cabe destacar, que los bebés nacidos de madres con DG tienen mayor riesgo a desarrollar obesidad y DT2 (IDF, 2017).

Complementario a esto, existe un grupo importante de personas que poseen niveles de glucosa en sangre más elevados de lo normal, pero por debajo del umbral para el diagnóstico de diabetes. Esta condición se conoce como alteración de la tolerancia a la glucosa o prediabetes, en la cual existe cierta resistencia a la acción de la insulina, como en el caso de la DT2. Es importante mencionar que la mayoría de estos individuos se convierten en diabéticos tipo 2 una década más

tarde, sin embargo, se ha comprobado que al disminuir los factores de riesgo, el avance de prediabetes a diabetes puede detenerse.

En cualquier caso, los síntomas clásicos de la enfermedad son micción frecuente, sed excesiva y boca seca, falta de energía, apetito frecuente y pérdida de peso sin causa aparente. Cabe señalar que no en todos los casos se presentan los síntomas, por lo que la enfermedad puede pasar desapercibida.

La hiperglucemia crónica induce en la mayoría de los pacientes una serie de complicaciones, que pueden ser de dos tipos: microvasculares o macrovasculares. Dentro de las complicaciones microvasculares se encuentra la retinopatía diabética, la cual es causada por el daño en los vasos sanguíneos de la capa posterior del ojo, lo que provoca una pérdida progresiva de la vista e incluso ceguera. También la nefropatía, que se manifiesta como insuficiencia renal; y finalmente, la neuropatía, en la cual hay desgaste de los nervios periféricos, lo que provoca impotencia sexual y falta de sensibilidad en las extremidades inferiores, lo que desencadena el llamado pie diabético. Las complicaciones macrovasculares involucran a las enfermedades cardiovasculares, en las cuales la hiperglucemia daña los vasos sanguíneos mediante el endurecimiento y obstrucción de las arterias, fenómeno que reduce el flujo de sangre al músculo cardíaco (infarto al miocardio), encéfalo (accidente cerebrovascular) o las extremidades (OMS, 2018).

1.2 PANORAMA MUNDIAL Y NACIONAL DE LA DIABETES

De acuerdo con un estudio realizado en 2017 por la Federación Internacional de Diabetes, existen 425 millones de personas con esta enfermedad en todo el mundo y se estima que para el año 2045, este número aumente casi un 50% (**Figura 1**). Nuestro país ocupa el quinto lugar en países con mayor prevalencia de diabetes, al contar con 12 millones de personas enfermas, sin embargo, 4.5 millones de personas no son conscientes de padecer esta enfermedad (IDF, 2017).

A nivel mundial, la diabetes es la sexta causa de muerte con 1.6 millones de defunciones en el 2015 (OMS, 2017). Y de acuerdo con los datos estadísticos más recientes, la diabetes es la primera causa de muerte en nuestro país, con 98 mil personas fallecidas, lo cual representa el 15% del total de fallecidos en el 2015 (INEGI, 2018).

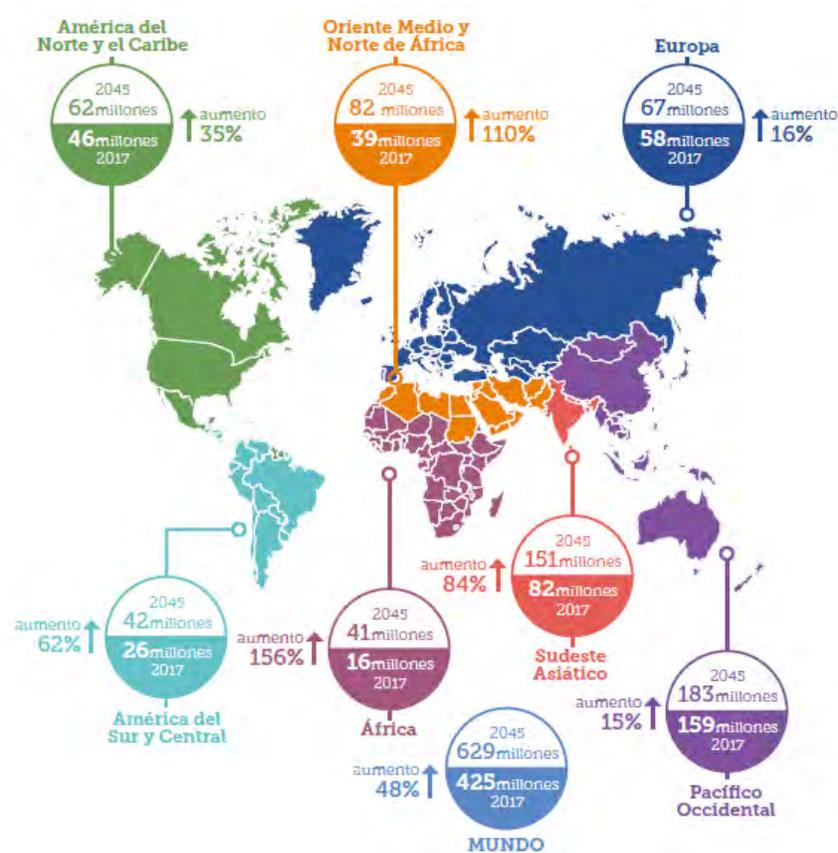


Figura 1. Panorama actual de la diabetes y proyección para el 2045 (IDF, 2017).

La diabetes además de ser un problema de salud serio tiene un alto impacto económico debido al uso de servicios de salud, la falta de productividad y el costo del tratamiento de la enfermedad y sus complicaciones. En 2017, a nivel mundial el gasto sanitario empleado en diabetes fue de 727 mil millones de dólares, mientras que en México el gasto fue de 19 mil millones de dólares, ocupando el octavo puesto en países con mayor gasto sanitario en diabetes (IDF, 2017).

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 el riesgo de mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones (NOM-015-SSA2-2010).

La terapia a seguir depende del tipo de diabetes que se presente. Para el caso de DT1, al haber una carencia total de insulina, la terapia consiste en la administración exógena de esta hormona a través de inyecciones o con bombas automáticas.

Para el caso del tratamiento de DT2, lo más común es seguir una dieta baja en carbohidratos, hacer ejercicio regularmente y complementar con fármacos orales que controlen la hiperglucemia. De acuerdo con una revisión reciente, los fármacos más utilizados en la terapéutica se dividen en varios tipos como se muestra en la **Figura 2** (Israili, 2011; Thulé, 2012; Upadhyay *et al.*, 2018).

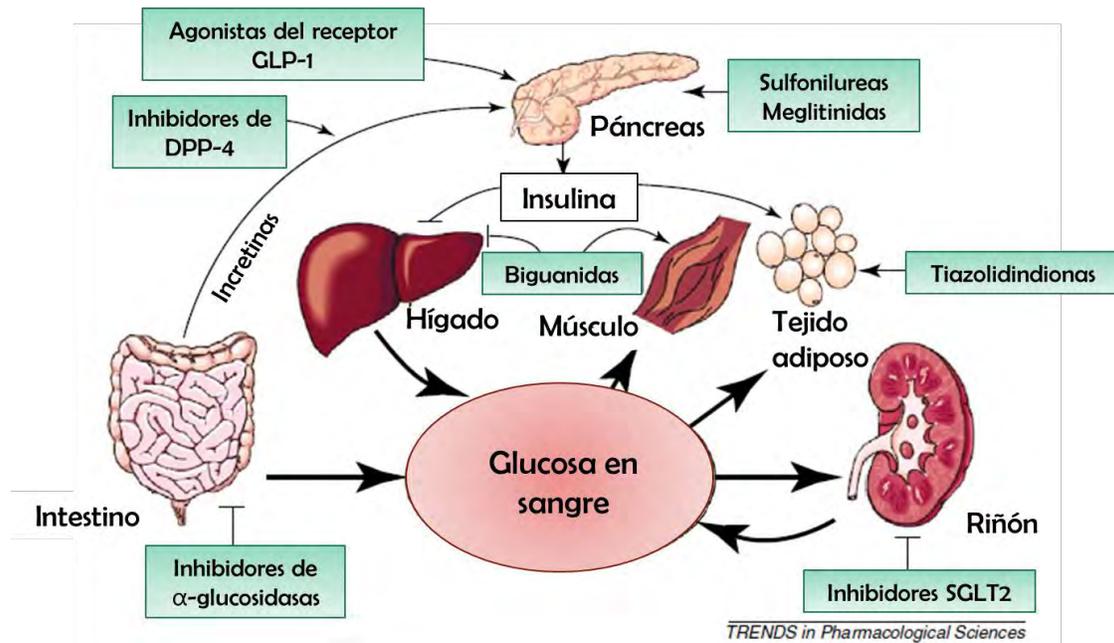


Figura 2. Sitio de acción de los fármacos más usados para el tratamiento de DT2. Imagen modificada de Bailey, 2011.

a. Biguanidas

Su mecanismo de acción consiste en disminuir la producción hepática de glucosa (inhibición de la gluconeogénesis); incrementar la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético al aumentar la actividad del receptor tirosina-cinasa y la translocación del transportador de glucosa (GLUT-4) a la membrana celular; aumentar la sensibilidad a la glucosa de las células β -pancreáticas; y aumentar la cantidad de la incretina GLP-1 por un mecanismo diferente a la inhibición de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4). La metformina, único fármaco de esta familia en la terapéutica, es el tratamiento de primera línea para DT2.

b. Sulfonilureas

Son secretagogos de insulina. Se unen al receptor SUR1 de las membranas de las células β -pancreáticas, cerrando el canal de potasio sensible a ATP. La inhibición de este canal lleva a la despolarización de la membrana celular, abriendo los canales de calcio dependientes de voltaje,

fusionando los gránulos de insulina con la membrana, y así, liberando insulina al torrente sanguíneo. Este efecto es independiente de la concentración de glucosa en sangre, llevando un importante riesgo de hipoglucemia.

c. Meglitinidas

Este tipo de fármacos actúan de forma similar a las sulfonilureas, al unirse al receptor SUR1, sin embargo, lo hacen en un sitio diferente. Las meglitinidas tienen una duración de acción disminuida, ya que la afinidad de unión con el receptor es más débil.

d. Tiazolidindionas

Actúan en músculo esquelético y tejido adiposo al activar el factor nuclear de transcripción PPAR- γ , disminuyendo la resistencia a la insulina en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado.

e. Inhibidores de DPP-4

La dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) es una enzima proteolítica que degrada a las incretinas GIP y GLP-1. Al inhibir esta enzima, se aumenta la concentración de GIP y GLP-1, al actuar éstas en el páncreas, se favorece la síntesis de insulina y se disminuye la producción de glucagón, de forma dependiente a la glucosa. También son llamados potenciadores de incretinas.

f. Análogos de incretinas

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.

g. Inhibidores de cotransportadores sodio-glucosa

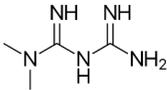
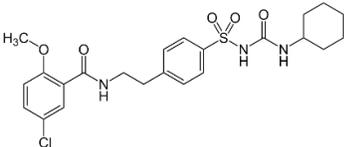
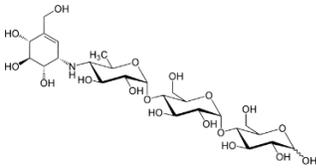
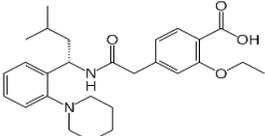
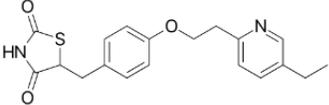
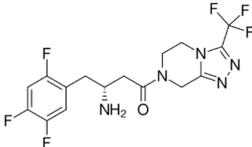
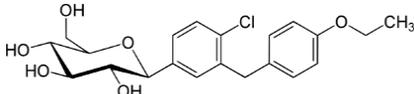
La glucosa es libremente filtrada en los riñones y luego reabsorbida en el túbulo proximal a través del receptor SGLT2. Los inhibidores de este receptor evitan la reabsorción de glucosa, al aumentar la excreción urinaria y así, disminuir sus concentraciones plasmáticas.

h. Inhibidores de α -glucosidasas

Bloquean las enzimas que hidrolizan carbohidratos complejos a glucosa, retardando su absorción a nivel intestinal y disminuyendo los niveles postprandiales de glucosa.

En la **Tabla 1** se muestran ejemplos de los fármacos más utilizados en el tratamiento de DT2, así como su mecanismo de acción simplificado.

Tabla 1. Fármacos más utilizados en el tratamiento de DT2

| Tipo de fármaco | Ejemplo | Mecanismo de acción |
|--------------------------------------|---|--|
| Biguanidas | <p>Metformina (1)</p>  | Sensibilizadores a la insulina |
| Sulfonilureas | <p>Glibenclamida (2)</p>  | Secretagogos de insulina |
| Inhibidores de α glucosidasas | <p>Acarbosa (3)</p>  | Disminuyen la tasa de absorción de glucosa |
| Meglitinidas | <p>Repaglinida (4)</p>  | Secretagogos de insulina |
| Tiazolidindionas | <p>Pioglitazona (5)</p>  | Sensibilizadores de insulina |
| Análogos de incretinas | <p>Exenatida (6)</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> | Secretagogos de insulina |
| Inhibidores de DPP-4 | <p>Sitagliptina (7)</p>  | Secretagogos de insulina |
| Inhibidores de SGLT2 | <p>Dapagliflozina (8)</p>  | Disminuyen la tasa de reabsorción de glucosa |

1.4 INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS α -GLUCOSIDASAS

1.4.1 Generalidades de las enzimas α -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 hidrólisis enzimática del enlace glucosídico se lleva a cabo mediante una reacción ácido/base, la cual requiere un donador de protones y un nucleófilo, los cuales son residuos de aspartato o glutamato. Esta hidrólisis puede resultar en la retención o inversión de la configuración del carbono anomérico (**Figura 3**). En el primer caso, el nucleófilo está más cerca del carbono anomérico, mientras que en las enzimas donde hay inversión de la configuración hay mayor distancia entre ellos, lo que permite a una molécula de agua ingresar en el espacio y así invertir la configuración (Davis & Henrissat, 1995). Las α -glucosidasas pertenecen al primer grupo, debido a que el producto de reacción es α -glucosa, mientras que la glucoamilasa al liberar β -glucosa, pertenece al segundo grupo (Chiba, 1997).

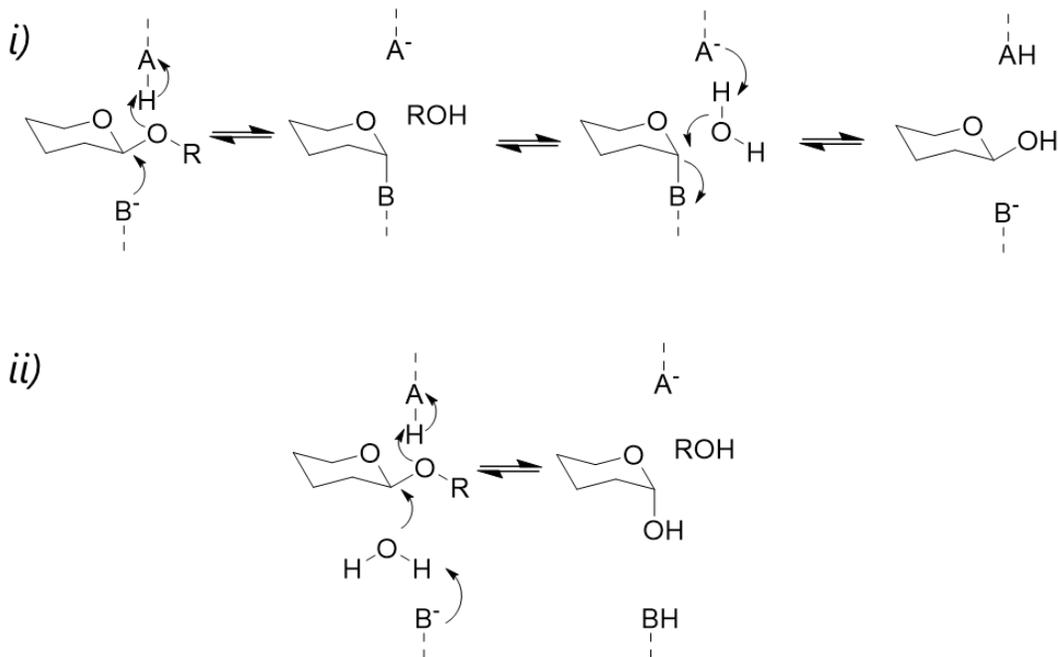


Figura 3. Hidrólisis enzimática mediada por las enzimas glucósido hidrolasas, *i*) conservando la configuración anomérica, *ii*) invirtiendo la configuración anomérica.

Las α -glucosidasas, llamadas también, 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 ellas 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 clasifican en tres clases, de acuerdo con el reconocimiento de su sustrato. Las α -glucosidasas tipo I pertenecen a la familia GH13 y generalmente se obtienen de bacterias, levaduras e insectos; son capaces de hidrolizar sustratos heterogéneos como la sacarosa y el p-nitrofenil-D-glucopiranosido, y casi no presentan actividad frente a sustratos poliméricos. Este tipo de enzimas reconocen la subunidad α -D-glucopiranosido de los carbohidratos. Las enzimas tipo II son miembros de la familia GH31, se encuentran en microorganismos fúngicos e hidrolizan con mayor facilidad sustratos homogéneos. Este grupo reconoce la subunidad maltósido. Finalmente, las enzimas tipo III también forman parte de la familia GH31 y se encuentran en plantas y mamíferos, muestran una elevada actividad contra sustratos homogéneos y poliméricos. Las enzimas que pertenecen a este grupo reconocen la subunidad maltósido, así como subunidades poliméricas (Nakai, 2005).

Las α -glucosidasas se encargan de tres procesos bioquímicos: la degradación de glucógeno en los lisosomas, la biosíntesis de glicoproteínas en el retículo endoplásmico y la degradación de los polisacáridos de la dieta en unidades monosacáridas en la luz del intestino delgado (Ernst *et al.*, 2006).

La función de las α -glucosidasas intestinales consiste en hidrolizar oligosacáridos y liberar α -glucosa, la cual puede ser absorbida por los enterocitos y llevada a circulación (**Figura 4**). En el humano, existen dos tipos de α -glucosidasas a nivel intestinal, la maltasa-glucoamilasa (MGAM) con actividad maltasa en el dominio amino-terminal (NtMGAM) y glucoamilasa en el dominio carboxi-terminal (CtMGAM); y la sacarasa-isomaltasa (SI), con actividad sacarasa en carboxi-terminal (CtSI) e isomaltasa en el amino-terminal (NtSI) (Lin *et al.*, 2016).

Las enzimas con actividad maltasa se encuentran distribuidas a lo largo de todo el intestino delgado, no obstante, las enzimas con actividad glucoamilasa se sitúan únicamente cerca de la válvula ileocecal; por otro lado, las enzimas con actividad isomaltasa se encuentran tanto en el

yeyuno como el íleon, mientras que la actividad sacarasa existe preferentemente en el yeyuno, esto probablemente debido a la acción de las enzimas proteolíticas pancreáticas en íleon (Lin *et al.*, 2016).

1.4.2 Inhibidores de las α -glucosidasas

Como parte del tratamiento de pacientes con DT2, se encuentran los inhibidores de α -glucosidasas, los cuales bloquean a estas enzimas (**Figura 4**), de tal forma que se reduce la tasa de digestión de carbohidratos complejos en glucosa, y en consecuencia la hiperglucemia postprandial.

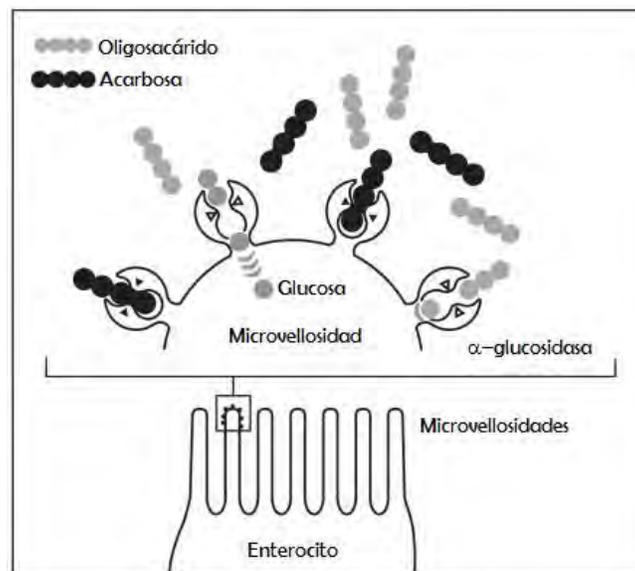


Figura 4. Ubicación de las enzimas α -glucosidasas en el intestino delgado.

Este tipo de fármacos se usan en monoterapia o en combinación con hipoglucemiantes orales que no han funcionado adecuadamente en el control de la glucosa postprandial; sin embargo, estos fármacos son más efectivos en el tratamiento de pacientes recién diagnosticados con DT2, o en condición de prediabetes, sobre todo en aquellas regiones donde la ingesta de carbohidratos es muy alta, como es el caso de México (Derosa & Maffioli, 2012).

Por otro lado, se ha observado que los inhibidores de estas enzimas son más efectivos para controlar las variaciones de glucemia intra e interdía, en comparación con otros fármacos antidiabéticos y que existe una disminución del 49% de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en pacientes con prediabetes (Derosa & Maffioli, 2012). Además, el uso a largo

plazo de estos inhibidores reduce el 0.7-0.8% de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) (Israili, 2011) y al no absorberse por el tracto gastrointestinal, no existen efectos adversos sistémicos como los presentados con otros fármacos hipoglucemiantes (Ghani, 2015).

Actualmente, existen en el mercado tres fármacos inhibidores de α -glucosidasas: acarbosa (**3**), miglitol (**9**) y voglibosa (**10**), cuyas estructuras se muestran en la **Figura 5**.

La acarbosa (**3**) es el inhibidor de α -glucosidasas más importante clínicamente, y se aisló inicialmente de *Actinoplanes* sp. SE-50. El miglitol (**9**) 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 (**10**) es un derivado de la validamicina-A, molécula que fue aislada de *Streptomyces hygroscopicus* 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.

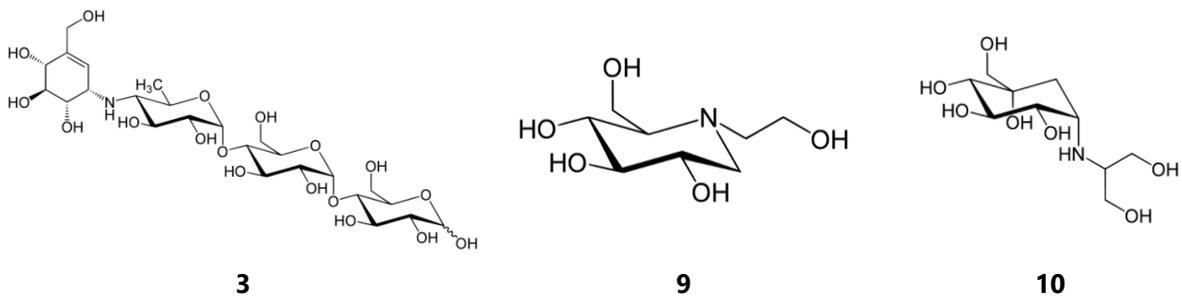


Figura 5. Inhibidores de α -glucosidasas empleados en la terapéutica.

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 incluyendo flatulencias, diarrea y distensión abdominal. No obstante, estos efectos son dosis-dependientes, por lo que se recomienda iniciar con una dosis baja e ir incrementando conforme a la tolerancia observada (Derosa & Maffioli, 2012).

1.4.3 Productos naturales como fuente de inhibidores de α -glucosidasas

Los productos naturales han jugado un rol invaluable en el tratamiento de varias enfermedades, así como en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. Estos se han mantenido como una fuente de nuevos compuestos con estructuras novedosas y con actividades biológicas interesantes para el tratamiento de diversas afecciones (Osadebe *et al.*, 2014). Así una revisión reciente reveló que de todos los fármacos aprobados entre 1981 y 2014, un alto porcentaje pertenecen a productos naturales, derivados semisintéticos de ellos o miméticos de productos naturales (**Figura 6**) (Newman & Cragg, 2016).

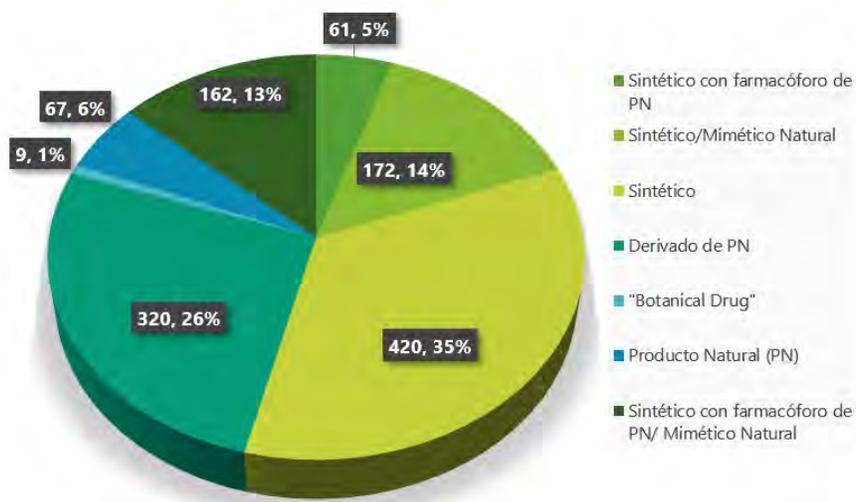


Figura 6. Fármacos aprobados de 1981 a 2014 (Newman & Cragg, 2016).

Tras el descubrimiento de la diabetes mellitus como trastorno relacionado con el metabolismo de la glucosa, el tratamiento se centraba en disminuir la hiperglicemia a través de una dieta balanceada y acciones complementarias, entre ellas el uso de plantas medicinales, algunas de las cuales han demostrado su eficacia con el paso del tiempo (Ríos *et al.*, 2016).

Muchos fármacos antidiabéticos se han desarrollado a partir de fuentes naturales. Por ejemplo, el desarrollo de la metformina que tuvo su origen en la galeguina, metabolito obtenido de la planta *Galega officinalis* o la exenatida que se obtuvo de la saliva del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*). A la par, los microorganismos han llevado al desarrollo de agentes antidiabéticos, en específico de inhibidores de α -glucosidasas, como es el caso de la acarbose que se obtuvo de una actinobacteria. De los hongos y actinomicetos también se ha aislado varios inhibidores de estas enzimas, aunque a la fecha ninguno se ha comercializado.

Algunos ejemplos de estos metabolitos se indican en la **Tabla 2**, donde se muestran ejemplos selectos de productos de origen microbiano descubiertos en los últimos años.

Tabla 2. Ejemplos selectos de inhibidores de α -glucosidasas de origen natural

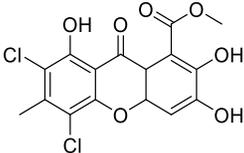
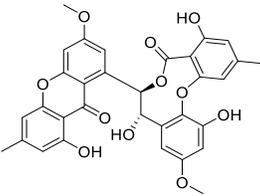
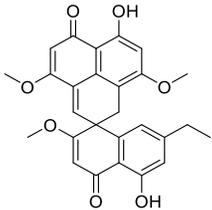
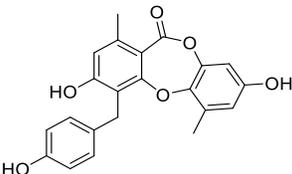
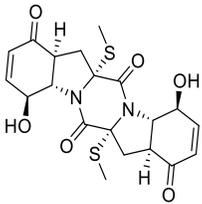
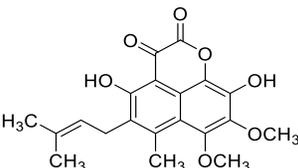
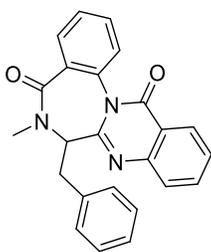
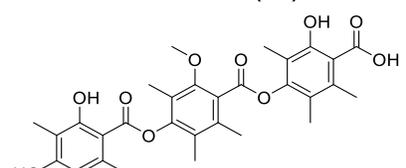
| Molécula | CI ₅₀ Tipo de enzima | Fuente de obtención | Referencia |
|--|--|--|--|
| <p>Crysoxantona (11)</p>  | <p>CI₅₀= 40 μM No especificado</p> | <p><i>Penicillium chrysogenum</i></p> | <p>(Wang <i>et al.</i>, 2018)</p> |
| <p>Ascomlactona A (12)</p>  | <p>CI₅₀= 27.9 μM No especificado</p> | <p><i>Ascomycota</i> sp. SK2YWS-L hongo endófito de mangle</p> | <p>(Liu <i>et al.</i>, 2017)</p> |
| <p>Minimoidiona B (13)</p>  | <p>CI₅₀= 2.9 μM <i>S. cerevisiae</i></p> | <p><i>Preussia minimoides</i> hongo endófito de <i>Hintonia latiflora</i></p> | <p>(Rangel-Grimaldo <i>et al.</i>, 2017)</p> |
| <p>Botryorhodina H (14)</p>  | <p>CI₅₀= 8.1 μM No especificado</p> | <p>Co-cultivo de <i>Trichoderma</i> sp. 307 (hongo endófito de mangle) y <i>Acinetobacter johnsonii</i> B2</p> | <p>(Zhang <i>et al.</i>, 2017)</p> |
| <p>Exserohilonea (15)</p>  | <p>CI₅₀= 195 μM <i>S. cerevisiae</i></p> | <p><i>Setosphaeria rostrate</i> hongo endófito de <i>Costus speciosus</i></p> | <p>(Centko <i>et al.</i>, 2017)</p> |
| <p>Flavifenalenona C (16)</p>  | <p>CI₅₀= 78.9 μM No especificado</p> | <p><i>Aspergillus flavipes</i></p> | <p>(Zhang <i>et al.</i>, 2016)</p> |

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

| Molécula | Cl ₅₀ Tipo de enzima | Fuente de obtención | Referencia |
|---|--|--|--|
| <p>Benzomalvina A (17)</p>  | <p>Cl₅₀= 383.2 μM <i>S. cerevisiae</i></p> | <p><i>Penicillium spathulatum</i> B35</p> | <p>(Del Valle <i>et al.</i>, 2016)</p> |
| <p>Thielavina J (18)</p>  | <p>Cl₅₀= 15.8 μM <i>S. cerevisiae</i></p> | <p>MEXU27095 hongo endófito de <i>Hintonia latiflora</i></p> | <p>(Rivera-Chávez <i>et al.</i>, 2013)</p> |

1.5 ANTECEDENTES DEL GÉNERO *MALBRANCHEA*

El género *Malbranchea* fue descrito por Saccardo en 1882 e incluía una sola especie, *M. pulchella*, misma que se caracterizaba por poseer hifas fértiles arqueadas o curvadas. Años más tarde (1925-1935), dos nuevas especies fueron descritas (*M. bolognesii-chiurcoi* y *M. kambayashii*), sin embargo, se redujeron a sinonimias de *M. pulchella* (Sigler & Carmichael, 1976).

Casi cien años después, este género llamó la atención de dos investigadores, quienes adicionaron doce especies nuevas al género con base en las características morfológicas de los hongos. Así las especies *M. albolutea*, *M. arcuata*, *M. aurantiaca*, *M. chrysosporoidea*, *M. circinata*, *M. dendritica*, *M. flava*, *M. flavorosea*, *M. flocciformis*, *M. fulva* y *M. gypsea* fueron agregadas al género; además de *M. sulfurea* descrita en 1907 por Miehe, que fue catalogada como *M. pulchella* var. *sulfurea* (Sigler & Carmichael, 1976).

Posteriormente, *M. graminicola* y *M. filamentosa* (Sigler *et al.*, 1982), *M. multicolor* (Mannina & Mosca, 1983), *Trichothecium cinnamomeum* (reclasificada a *Malbranchea cinnamomea*) (Van Oorschot & De Hoog, 1984) y *M. sclerotica* se adicionaron al género (Guarro *et al.*, 1993).

Las especies del género *Malbranchea* son hongos comunes del suelo con una distribución global; son mesófilas, termotolerantes o termofílicas y pueden ser queratinolíticas o celulolíticas.

De acuerdo con la literatura, los hongos del género *Malbranchea* son una fuente importante de compuestos con actividad biológica y de enzimas de interés biotecnológico.

Los metabolitos secundarios de este género pertenecen a diferentes categorías estructurales, incluyendo esteroides modificados (**19-21**), triterpenoides (**22-25**), sesquiterpenoides (**26-28**), dímeros de compuestos C₆C₃-C₆C₂ (**29-31**), alcaloides indólicos (**32-41**), policétidos, entre otros compuestos.

Los esteroides modificados de *Malbranchea* (**Figura 7**) se llaman antrasteroides; 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 antrasteroides de *M. filamentosa* se designaron con los nombres comunes de malsterósidos A-C (**19-21**), todos son de carácter glicosídico y como particularidad el anillo B de estos productos es de carácter aromático. Los malsterósidos A y C (**19** y **21**) demostraron efectos citostáticos contra las líneas celulares Hela y A549 (carcinoma de pulmón), mientras que el malsterósido B (**20**) no presentó actividad. Esto indica que la presencia de un hidroxilo libre en el anillo A es fundamental para la actividad biológica.

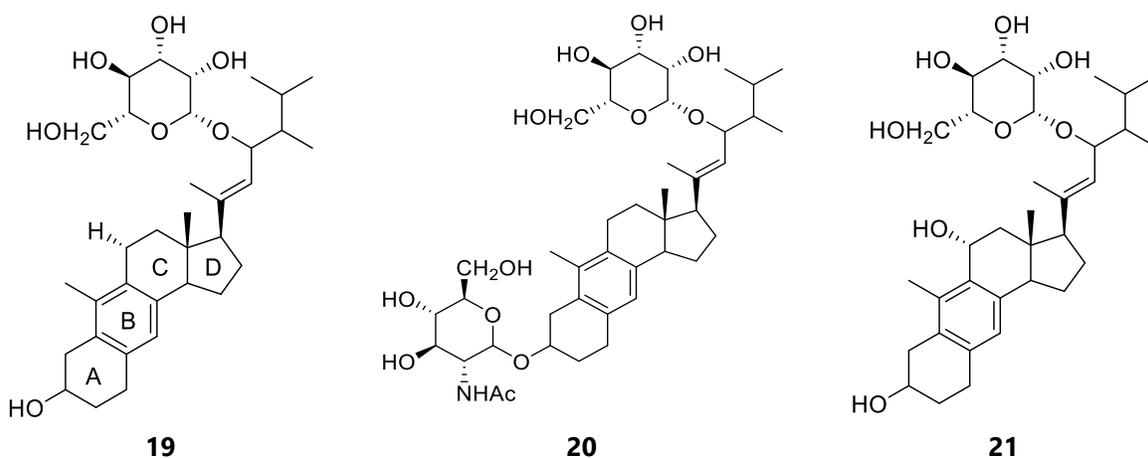


Figura 7. Antrasteroides aislados de *M. filamentosa*.

Otros terpenoides del género son los malbranqueósidos A-D (**22-25**), glicósidos de triterpenoides modificados que contienen D-glucosamina como glicona (**Figura 8**); este hecho resulta sin precedentes en el reino fúngico (Wakana *et al.*, 2008b).

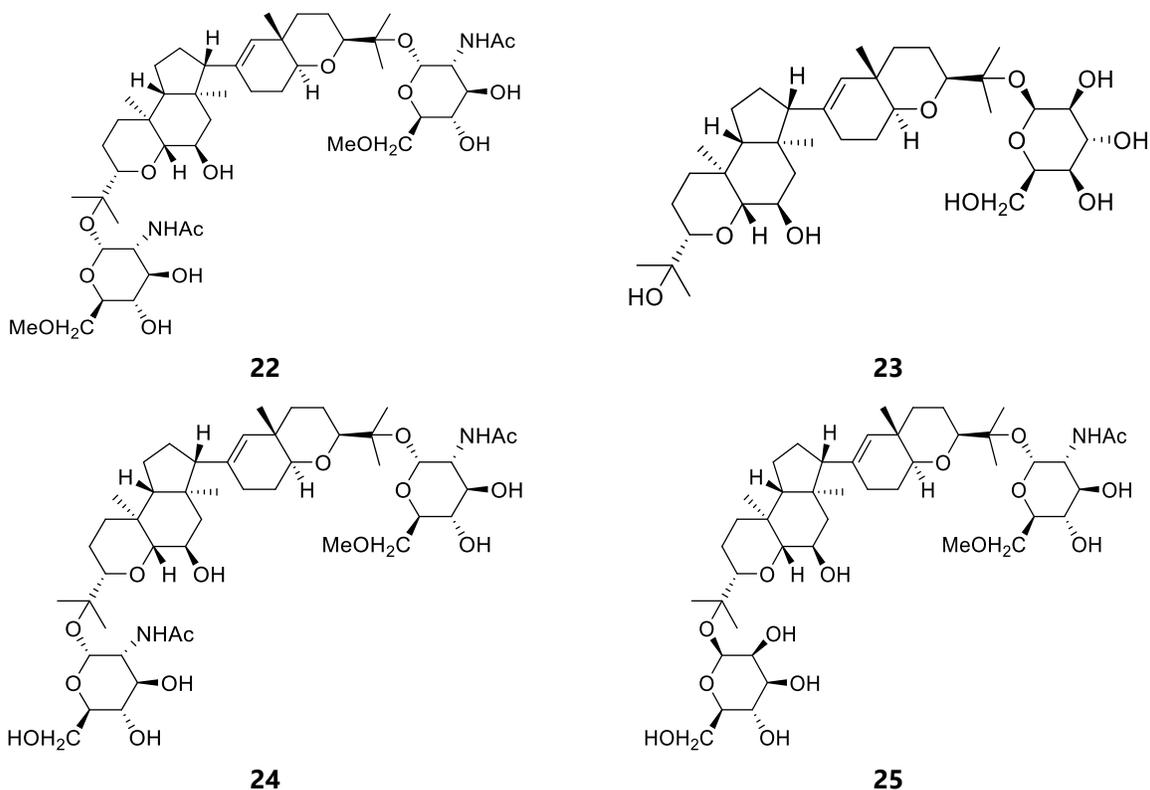


Figura 8. Triterpenoides de *Malbranchea*.

Entre los sesquiterpenoides se encuentran los malfilanoles A (**26**) y B (**27**) de *M. filamentosa* y el 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10), 7(11), 8(9)-tien-12(8)-ólido (**28**) de *M. aurantiaca* (**Figura 9**). 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 **28** 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*. El efecto fue similar al del ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Cabe destacar que los eremofilanos son metabolitos comunes en las plantas, sin embargo, en hongos se han aislado principalmente en el género *Penicillium*.

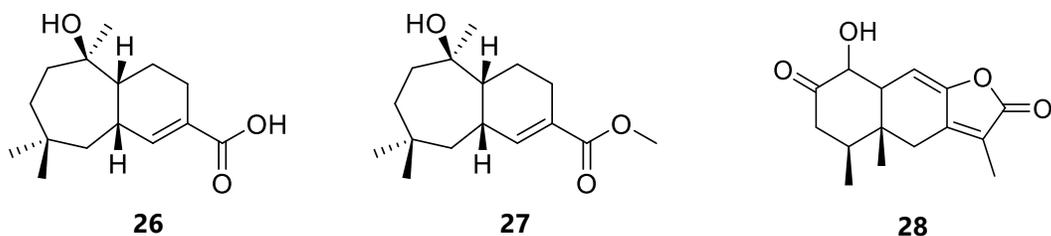


Figura 9. Sesquiterpenoides del género *Malbranchea*.

Los dímeros de compuestos $C_6C_3-C_6C_2$ (**29-31**) de *M. filamentosa* (**Figura 10**) tienen la particularidad de presentar una lactona de cinco miembros α,β -insaturada. De estos productos, los malfilamentósidos A (**30**) y B (**31**) son de naturaleza glicosídica y representan el primer ejemplo de derivados $C_6C_3-C_6C_2$ glucosilados aislados de fuentes fúngicas (Wakana *et al.*, 2008a). El gymnoascólido A (**29**) es el más simple de estos productos y tiene propiedades vasodilatadoras, debido a que bloquea los canales de calcio voltaje-dependientes (Hosoe *et al.*, 2005); 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).

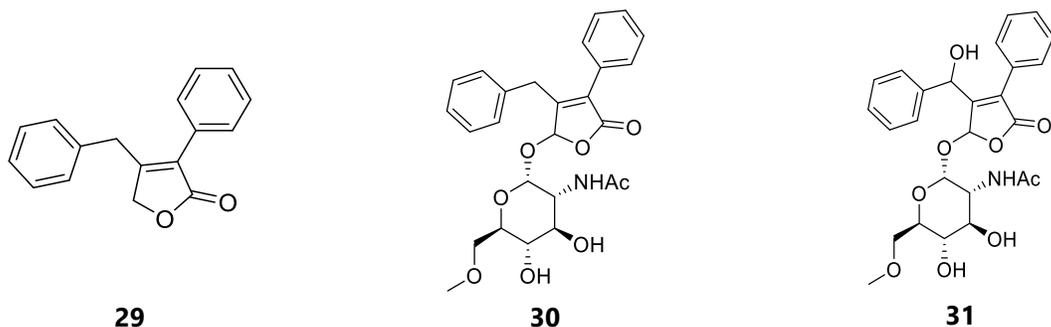


Figura 10. Metabolitos $C_6C_3-C_6C_2$ de *M. filamentosa*.

De *M. aurantiaca* y *M. graminicola* se aislaron las malbrankeamidas (**32-38**) (**Figura 13**), una serie de alcaloides de tipo indol-terpenoides que presentan un biciclo[2.2.2]diazaoctano. 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 biciclo y la configuración *syn* (**Figura 11**) en el puente del biciclo (Finefield *et al.*, 2012).

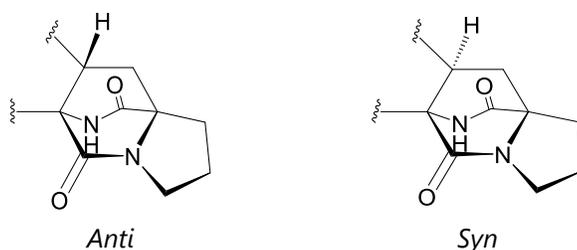


Figura 11. Configuración *syn* y *anti* del biciclo diazaoctano.

Biogénicamente, estos alcaloides derivan de una unidad de L-triptófano, una L-prolina y un residuo isopreno. Se ha propuesto que el biciclo[2.2.2]diazaoctano de los alcaloides antes mencionados se genera a través de una reacción intramolecular de Diels-Alder vía el intermediario IV que se indica en la **Figura 12**, el dienófilo se encuentra en la porción isoprenoide, y el dieno en el anillo pirazina del intermediario (Finefield *et al.*, 2012).

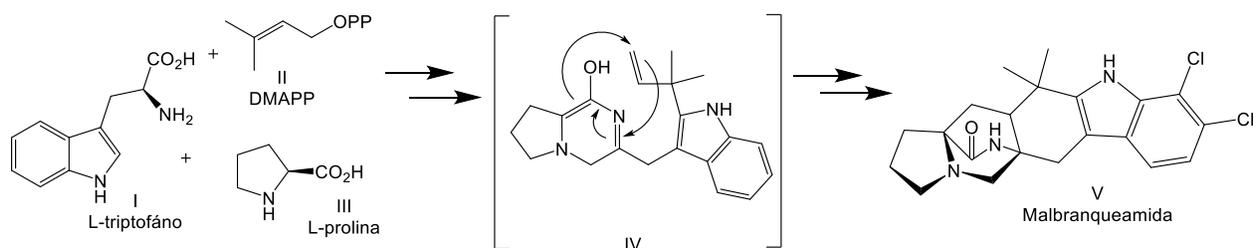


Figura 12. Biogénesis propuesta para la malbrancheamida.

En cuanto a su actividad biológica, las malbrancheamidas son inhibidoras de la calmodulina, en particular los productos **32-34** (**Figura 13**). La malbrancheamida (**32**) posee además propiedades 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; Figueroa *et al.*, 2011). Más recientemente se comprobó su efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata. El efecto fue dependiente de la concentración, y fue mayor en presencia del endotelio (Madariaga-Mazón *et al.*, 2015).

Además de las malbrancheamidas, *M. graminicola* contiene otros alcaloides indol-terpenoides como son la paraherquamida B (**39**) y la notoamida B (**40**) (**Figura 13**) (Watts *et al.*, 2011). Estos también presentan el biciclo[2.2.2]diazaoctano. Las paraherquamidas son potentes antihelmínticos, mientras que las notoamidas son agentes insecticidas, antibacterianos y citotóxicos moderados (Finefield *et al.*, 2012).

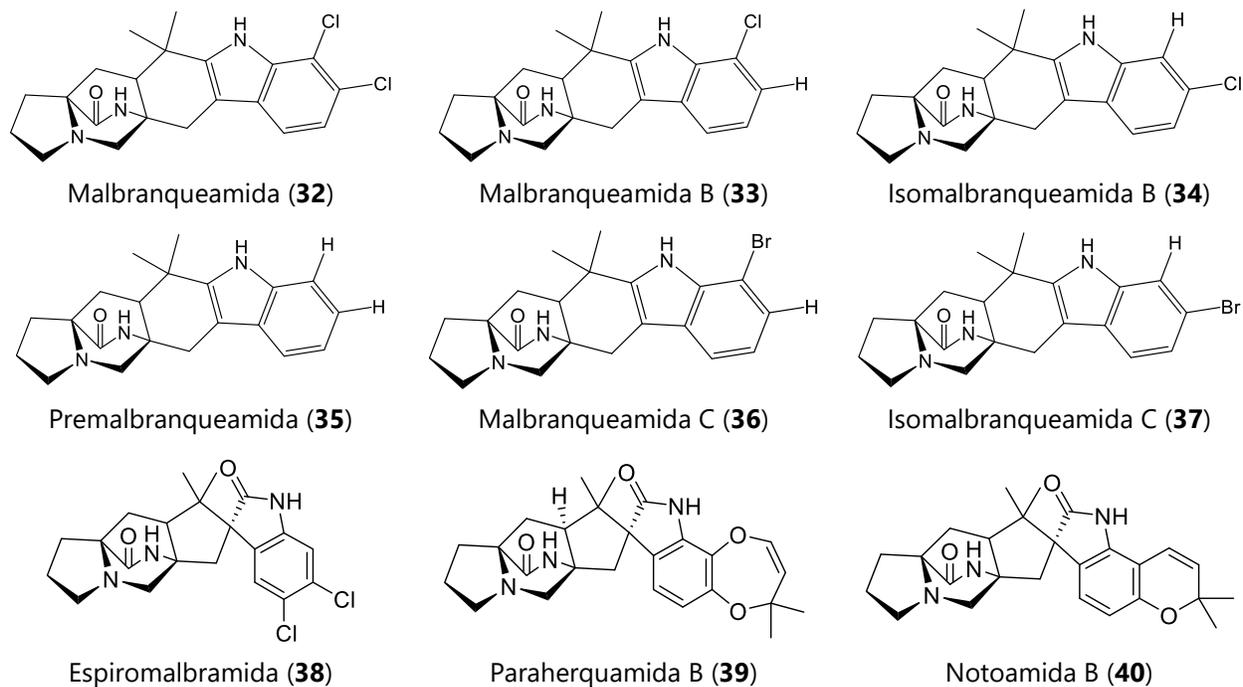


Figura 13. Metabolitos con el núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano.

De la especie *M. filamentosa* fue aislada la amaumina (**41**) (**Figura 14**) un alcaloide indólico con el núcleo dicetopiperazina (Wakana *et al.*, 2008a), este compuesto fue aislado por primera vez a partir del hongo *Amauroascus* sp. y resultó ser un potente vasodilatador bloqueador de canales de calcio (Takase *et al.*, 1985).

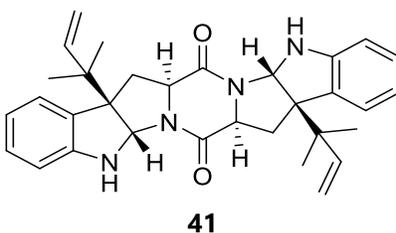


Figura 14. Otros alcaloides del género *Malbranchea*.

Los malbranpirroles A-F (**42-47**) son policétidos prenilados aislados de *Malbranchea sulfurea* (**Figura 15**), una especie termófila; estos metabolitos son fotosensibles y presentaron actividad citotóxica contra 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.

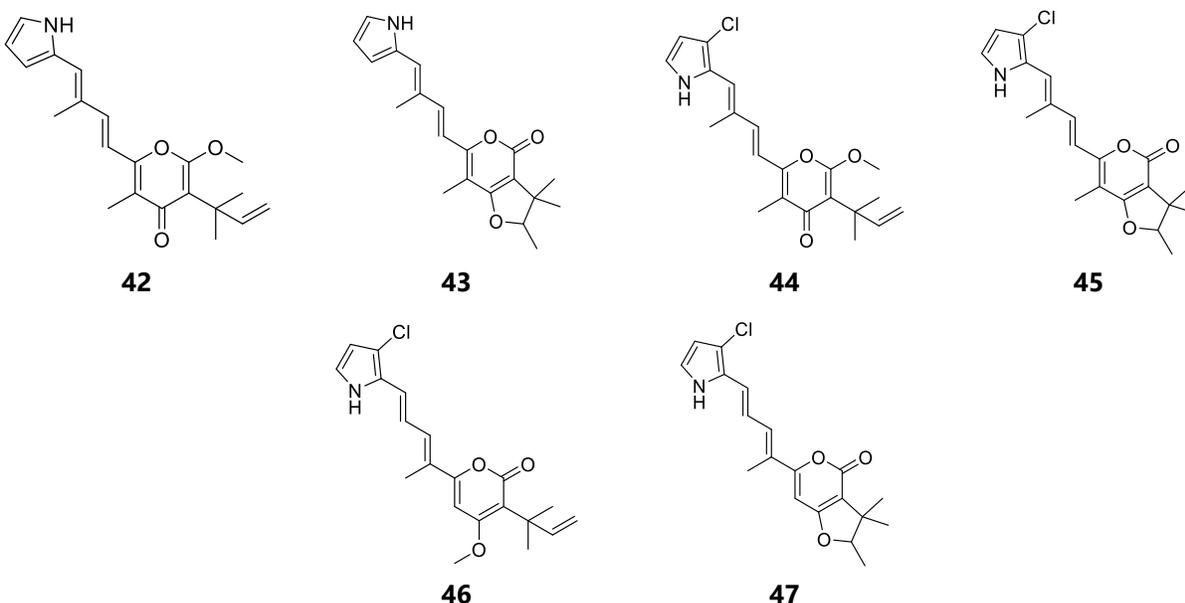


Figura 15. Policétidos prenilados del género *Malbranchea*.

De la especie *M. sulfurea* se aisló el compuesto Tf-26Vx (**48**), cuya estructura se muestra en la **Figura 16**, el cual es un dímero de dihidroisocumarinas que presentó actividad como antibiótico frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas estrictamente anaerobias (Saito *et al.*, 1979).

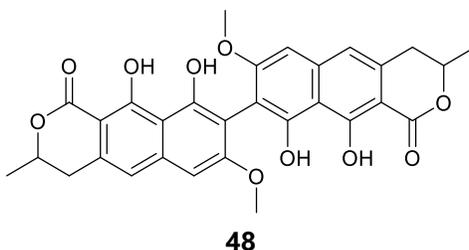


Figura 16. Policétido de *M. sulfurea*.

Malbranchea filamentosa biosintetiza la antraquinona, eritroglaucina (**49**) (Hosoe *et al.*, 2005), y *M. cinnamomea* las benzoquinonas e hidroquinonas **50-55** (**Figura 17**). De este último grupo, la molécula base es la malbrancina (**50**) que posee actividad antibiótica frente a bacterias Gram positivas y citotóxica contra las líneas celulares P388 (linfoma de monocitos) y KB (carcinoma/papiloma). Cabe mencionar que **50** es la primera benzoquinona en presentar un residuo de tipo 2-ceto-3-metil-propil (Chiung *et al.*, 1993). En cuanto a los demás derivados, el único compuesto que demostró relevancia biológica fue la 7-metoximalbrancina (**52**) que presentó actividad inhibitoria del activador transcripcional del retrovirus HTLV-I causante del linfoma de Hodking. Es importante destacar que las quinonas presentes en este grupo son *p*-

benzoquinonas con excepción del compuesto **55** que es una *o*-benzoquinona (Schlegel *et al.*, 2003a).

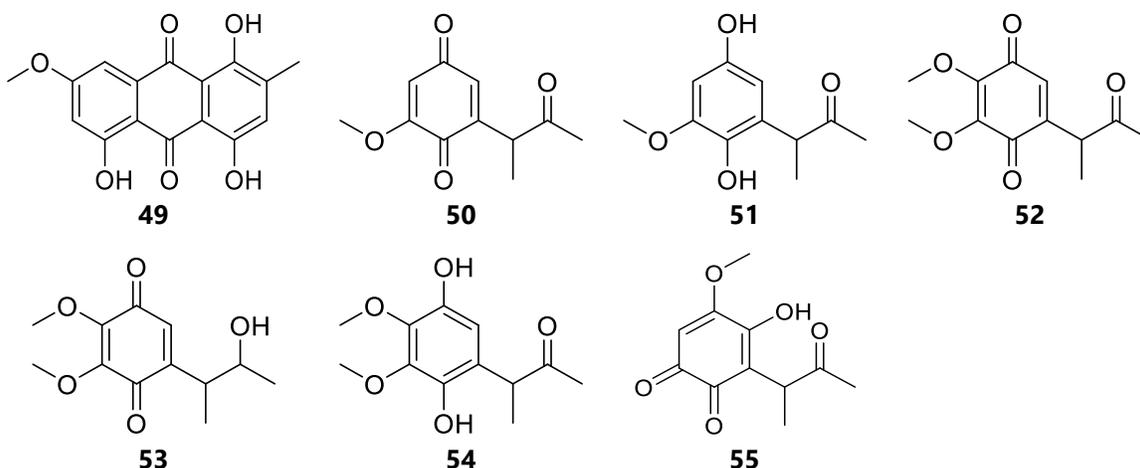


Figura 17. Metabolitos tipo quinonas del género *Malbranchea*.

Malbranchea cinnamomea, otra especie termófila del género produce compuestos de tipo benzofurano como el 7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (**56**) (**Figura 18**), el cual presentó actividad antioxidante frente a la xantina oxidasa y a la peroxidasa (Schlegel *et al.*, 2003b).

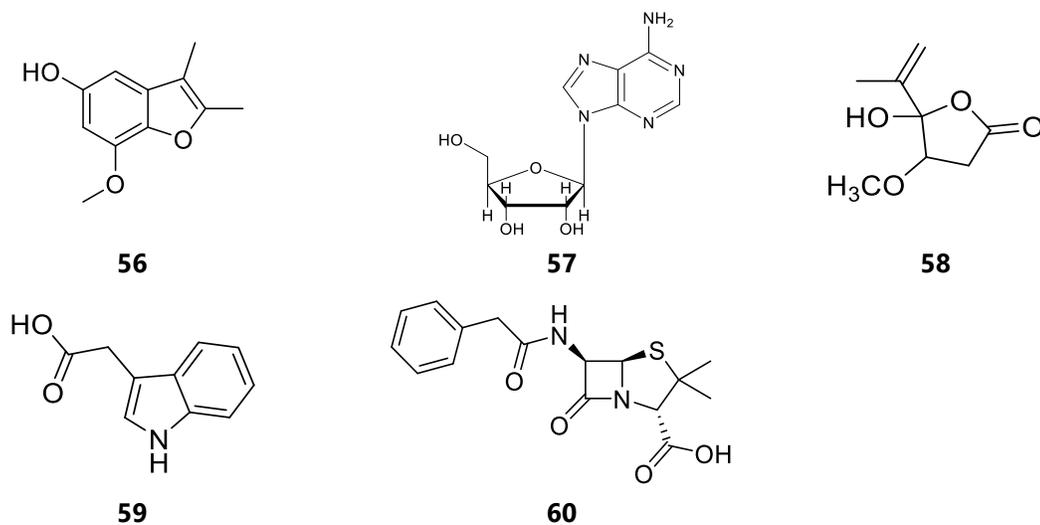


Figura 18. Metabolitos varios del género *Malbranchea*.

Otros productos aislados del género incluyen: el producto antiplaquetario adenosina (**57**), aislado de *M. filamentosa* (Moriyama *et al.*, 2009); el ácido penicílico (**58**), con propiedades fitotóxicas aislado de *M. aurantiaca* (Martínez-Luis *et al.*, 2005); y el ácido indol acético (**59**) obtenido de *M. sulfurea* (Sujatha *et al.*, 2002), mostrados en la **Figura 18**.

También se ha reportado la presencia de antibióticos péptidicos en *M. sulfurea*, como la penicilina G (**60**) y las malbranchinas A y B. Aunque la estructura de estos compuestos aún no se determina, los autores describieron que la malbranchina A es un péptido cíclico compuesto por valina, leucina, alanina y glicina, y que esta es activa frente a bacterias Gram positivas (Premabai & Narasimharao, 1966).

Además de los metabolitos secundarios antes indicados, el género *Malbranchea* es también relevante como fuente de enzimas con varias aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, *M. flava* produce xylanasas termoestables (Sharma *et al.*, 2010), y *M. cinnamomea* produce lipasas de triacilglicerol regioselectivas (Tong *et al.*, 2015), liquenasas (Yang *et al.*, 2014), glicosilhidrolasas, liasas de polisacáridos, esterasas de carbohidratos (Mahahan *et al.*, 2016) y α -amilasas (Han *et al.*, 2013).

1.6 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE *MALBRANCHEA FLAVOROSEA*

Malbranchea flavorosea fue incorporada al género *Malbranchea* en 1976; la especie se caracteriza por presentar artroconidios desarrollados en ramas laterales cortas, ligeramente curvadas o arqueadas, y por no poseer ascosporas. El epíteto específico deriva de la coloración rosa que se observa en el centro del micelio (Sigler & Carmichael, 1976).

Un estudio reciente de la especie permitió el aislamiento y caracterización de siete compuestos mayoritarios (**Figura 19**). Estos fueron aislados de un extracto preparado a partir del medio de cultivo sólido a base de arroz. Cinco de estos productos, las masarigeninas B (**61**) y C (**62**), el clavatol (**63**), los xylarinoles A (**64**) y B (**65**), resultaron conocidos en la naturaleza, pero nuevos en el género *Malbranchea*. Los otros dos, 8-cloroxylarinol A (**66**) y flavorroseósido (**67**), fueron entidades químicas nuevas (Verástegui-Omaña *et al.*, 2017; Rebollar-Ramos, 2016).

La elucidación estructural de los compuestos se realizó a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos; en el caso de los compuestos **62**, **66** y **67**, las estructuras se corroboraron inequívocamente mediante un análisis por difracción de rayos X.

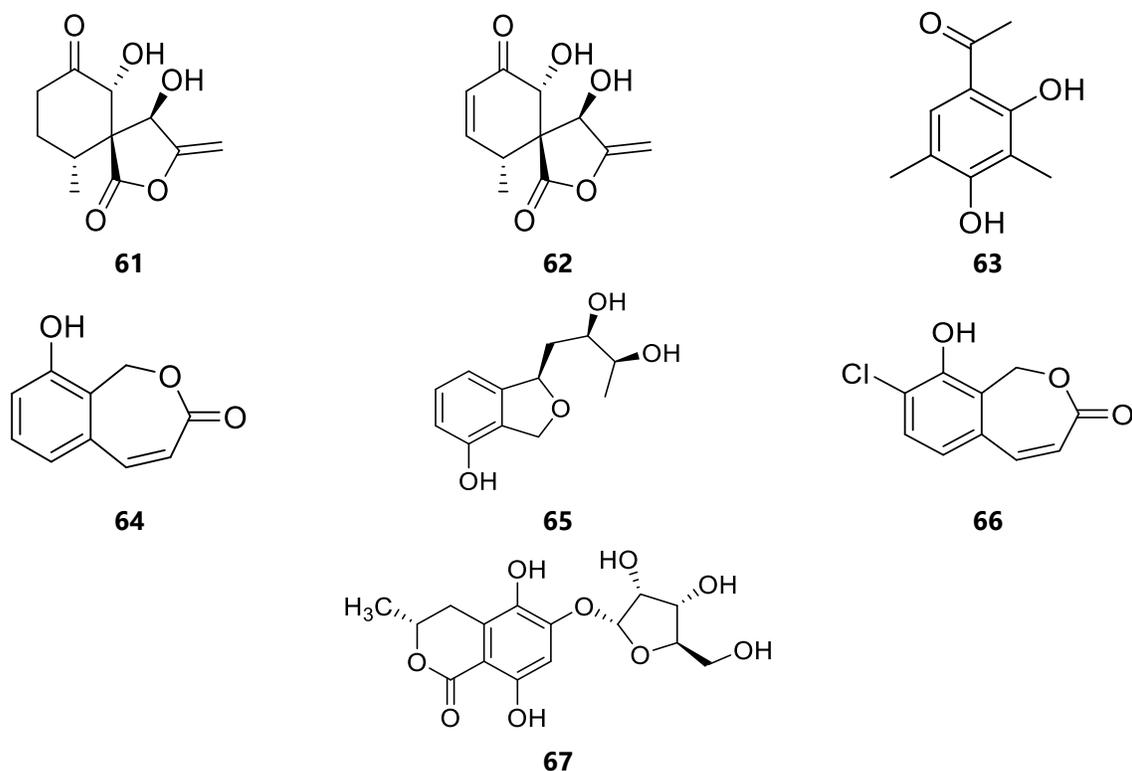


Figura 19. Metabolitos previamente aislados de *M. flavorosea*.

El extracto orgánico del micelio del hongo fue evaluado contra las enzimas α -glucosidasas de *S. cerevisiae*, obteniéndose una CI_{50} de 500 ppm. Los productos **62**, **64** y **65** también presentaron actividad frente a la enzima, los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Actividad frente α -glucosidasas de metabolitos de *M. flavorosea*

| Compuesto | CI_{50} (mM) |
|-----------|------------------|
| 62 | 1.25 \pm 0.015 |
| 64 | 1.07 \pm 0.01 |
| 65 | 2.25 \pm 0.012 |
| Acarbosa | 0.50 \pm 0.014 |

El compuesto **62** fue evaluado *in vivo*, empleando una curva de tolerancia a la sacarosa en un modelo animal. En las concentraciones evaluadas, se observó el abatimiento del pico postprandial tanto en ratones normoglucémicos como en los hiperglucémicos; la actividad fue equiparable a la del control positivo (acarbosa).

2 JUSTIFICACIÓN

Como se indicó en la sección de antecedentes, la DT2 representa una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad a nivel global. Por ello la búsqueda de nuevos agentes antidiabéticos más eficaces y con menos efectos adversos a los de uso actual se encuentra plenamente justificada. En el caso particular de los inhibidores de α -glucosidasas, las causas más importantes que han estimulado la búsqueda de nuevos productos son las siguientes:

- i. Los pacientes diabéticos pueden desarrollar resistencia a los fármacos existentes.
- ii. La acarbose provoca problemas gastrointestinales (flatulencia, diarreas, dolor abdominal, náuseas y vómitos). Estos efectos son dosis-, tiempo- y dieta-dependientes.
- iii. El miglitol tiene como desventaja que se absorbe.
- iv. Finalmente, estos fármacos son costosos ya que es necesario administrarlos tres veces al día.

En este contexto, durante la investigación previa se demostró que la especie *Malbranchea flavorosea* es una fuente de compuestos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. En esa primera investigación, como se indicó en la sección de antecedentes, fue posible aislar solo los metabolitos mayoritarios. Por lo tanto, es factible encontrar otros metabolitos minoritarios que pudiesen exhibir mejores características como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas que los actualmente utilizados.

3 HIPÓTESIS

Los efectos inhibitorios de extractos preparados a partir del medio de cultivo sólido a base de arroz de *M. flavorosea* contra α -glucosidasas de diferentes orígenes permiten predecir que el hongo biosintetiza inhibidores de α -glucosidasas susceptibles a ser aislados y caracterizados química y biológicamente. Es posible que los metabolitos minoritarios sean compuestos más potentes a los ya aislados previamente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Reinvestigar los extractos preparados a partir del medio de cultivo sólido a base de arroz de *M. flavorosea* con el propósito de identificar y caracterizar nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

4.2 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 la enzima α -glucosidasa de *Ruminococcus obeum*.
- ☒ Obtener el extracto crudo y proceder al aislamiento y purificación de los metabolitos activos, 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.
- ☒ 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.
- ☒ Realizar estudios de acoplamiento y dinámica molecular para predecir los posibles sitios de unión de los principios activos puros, con la finalidad de complementar los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL FÚNGICO

El hongo *Malbranchea flavorosea* Sigler et Carmichael (**Figura 20**) fue obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC No. 34529).

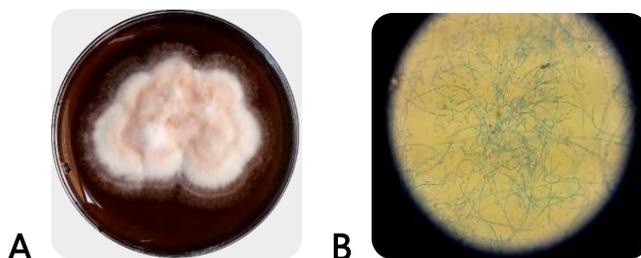


Figura 20. *Malbranchea flavorosea*. A) Micelio, B) Vista microscópica, 40x, técnica de impronta, tinción con azul de metileno.

5.2 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 por sus siglas en inglés); 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 (3:7).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia en modo preparativo se realizó en un cromatógrafo Waters equipado con una bomba 2535 y un detector PDA 2998, empleando una columna Gemini

5 μm C18 110Å AXIA (21.20 x 250 mm) o bien, una columna Kinetex 5 μm C18 100Å AXIA Pack (21.20 x 250 mm), y un gradiente de elución de ácido fórmico acuoso y acetonitrilo, con un flujo de 21.24 ml/min.

5.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS

Los espectros en el IR se obtuvieron por la técnica de reflectancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400. El análisis de espectrometría de masas se realizó en un equipo Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC. 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).

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H , 700 MHz) y de carbono (RMN- ^{13}C , 175 MHz) se registraron en un equipo Bruker AVANCE III HD, equipado con una criosonda TCI de 5 mm o en un equipo Varian, utilizando CD_3OD o $\text{DMSO}-d_6$ como disolvente y tetrametilsilano como estándar interno.

5.4 ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPECIE FÚNGICA *MALBRANCHEA FLAVOROSEA*

5.4.1 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 naturales de acuerdo con la estación. El medio de cultivo empleado consistió en una mezcla 1:1 de 84 g de arroz blanco e integral en 200 ml de agua destilada. En total se utilizaron 420 gramos de la mezcla repartidas en cinco matraces Erlenmeyer de 500 ml.

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

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, el medio de cultivo se maceró con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (8:2); posteriormente el extracto se filtró y trató con sulfato de sodio anhidro. Al concentrar al vacío 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 de composición.

5.4.3 Fraccionamiento del extracto orgánico de *M. flavorosea*

El extracto seco fue resuspendido en una mezcla de MeCN-MeOH y sometido a un proceso de reparto con hexano, para generar dos fracciones primarias, la fase hexánica y la fase polar. Ambas fracciones se trataron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío.

El extracto libre de grasa (fase MeCN-MeOH) se fraccionó utilizando un cromatógrafo tipo flash con un sistema de elución entre mezclas de hexano-CHCl₃, CHCl₃ y mezclas de CHCl₃-MeOH. De este fraccionamiento secundario se obtuvieron 191 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo con su homogeneidad cromatográfica en 10 fracciones secundarias. En la **Tabla 4** se muestra el resumen del fraccionamiento secundario del extracto desgrasado, así como los nombres clave de las fracciones secundarias.

Tabla 4. Reunión de las fracciones secundarias del fraccionamiento del extracto desgrasado

| Fracciones combinadas | Clave de la fracción |
|-----------------------|----------------------|
| 1-62 | AE |
| 63-102 | F |
| 103-130 | GI |
| 115-123 | H |
| 131-139 | JK |
| 140-146 | L |
| 147-154 | MN |
| 155-157 | O |
| 158-168 | PS |
| 169-191 | T |

5.4.3.1 Fraccionamiento terciario de la fracción L

La fracción L (540 mg) se fraccionó en un cromatógrafo tipo flash utilizando un gradiente de elución de CHCl₃, CHCl₃-AcOEt y AcOEt-MeOH. Como resultado de este proceso se obtuvieron 7 fracciones cuaternarias: L1 (6 mg), L2 (42 mg), L3 (121 mg), L4 (27 mg), L5 (87 mg), L6 (32 mg) y L7 (41 mg).

Las fracciones L3 y L5 fueron seleccionadas para su fraccionamiento posterior debido al alto rendimiento obtenido y a la composición química observada por CCD.

5.4.3.1.1 Fraccionamiento cuaternario de la fracción L3

Con el objetivo de simplificar la fracción L3, ésta fue sometida a un fraccionamiento en columna de Sephadex con una fase móvil de CH₂Cl₂-MeOH (3:7). De este proceso resultaron cuatro fracciones: L3a (7.3 mg), L3b (7.2 mg), L3c (76 mg) y L3d (9.6 mg).

5.4.3.1.1.1 Fraccionamiento de la fracción L3d

La fracción L3d fue separada a través de una cromatografía de líquidos de alta eficiencia, utilizando una columna Kinetex, con un sistema de elución 90:10 H₂O, 0.1% A.F.-MeCN isocrático por 5 minutos y después gradiente a 85:15 H₂O, 0.1% A.F.-MeCN en 15 minutos.

De este proceso se obtuvo el compuesto rosigenina (**68**, 8 mg, t_R 10.10 min).

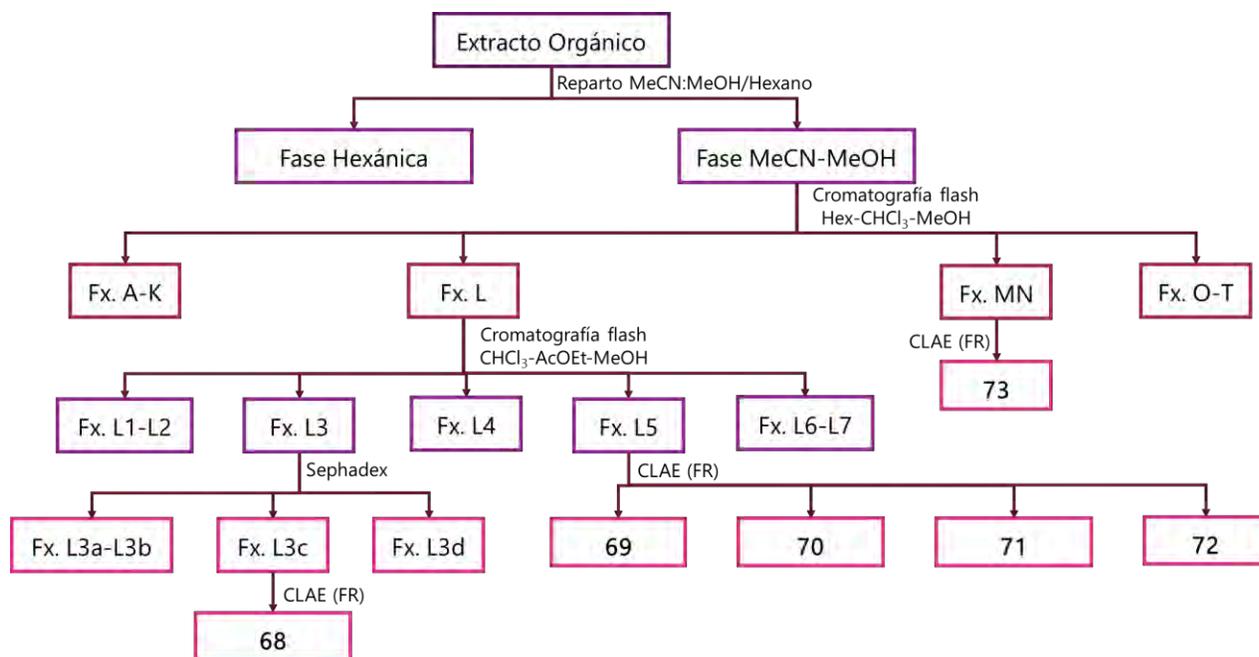
5.4.3.1.2 Fraccionamiento cuaternario de la fracción L5

La fracción L27 fue separada mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia, empleando una columna Gemini, utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad creciente de 80:20 H₂O, 0.1% A.F.-MeCN a 0:100 MeCN en 20 minutos. De este fraccionamiento se obtuvieron cuatro compuestos: riboxylarinol B (**69**, t_R 5.46 min, 1.1 mg), massarilactona B (**70**, t_R 6.16 min, 4.5 mg), flavorroseósido B (**71**, t_R 8.56 min, 1 mg) y (S)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**, t_R 10.53 min, 3 mg).

5.4.3.2 Fraccionamiento de la fracción MN

La baja complejidad de la fracción MN permitió su rápida resolución por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, empleando una columna Gemini, con una fase móvil de 90:10 H₂O, 0.1% A.F.-MeCN a 0:100 MeCN en 25 minutos. De este fraccionamiento se obtuvieron dos compuestos, masarigenina C (**62**, t_R 8.11 min, 25 mg) y 4-hidroxi-2-O- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**, t_R 10.11 min, 4 mg).

En el **Esquema 1** se muestra un resumen de la obtención de los metabolitos secundarios **68-73**.



Esquema 1. Diagrama del fraccionamiento del extracto orgánico del extracto de *M. flavorosea*.

5.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ASILADOS COMO INHIBIDORES DE LAS α -GLUCOSIDASAS

5.5.1 Obtención de la enzima recombinante de *Ruminococcus obeum*

La enzima empleada para los ensayos enzimáticos fue la α -glucosidasa de *R. obeum*, recientemente reclasificada como *Blautia obeum* (Lawson & Finegold, 2015), la cual fue expresada en *Escherichia coli* y purificada mediante técnicas clásicas de biología molecular. Esta enzima fue proporcionada por el Dr. Martín González Andrade.

5.5.2 Evaluación enzimática de los compuestos como inhibidores de las α -glucosidasas

La evaluación de los productos puros sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de *R. obeum* 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 buffer de fosfatos (25 mM, pH=7) con 20% de DMSO de los compuestos puros a una concentración de 30 mM, así como el control positivo, acarbosa a una concentración de 10 mM en buffer. En cada pozo se colocó buffer de fosfatos, alícuotas crecientes de 0-20 μ l del compuesto de prueba (inhibidor) y 5 μ l de enzima de *R. obeum* (5.2 mg/ml). La placa se incubó durante 10 minutos a 37°C; posteriormente se adicionaron 10 μ l de sustrato [α -D-

glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG)] a una concentración de 20 mM. A continuación, se tomó la lectura al tiempo cero, e inmediatamente la placa con la mezcla de reacción se incubó 3 horas a 37°C. Al término de este tiempo se registró la lectura final.

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

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \frac{A_{fp} - A_{ip}}{A_{fc} - A_{ic}} \right] \cdot 100$$

Donde A_{fp} (pozo de prueba) corresponde al valor de absorbancia final (180 minutos), A_{ip} al valor de absorbancia al tiempo cero de cada muestra y A_{fc} y A_{ic} a las absorbancias correspondientes del control (pozo sin inhibidor).

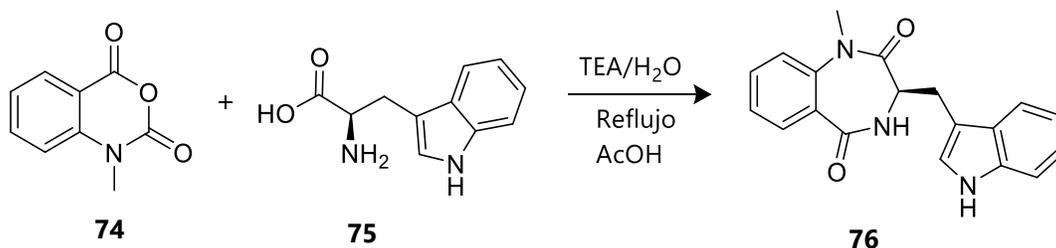
Los datos obtenidos de fueron procesados con Origin 9 para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) mediante una regresión no lineal utilizando la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{CI_{50}} \right)^s}$$

Donde A_{100} es el porcentaje máximo de inhibición, I es la concentración de inhibidor (sustancia de prueba), CI_{50} es la concentración inhibitoria media y, s el grado de cooperatividad (Copeland, 2000).

5.6 SÍNTESIS DEL COMPUESTO 76

Como se abordará en la parte de resultados, el objetivo de la síntesis del compuesto **76** fue evaluar un análogo del producto natural **72** frente a la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*. El **Esquema 2** muestra la reacción empleada para la síntesis del compuesto **76**.



Esquema 2. Síntesis del compuesto **76**.

En un matraz bola de 200 ml provisto con una parrilla de agitación magnética, se adicionaron 550 mg de anhídrido *N*-metilisatóico (2.8 mmol) (**74**), 580 mg de D-triptófano (2.8 mmol) (**75**), 500 μ l de trietilamina y 8 ml de agua destilada. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. Al término de este tiempo, la mezcla fue concentrada al vacío. Enseguida, se adicionaron 6 ml de ácido acético glacial y la solución fue sometida a reflujo durante 8 horas. Una vez concluido el reflujo, el disolvente fue removido al vacío. El residuo se restituyó en AcOEt y a continuación se realizó un reparto con agua. La fase orgánica se lavó con una solución de NaHCO₃ y posteriormente con agua (10 ml \times 3); a continuación, se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El residuo resultante se lavó con AcOEt y posteriormente se disolvió en 30 ml de MeOH; de esta solución cristalizaron de forma espontánea 360 mg de **76**.

5.7 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO Y DINÁMICA MOLECULAR

Para los estudios de acoplamiento y dinámica molecular se utilizó como blanco molecular la estructura de la enzima de *R. obeum* (PDB: 3PHA), y como ligandos, acarbosa (control positivo) y los compuestos **72** y **76**. Las estructuras se construyeron con el programa HyperChem 8 y la minimización energética se realizó con el programa Gaussian 09 con un nivel de teoría de DFT B3LYP/3-21G. Las estructuras de la enzima y de los compuestos fueron preparados con AutoDockTools 1.4.5.

La predicción de las posibles conformaciones de los complejos enzima-ligando se realizó con el programa AutoDock 4.2 mediante un algoritmo genético lamarckiano. Primero, se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego utilizando un tamaño de caja electrostática de 126 Å \times 126 Å \times 126 Å en los ejes x, y, z, respectivamente. Posteriormente, se refinó el análisis de acoplamiento con una caja más pequeña de 60 Å \times 60 Å \times 60 Å, centrada en el sitio de unión del ligado. Los cálculos se realizaron en una población de 25 000 individuos con 2000 corridas. El acoplamiento fue analizado con AutoDockTools y la visualización del mismo se realizó en los programas PyMOL y LigPlot+.

A partir de los resultados del estudio de acoplamiento molecular, se seleccionaron los complejos enzima-ligando de menor energía y se procesaron en la plataforma *antechamber* para generar las topologías adecuadas para el módulo LeaP de AMBER. A cada estructura y complejo se le

adicionaron los hidrógenos restantes empleando el módulo LeaP con el parámetro parm99, algunos iones Na⁺ para la neutralización de cargas y finalmente, los complejos fueron solvatados en una caja octaédrica que utiliza un modelo de aguas tipo TIP3P.

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo a 1 atm y 298 K, durante 20 ns. Se monitorizó la energía total del sistema durante la simulación y se calculó la desviación media cuadrática de los desplazamientos (RMSD) de los carbonos alfa del sistema. Finalmente, se calcularon las energías libres de unión por mecánica molecular.

Estos estudios *in silico* se realizaron en colaboración con el Dr. Martín González Andrade.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sección de resultados está dividida en tres partes. La primera, se enfoca en el aislamiento e identificación de los metabolitos que biosintetiza *M. flavorosea* en las condiciones de cultivo utilizadas. La segunda sección, describe la actividad biológica de estos compuestos frente a la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*. Finalmente, la tercera parte describe los estudios *in silico* que se llevaron a cabo como complemento a la actividad observada en los estudios *in vitro*.

6.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS 68-73

El extracto orgánico total obtenido del medio de fermentación a base de grano de arroz fue desgrasado con el objetivo de eliminar todos los componentes de naturaleza lipídica presentes, en su mayoría triglicéridos y ácidos grasos provenientes del medio. El extracto desgrasado se sometió a diversos procesos cromatográficos con la finalidad de aislar los metabolitos minoritarios detectados en el estudio anterior (Verástegui-Omaña *et al.*, 2017). Cabe mencionar que los metabolitos previamente aislados fueron ubicados cromatográficamente en cinco de las fracciones secundarias (GI, H, JK, O y PS) derivadas del fraccionamiento del extracto desgrasado. Los metabolitos nuevos para la especie se aislaron de las fracciones intermedias L y MN (**Tabla 5**).

Tabla 5. Identificación de metabolitos previamente aislados en las fracciones secundarias

| Clave de la fracción | Metabolitos identificados |
|----------------------|---|
| GI | 8-cloro xylarinol A (66) |
| H | Xylarinol A (64) Masarigenina B (61) |
| JK | Masarigenina C (62) Rosigenina (68) Ribo-xylarinol B (69) |
| L | Masarilactona B (70) Flavorroseósido B (71) (S)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (72) |
| MN | 4-hidroxi-2-O- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (73) |
| O | Arabino-xylarinol B (65) Flavorroseósido (67) |
| PS | Clavatol (63) |

De las fracciones L y MN se obtuvieron los siguientes productos: rosigenina (**68**), *ribo*-xyларinol B (**69**), masarilactona B (**70**), flavorroseósido B (**71**), (*S*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**) y 4-hidroxi-2-*O*- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**). Las estructuras de estos productos se muestran en la **Figura 21**. En los siguientes apartados se explica la caracterización de cada uno de los compuestos.

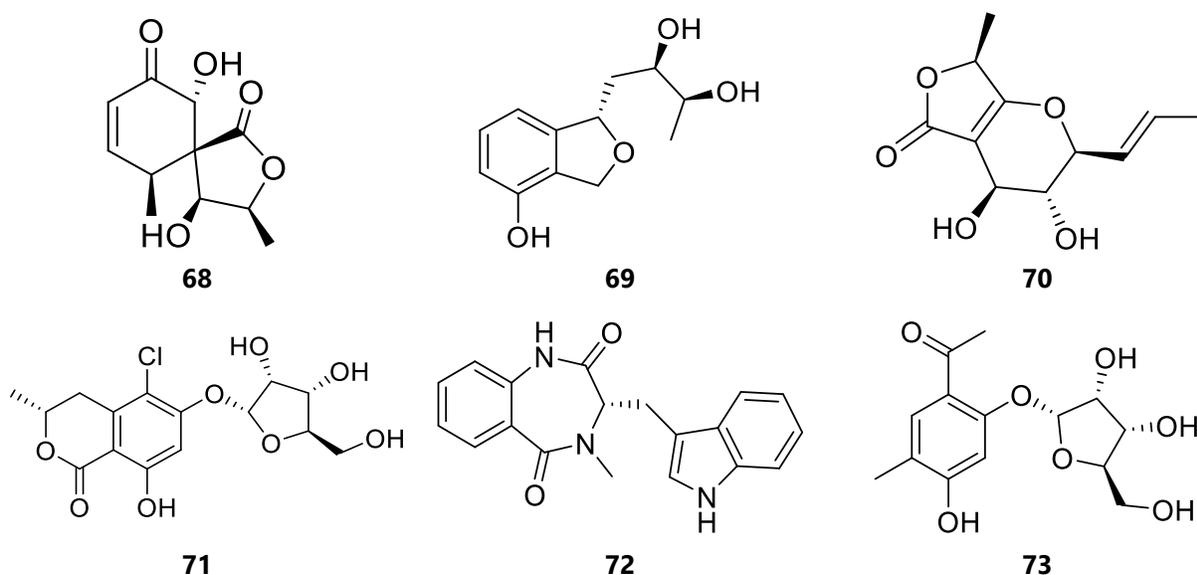


Figura 21. Metabolitos aislados de *M. flavorosea* en el presente estudio.

6.2 FLAVORROSEÓSIDO B (71)

El compuesto **71** fue aislado como un sólido vítreo. Su fórmula molecular fue establecida mediante espectrometría de masas como $C_{15}H_{17}O_8Cl$. La presencia del átomo de cloro fue determinada por la abundancia relativa del pico $[M+H]^{+2}$ respecto al ion molecular $[M+H]^+$. El espectro en el IR mostró señales características de un carbonilo quelatado (1664 cm^{-1}) y un grupo fenol (1241 cm^{-1}). En la **Tabla 6** se muestra un resumen de las propiedades fisicoquímicas del flavorroseósido B.

Tabla 6. Constantes espectroscópicas del compuesto **71**

| | |
|------------------------|--|
| Fórmula Molecular | $C_{15}H_{17}O_8Cl$ |
| Peso Molecular | 360 g/mol |
| Rotación óptica | $[\alpha]_D^{20} = +164.5^\circ$ ($c=0.1$, MeOH) |
| UV (λ_{max}) | 208.6, 261.8, 312.9 nm |
| IR | 3363, 1664, 1614, 1241 cm^{-1} |
| EM | m/z $[M+H]^+ = 361.0684$ |

Los espectros de RMN-¹³C de **71** presentan señales cuyos desplazamientos químicos resultan muy similares a aquellos del flavorroseósido (**67**), compuesto aislado previamente de este hongo (**Figura 22**) (Verástegui-Omaña *et al.*, 2017). Así, los espectros presentaron las señales características de un residuo de ribofuranosa [δ_H/δ_C 5.75 (H-1')/102.2 (C-1'); 4.26 (H-2')/72.9 (C-2'); 4.12 (H-3')/ 70.3 (C-3'); 4.17 (H-4')/ 88.2 (C-4'); 3.68 (H-5'a), 3.64 (H-5'b)/62.5 (C-5')], un carbonilo, un anillo aromático, un metilo, un metileno bencílico y un metino unido a un oxígeno. La única diferencia entre los espectros del compuesto **71** y el flavorroseósido (**67**), radica en el desplazamiento químico de C-5 que en **71** aparece en δ_C 113.3 y en **67** en δ_C 149.1; esta diferencia es consistente con la presencia de un cloro en C-5 en lugar del grupo hidroxilo presente en el metabolito **67**.

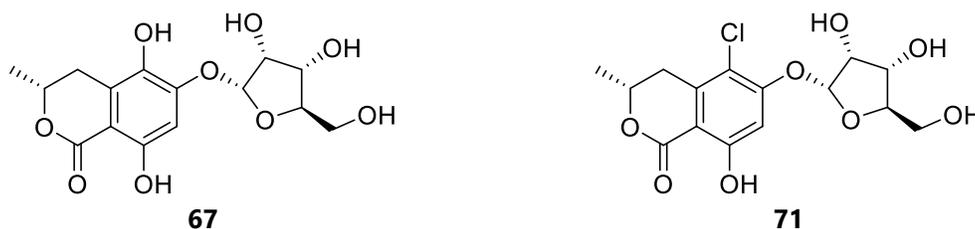


Figura 22. Flavorroseósido (**67**) y flavorroseósido B (**71**).

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para el flavorroseósido B (**71**) en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz)

| Posición | δ_C | δ_H (J en Hz) |
|-----------|------------|---|
| 1 | 170.5 | - |
| 3 | 76.1 | 4.69 qdd (3.3, 6.3, 11.5) |
| 4 | 32.7 | 2.79 dd (11.4, 16.9) 3.29 dd (3.3, 16.9) |
| 5 | 113.3 | - |
| 6 | 159.7 | - |
| 7 | 103.4 | 6.82 s |
| 8 | 163.2 | - |
| 9 | 20.4 | 1.51 d (6.31) |
| 10 | 139.4 | - |
| 11 | 103.6 | - |
| 1' | 102.2 | 5.75 d (4.4) |
| 2' | 72.9 | 4.26 dd (4.4, 6.4) |
| 3' | 70.3 | 4.12 dd (2.8, 6.4) |
| 4' | 88.2 | 4.17 dd (3.4, 6.5) |
| 5' | 62.5 | 3.64 dd (3.7, 12.2) 3.68 dd (3.4, 12.2) |

La asignación correcta de la estructura fue corroborada mediante las correlaciones observadas a través de los experimentos HMBC y COSY (**Figura 23**).

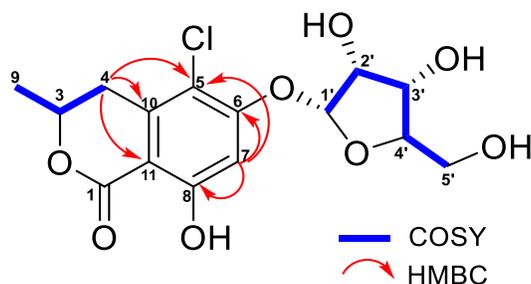


Figura 23. Correlaciones clave para la elucidación estructural del compuesto **71**.

El análisis por dicroísmo circular del compuesto **71** resulto idéntico al del compuesto **67** (**Figura 24**), por lo que se infiere que la configuración absoluta del centro estereogénico de la aglicona es la misma que la del compuesto **71**. Asimismo, en términos biogénéticos la pentosa de ambos productos debe ser la misma.

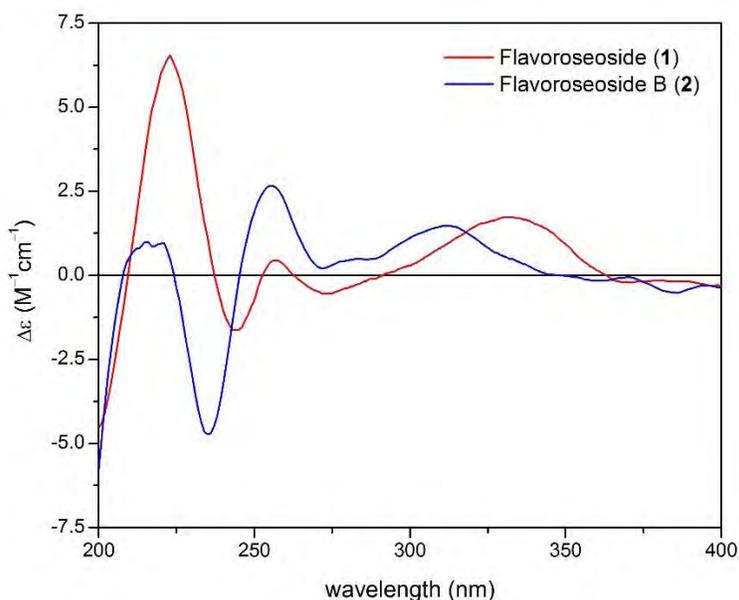


Figura 24. Dicroísmo circular comparativo del flavorroseósido B (**71**) y el flavorroseósido (**67**).

6.3 4-HIDROXI-2-*O*- α -RIBOFURANOSIL-5-METILACETOFENONA (**73**)

El compuesto **73** fue aislado como un sólido vítreo color café. Su fórmula molecular fue determinada por espectrometría de masas como $C_{14}H_{18}O_7$. La información espectroscópica se describe en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Constantes espectroscópicas del compuesto **73**

| | |
|-----------------------------|---|
| <i>Fórmula Molecular</i> | C ₁₄ H ₁₈ O ₇ |
| <i>Peso Molecular</i> | 298 g/mol |
| <i>Rotación óptica</i> | [α] _D ²⁰ = +75.3° (c=0.1, MeOH) |
| <i>UV (λ_{max})</i> | 194.5, 231.0, 272.4, 326.0 nm |
| <i>IR</i> | 3407, 2925, 1633, 1264, 1043 cm ⁻¹ |
| <i>EM</i> | m/z [M+H] ⁺ = 299.11305 |

El espectro de RMN-¹³C mostró señales para catorce carbonos (**Tabla 9**), de los cuales se identificó rápidamente un residuo de ribofuranosa de acuerdo con los desplazamientos ya observados para el compuesto **71** [δ_H/δ_C 5.72 (H-1')/101.7 (C-1'); 4.25 (H-2')/73.4 (C-2'); 4.13 (H-3')/ 70.9 (C-3'); 4.13 (H-4')/ 88.1 (C-4'); 3.72 (H-5'a), 3.67 (H-5'b)/63.1 (C-5')]. Las señales restantes correspondían a seis carbonos aromáticos, un metilo unido a un anillo aromático [δ_H/δ_C 2.22/15.8 (H-9/C-9) y una metilcetona conjugada [δ_C 204.7 (C-7) y δ_H/δ_C 2.57/26.5 (H-8/C-8)].

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para 4-hidroxi-2-O-α-ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**) en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz)

| Posición | δ _C | δ _H (J in Hz) |
|-----------|----------------|--|
| 1 | 115.2 | - |
| 2 | 163.3 | - |
| 3 | 103.5 | 6.69 s |
| 4 | 164.1 | - |
| 5 | 120.5 | - |
| 6 | 133.5 | 7.64 d (1.1) |
| 7 | 204.7 | - |
| 8 | 26.5 | 2.57 s |
| 9 | 15.8 | 2.22 d (0.8) |
| 1' | 101.7 | 5.72 d (4.4) |
| 2' | 73.4 | 4.25 ddd (2.2, 4.4, 6.2) |
| 3' | 70.9 | 4.13 m |
| 4' | 88.1 | 4.13 m |
| 5' | 63.1 | 3.67 dd (3.5, 12.1) 3.72 dd (3.2, 12.2) |

El arreglo de los sustituyentes en **73** se determinó por las correlaciones HMBC de los protones H-6 (δ_H 7.64), H-3 (δ_H 6.69) y H-9. La ubicación del residuo de ribofuranosa se determinó por la correlación del protón anomérico H-1' (δ_H 5.72) con C-2 (δ_C 163.3) (**Figura 25**). La rotación óptica para este compuesto fue positiva, en concordancia con la rotación óptica para un residuo de α-D-ribofuranosa.

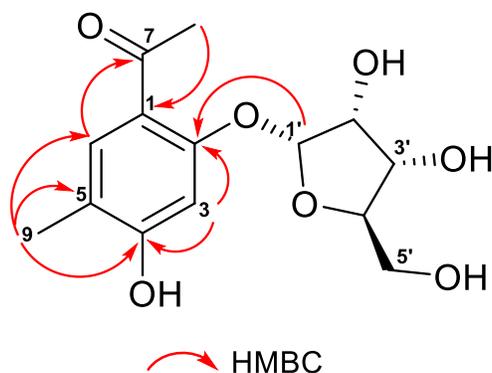


Figura 25. Correlaciones clave para la asignación estructural del compuesto **73**.

6.4 (*S*)-3,4-DIHIDRO-3-(1*H*-INDOL-3-ILMETIL)-4-METIL-1*H*-1,4-BENZODIAZEPIN-2,5-DIONA (**72**)

El compuesto **72** fue aislado como un sólido blanco. Su fórmula molecular se determinó como $C_{19}H_{17}O_2N_3$ mediante espectrometría de masas de alta resolución. El espectro en el IR mostró bandas características de un grupo amida y un grupo fenilo (1683 y 1619 cm^{-1}). Las propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas del compuesto **72** se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Constantes espectroscópicas del compuesto **72**

| | |
|------------------------|---|
| Fórmula Molecular | $C_{19}H_{17}O_2N_3$ |
| Peso Molecular | 319 g/mol |
| Rotación óptica | $[\alpha]_D^{20} = -57.7^\circ$ ($c=0.1$, MeOH) |
| UV (λ_{max}) | 214.5, 281.9 nm |
| IR | $3229, 1683, 1619, 739\text{ cm}^{-1}$ |
| EM | $m/z [M+H]^+ = 320.13986$ |

El espectro de RMN- ^{13}C efectuado a temperatura ambiente mostró 38 señales, en lugar de las 19 señales esperadas de acuerdo con su fórmula molecular. De la misma forma, en el espectro de RMN- 1H las señales aparecieron por pares, en una relación aproximadamente de 1:1. Sin embargo, cuando se registró el espectro de RMN- 1H a $50^\circ C$ y con $DMSO-d_6$ como disolvente, los dos conjuntos de señales colapsaron para generar uno solamente (**Figura S18**). En consecuencia, el compuesto **72** es una mezcla de dos conforméros (**72a/72b**) estables a temperatura ambiente cuya barrera energética de interconversión es mayor que el tiempo de adquisición de los espectros de RMN (**Figura 26**).

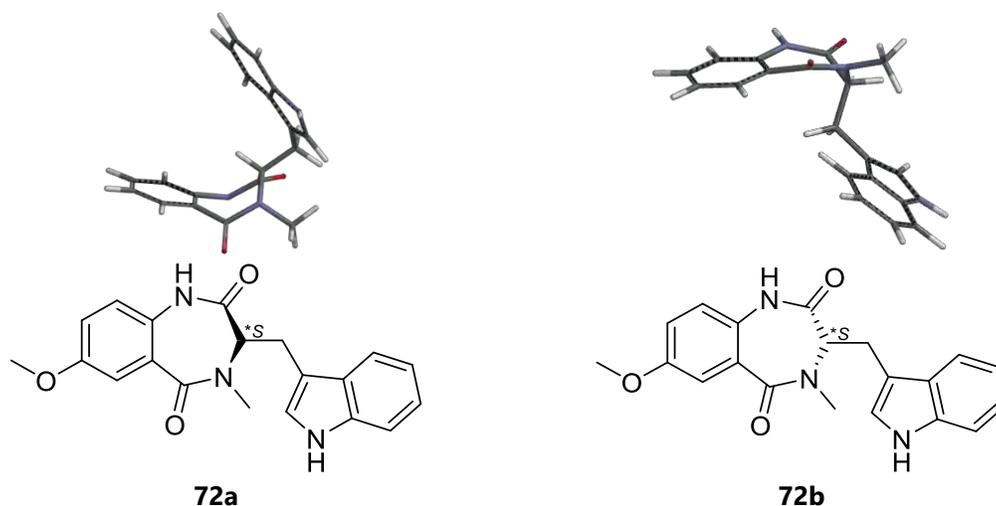


Figura 26. Confórmeros del compuesto **72**.

El análisis comparativo de los datos espectroscópicos del compuesto **72a/72b** con los datos de la 7-metoxiciclopeptina (**77a/77b**) (Pan *et al.*, 2017) (**Tabla 11**) indicó que el compuesto **72** es un dipéptido del tipo de las benzodiazepin-2,5-dionas derivado del ácido antranílico y del triptófano. Las principales diferencias respecto a **77** son la naturaleza de los aminoácidos. Así, los residuos fenilalanina y ácido 3-metoxiantranílico en **77** se encuentran sustituidos por triptófano y ácido antranílico en **72**, respectivamente (**Figura 27**).

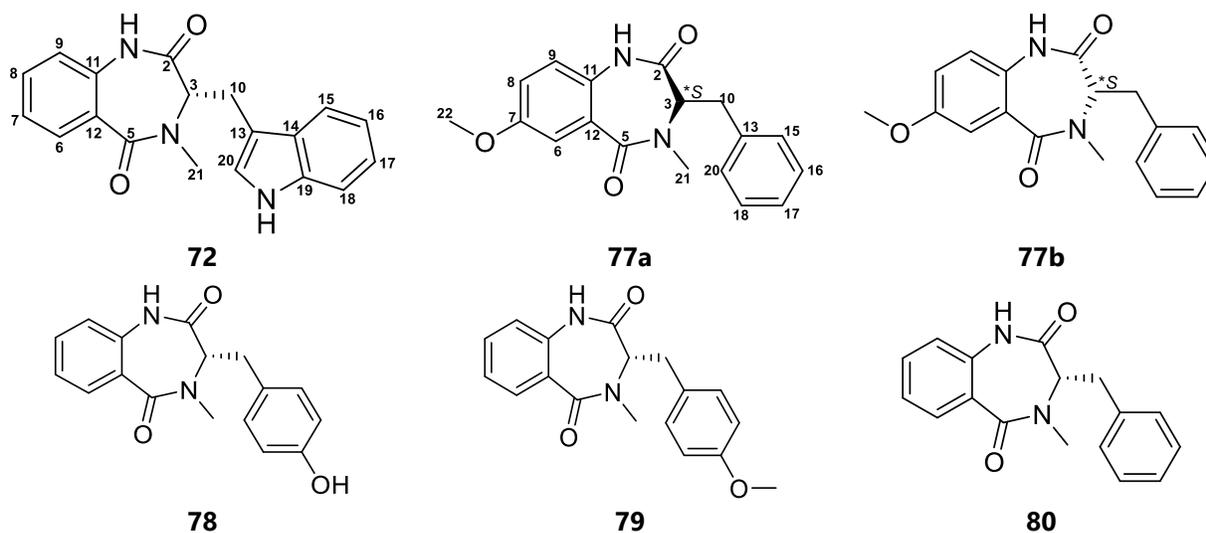


Figura 27. Ciclopeptinas.

Al igual que en el caso de **72** y la 7-metoxiciclopeptina (**77**), otras benzodiazepin-2,5-dionas como la 14-hidroxiciclopeptina (**78**) (Zhou *et al.*, 2016) y 4'-metoxiciclopeptina (**79**) (Kusano *et al.*, 2000) existen como dos confórmeros estables a temperatura ambiente (**Figura 27**).

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para el (*S*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**) y la 7-metoxiciclopeptina (**77**)

| Posición | Tipo | 72a | | 72b | | 77a | | 77b | |
|----------|------------------|------------|--------------------|------------|---|------------|--------------------|------------|------------------|
| | | δ_c | δ_H | δ_c | δ_H | δ_c | δ_H | δ_c | δ_H |
| 2 | C | 171.7 | | 173.1 | | 171.2 | | 172.2 | |
| 3 | CH | 57.1 | 4.52 t (7.6) | 69.1 | 4.46 dd (6.8, 10.4) | 58.0 | 4.43 t | 70.1 | 4.3 dd |
| 5 | C | 170.8 | | 168.3 | | 170.6 | | 168.2 | |
| 6 | CH | 131.7 | 7.84 d (7.7) | 132.4 | 8 d (7.7) | 114.8 | 7.32 d | 115.4 | 7.45 d |
| 7 | CH | 133.7 | 7.53 t (7.5) | 134.1 | 7.63 t (7.4) | 158.3 | | 158.3 | |
| 8 | CH | 125.9 | 7.29 t (7.6) | 125.8 | 7.38 t (7.6) | 121.1 | 7.11 d | 121.2 | 7.2 m |
| 9 | CH | 122.1 | 7.1 dt (6.5, 12.7) | 121.6 | 7.2 d (8.1) | 123.8 | 7.02 d | 123.5 | 7.11 d |
| 10 | CH ₂ | 23.1 | 3.47 dd (5.1, 7.1) | 25.5 | 2.88 dd (10.5, 14.7) 3.02 dd (6.8, 14.6) | 33.1 | 3.25 dd 3.39 dd | 35.3 | 2.7 dd 2.8 dd |
| 11 | C | 128.2 | | 127.7 | | 131.4 | | 130.4 | |
| 12 | C | 137.1 | | 137.9 | | 129.4 | | 130.0 | |
| 13 | C | 110.6 | | 109.7 | | 138.3 | | 137.4 | |
| 14 | C | 128.4 | | 128.1 | | | | | |
| 15 | CH | 118.8 | 7.44 d (7.9) | 118.8 | 7.44 d (7.9) | 130.2 | 7.24 m | 130.2 | 7.05 d |
| 16 | CH | 119.9 | 6.96 t (7.5) | 120.1 | 7.03 t (7.5) | 129.8 | 7.24 m | 130.0 | 7.29 t |
| 17 | CH | 122.7 | 7.07 t (7.5) | 122.6 | 7.1 dt (6.5, 12.7) | 128.0 | 7.20 m | 128.4 | 7.23 m |
| 18 | CH | 112.4 | 7.33 d (8.1) | 112.5 | 7.33 d (8.1) | 129.8 | 7.24 m | 130.0 | 7.29 t |
| 19 | C | 138.1 | | 138.1 | | | | | |
| 20 | CH | 124.1 | 7.05 s | 124.6 | 6.9 s | 130.2 | 7.24 m | 130.2 | 7.05 d |
| 21 | CH ₃ | 29.2 | 3.15 s | 39.8 | 2.91 s | 29.7 | 3.08 s | 40.0 | 2.93 s |
| 22 | OCH ₃ | | | | | 56.3 | 3.84 s | 56.3 | 3.89 s |

La configuración absoluta del centro estereogénico de **72** se determinó con base en el signo la rotación óptica del compuesto. De tal forma, que el valor negativo ($[\alpha]_D^{20} = -57.7^\circ$) indicó que el centro es *S*, en concordancia con los valores de rotación óptica negativos para los compuestos **77-80**, los cuales se biosintetizan a partir de ácido antranílico, L-fenilalanina o L-tirosina (Framm *et al.*, 1973) y que conservan el centro *S* del aminoácido precursor; por lo tanto el compuesto **72** se biosintetiza a partir del L-triptófano, siendo este el primer ejemplo de un metabolito tipo ciclopeptina 4-*N*-metilado que contiene este aminoácido.

Compuestos similares (**Figura 28**) como el producto **81** (Barrow & Sun, 1994) y las asperdiazapionas C (**82**) y D (**83**) (Rukachaisirikul *et al.*, 2013) aislados de *Aspergillus sp.*, contienen un residuo de triptófano, pero al no estar metilados en *N*-4 no presentan atropoisomería.

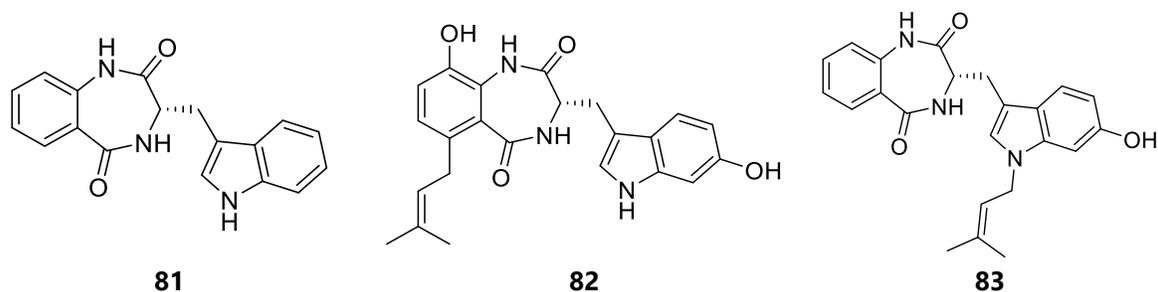
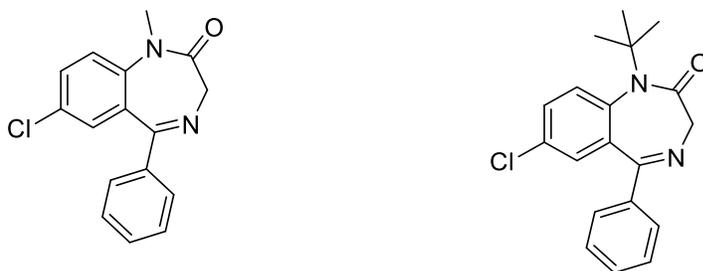


Figura 28. Benzodiazepindionas relacionadas a **72**.

Las benzodiazepindionas sustituidas en *N*-4 así como las benzodiazepinas presentan atropoisomerismo (Blackburn *et al.*, 1997). Los atropoisómeros son un tipo de estereoisómeros caracterizados por un impedimento en la rotación de un enlace sencillo, lo que crea un eje quiral. Mientras que los estereoisómeros clásicos necesitan la ruptura de un enlace para la interconversión de uno con otro, los atropoisómeros solo necesitan la rotación de un enlace para llevar a cabo esa interconversión, la cual es tiempo y temperatura dependiente (Glunz, 2018).

El diazepam (**84**) (**Figura 29**), una de las benzodiazepinas más utilizadas para el tratamiento de ansiedad, presenta el mismo fenómeno que se observa en el compuesto **72**. En cambio, su análogo **85** tiene una barrera de interconversión mayor debido a la sustitución del nitrógeno de la posición 1 con un grupo más voluminoso; así el impedimento estérico confiere mayor estabilidad a cada uno de los atropoisómeros, incluso haciendo posible su separación (Gilman *et al.*, 1990).



Diazepam (**84**)

*N*1-terbutildiazepam (**85**)

Figura 29. Diazepam y su análogo modificado.

Como se disponía del aminoácido *D*-triptófano y anhídrido *N*-metil isatóico, se decidió sintetizar el análogo de **72a/72b** metilado en el nitrógeno 1 y con la configuración *R* en el centro estereogénico. Esto permitiría evaluar un compuesto análogo al producto natural en el mismo bioensayo, aunque con diferente configuración absoluta.

Para ello se aplicó el método descrito por Barrow & Sun (1994) para la síntesis de otras benzodiazepindionas, obteniéndose el producto **76** (**Figura 30**) como un sólido blanco cuyas características físicas y algunas espectroscópicas se resumen en la **Tabla 12**. Cabe mencionar que la síntesis del producto natural no se pudo realizar debido a que la compra de la L-abrina (*N*-metil-L-triptófano) está regulada por la Secretaria de Salud.

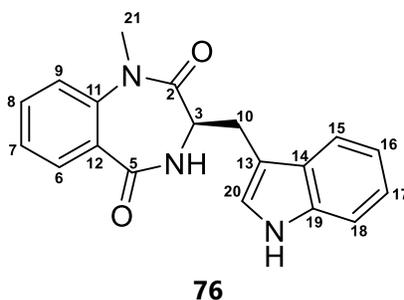


Figura 30. (*R*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-1-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**76**).

Tabla 12. Constantes espectroscópicas del compuesto **76**

| | |
|-----------------------------|---|
| <i>Fórmula Molecular</i> | C ₁₉ H ₁₇ O ₂ N ₃ |
| <i>Peso Molecular</i> | 319 g/mol |
| <i>Punto de fusión</i> | 217-219°C |
| <i>Rotación óptica</i> | [α] _D ²⁰ = -89.92° (c=0.13, MeOH) |
| <i>UV (λ_{max})</i> | 214.5, 281.9 nm |
| <i>IR</i> | 3340, 1650, 1463, 741 cm ⁻¹ |
| <i>EM</i> | <i>m/z</i> [M+H] ⁺ = 320.13986 |

Los espectros de RMN (**Tabla 13**) presentaron señales concordantes con el número de carbonos e hidrógenos requeridos por la forma molecular, es decir, no se observó la presencia de conformeros estables a temperatura ambiente, lo que indica que el metilo que sustituye al nitrógeno en la posición 4 determina la barrera energética de interconversión de los isómeros (Sun *et al.*, 1995) en el producto **72**. Este mismo comportamiento se observó en la benzodiazepindiona **81** que tampoco presenta sustitución en *N*-4 (Barrow & Sun, 1994).

La configuración del centro estereogénico se comprobó con el valor de la rotación óptica negativo contrario al producto de síntesis **86** (Akssira *et al.*, 1994) obtenido a partir del L-triptófano.

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para (*R*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-1-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**76**) en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz)

| Posición | δ _c | Tipo | δ _H (J en Hz) |
|----------|----------------|-----------------|--|
| 2 | 171.2 | C | - |
| 3 | 52.8 | CH | 4.09 dd (6.2, 8.2) |
| 5 | 169.5 | C | - |
| 6 | 129.3 | CH | 7.73 dd (1.4, 7.8) |
| 7 | 132.5 | CH | 7.60 t (7.8) |
| 8 | 125.5 | CH | 7.32 t (7.5) |
| 9 | 122.0 | CH | 7.41 d (7.8) |
| 10 | 23.8 | CH ₂ | 3.19 dd (8.3, 15.0) 3.46 dd (6.1, 15.0) |
| 11 | 141.2 | C | - |
| 12 | 128.1 | C | - |
| 13 | 109.3 | C | - |
| 14 | 127.0 | C | - |
| 15 | 117.4 | CH | 7.41 d (7.8) |
| 16 | 118.4 | CH | 6.93 t (7.4) |
| 17 | 121.0 | CH | 7.05 t (7.3) |
| 18 | 110.9 | CH | 7.32 t (7.5) |
| 19 | 136.6 | C | - |
| 20 | 123.5 | CH | 7.15 s |
| 21 | 34.6 | CH ₃ | 3.43 s |

Cabe señalar que en los productos metilados en el nitrógeno de la posición 4 el signo de rotación óptica del aminoácido precursor se mantiene debido al atropisomerismo. Así, la benzodiazepindiona (**81**) y su análogo metilado en la posición 1 (**86**), con configuración *S* en C-3 presentan una rotación óptica positiva (Barrow & Sun, 1994; Akssira *et al.*, 1994); sin embargo, el análogo metilado en la posición 4 (**72**) que mantiene la configuración *S* en C-3 presenta un valor de rotación óptica negativo. Esta coyuntura también se observó en la 3*S*-ciclopeptina (**80**) que presenta un valor de rotación óptica negativo, mientras que en su análogo 3*S* desmetilado (**87**) el valor es positivo (Sun *et al.*, 1995) (**Figura 31**). Entonces el fenómeno de atropisomerismo genera elementos de disimetría adicionales en la molécula, por lo que el solo signo de la rotación óptica no sería suficiente criterio para determinar la configuración del centro estereogénico, a menos que existan modelos similares como en el caso de los productos **80** y **87**.

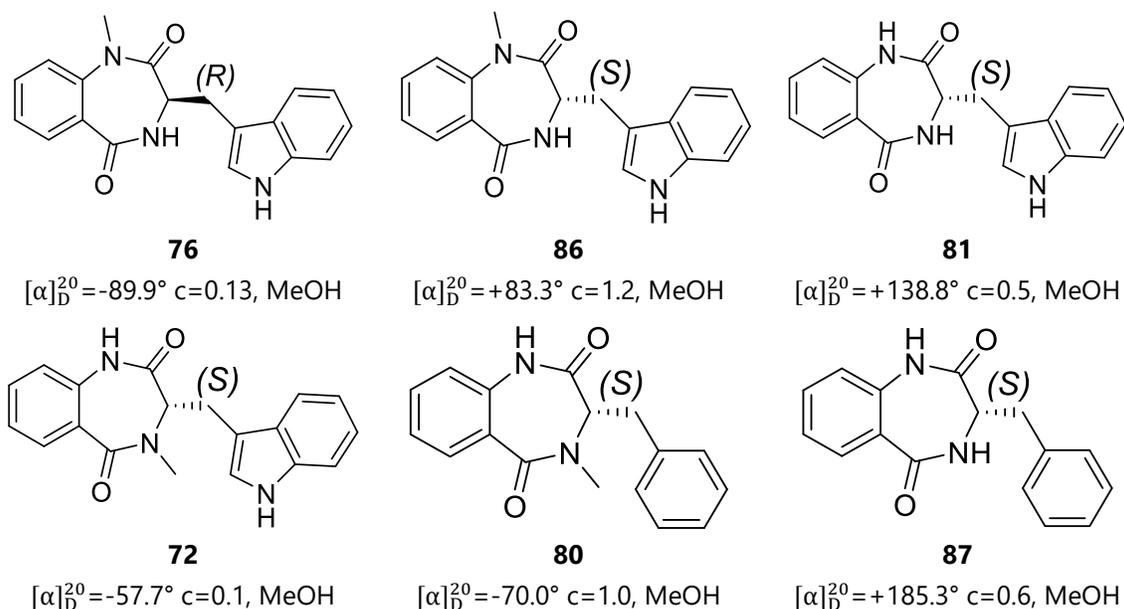


Figura 31. Rotación óptica específica de algunas benzodiazepindionas.

6.5 ROSIGENINA (68)

El compuesto **68** se obtuvo como un sólido vítreo blanco. La elucidación estructural de este compuesto fue relativamente sencilla ya que posee el mismo núcleo que la masarigenina C (**62**), metabolito aislado previamente de este hongo (Rebollar-Ramos, 2016). Los datos de espectrometría de masas indicaron que el producto **68** tiene una insaturación menos que el **62**. Así, los espectros de RMN (**Tabla 14**) en lugar de las señales para la doble ligadura entre C-3 (δ_c 81.8) y C-11 (δ_c 14.6) en **62**, presentan señales para un metilo secundario adicional. Las correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC (**Figura 32**) de **68**, que fueron idénticas a las observadas en los espectros de **62**, apoyaron esta hipótesis.

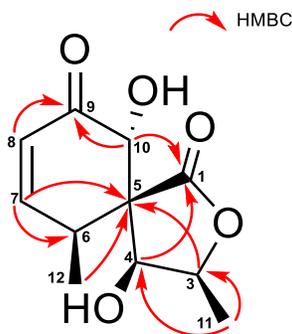


Figura 32. Correlaciones selectas de HMBC para el compuesto **68**.

De manera adicional, el valor de los desplazamientos químicos de C-6 (δ_c 34.9) y C-4 (δ_c 75.6) sugirieron una diferencia en la orientación del metilo C-12 y el hidroxilo en C-4, respectivamente, tal como se observa en la rosigenina, el único compuesto dihidro en C-3 y C-11 análogo a las masarigeninas. Al comparar los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H con los ya reportados para la rosigenina (Albinati *et al.*, 1980) se observó que eran idénticos. Por lo tanto, el producto **68** se identificó como la rosigenina.

Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para la rosigenina (**68**) en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz)

| Posición | δ_c | δ_H (J en Hz) | HMBC |
|-----------|------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 178.4 | - | - |
| 3 | 81.8 | 4.82 p (6.5) | 1, 4, 5 |
| 4 | 75.6 | 4.68 d (6.5) | 1, 3, 5, 6, 10, 11 |
| 5 | 61.9 | - | - |
| 6 | 34.9 | 3.21 m | 7, 8 |
| 7 | 154.1 | 6.68 dd (2.5, 10.2) | 5, 8, 9, 12 |
| 8 | 125.4 | 6.01 dd (2.9, 10.2) | 5, 6, 9, 10 |
| 9 | 199.1 | - | - |
| 10 | 76.9 | 4.44 s | 1, 4, 5, 6, 9 |
| 11 | 14.6 | 1.36 d (6.7) | 3, 4 |
| 12 | 18.8 | 1.28 d (7.2) | 5, 6, 7 |

6.6 RIBO-XYLARINOL B (69)

Este compuesto fue aislado como un sólido vítreo. La elucidación estructural se llevó a cabo por comparación de los desplazamientos de ^1H y ^{13}C con los del *arabino*-xyларinol B (**65**) (Mullapudi & Ramana., 2016), cuya estructura se estableció inequívocamente por síntesis. Al realizar este cotejo, los desplazamientos químicos en el espectro de RMN eran prácticamente idénticos; sin embargo, existían dos diferencias fundamentales que permitieron identificar al compuesto **69** como *ribo*-xyларinol B. Así los protones del metileno C-2' en **69** se observaron en δ_H 1.79 y 2.09 como un sistema AB, mientras que en el compuesto **65** la señal para este metilo se aprecia como múltiple centrado en δ_H 1.80; por otro lado, el desplazamiento de C-1' también se modificó de δ_c 82.7 en **65** a δ_c 84.3 en **69**. En la **Tabla 15** se muestran los datos espectroscópicos del *ribo*-xyларinol B.

Ambos productos se generan biogénicamente del sordariol (**88**), y coexisten con este mismo en *Sordaria macrospora* (Bouillant *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2016) (**Figura 33**). Cabe mencionar que de *Cladosporium* sp. también se aislaron los productos **65** y **69** (Höller *et al.*, 2002).



Figura 33. Sordariol y sus derivados isobenzofuranos.

Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para el *ribo*-xylarinol B (**69**) en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz)

| Posición | δ_c | δ_H (J en Hz) |
|-----------|------------|--|
| 1 | 145.2 | - |
| 2 | 125.8 | - |
| 3 | 152.8 | - |
| 4 | 113.2 | 6.67 d (7.9) |
| 5 | 130.4 | 7.11 t (7.7) |
| 6 | 114.8 | 6.74 d (7.4) |
| 1' | 84.3 | 5.38 m |
| 2' | 40.1 | 1.79 dt (8.3, 14.3) 2.09 ddd (3.6, 4.8, 14.3) |
| 3' | 71.5 | 3.66 m |
| 4' | 74.8 | 3.72 m |
| 5' | 18.5 | 1.20 d (6.4) |
| 6' | 71.4 | 4.98 dd (5.8, 11.9) 5.09 dd (2.6, 11.9) |

6.7 MASARILACTONA B (70)

El compuesto **70** fue aislado como un sólido blanco. La elucidación estructural se llevó a cabo a través del análisis de sus espectros de RMN. La fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas tipo ESI de alta resolución como C₁₁H₁₄O₅ (*m/z* 225.0763, calculado para C₁₁H₁₃O₅ 225.0769).

El espectro de ¹³C-RMN mostró señales para once carbonos (**Tabla 16**), de los cuales, dos pertenecen a grupos metilo (δ_c 17.8, C-10; 17.9, C-13), cuatro a carbonos base de oxígeno [δ_c 75.5

(C-3), 86.3 (C-6), 72.6 (C-7), 64.1 (C-6)], dos a una doble ligadura tipo trans (δ_c 126.7 C-11; 133.1, C-12), dos a carbonos cuaternarios de naturaleza alifática, uno a un grupo carbonilo (δ_c 174.1, C-1) y los dos restantes a una doble ligadura sustituida (δ_c 179.3, C-4; 100.8, C9). La conectividad de los átomos se asignó con ayuda de los experimentos HMBC y COSY (**Figura 34**). Una vez elucidada la estructura del compuesto **70**, los desplazamientos fueron comparados con los reportados en la literatura, determinándose así que el compuesto se trataba de la masarilactona B (Oh *et al.*, 2001).

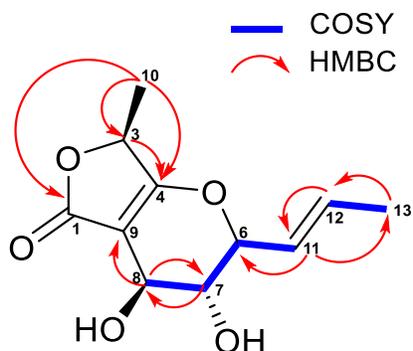


Figura 34. Correlaciones HMBC y COSY para el compuesto **70**.

Cabe mencionar que este compuesto junto con las masarigeninas B y C, son metabolitos previamente obtenidos del hongo *Massarina tunicata* (Oh *et al.*, 2003) lo que sugiere que el metabolismo de la especie *Malbranchea flavorosea* es parecido al de la especie antes mencionada.

Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para la masarilactona B (**70**) en CD₃OD (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz)

| Posición | δ_c | δ_H (J en Hz) | HMBC |
|-----------|------------|---------------------------|-----------|
| 1 | 174.1 | - | - |
| 3 | 75.5 | 4.92 qd (1.3, 6.8) | 1, 10 |
| 4 | 179.3 | - | - |
| 6 | 86.3 | 4.82 dd (4.0, 8.2) | - |
| 7 | 72.6 | 3.77 dd (3.7, 4.1) | 8, 9 |
| 8 | 64.1 | 4.25 dd (1.4, 3.7) | 7, 9 |
| 9 | 100.8 | - | - |
| 10 | 17.8 | 1.41 d (6.8) | 3, 4 |
| 11 | 126.7 | 5.76 pq (1.2, 8.4, 16.4) | 12, 13 |
| 12 | 133.1 | 5.88 qdd (0.8, 6.4, 12.8) | 6, 11, 13 |
| 13 | 17.9 | 1.71 dd (0.9, 6.4) | 11, 12 |

6.8 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Los metabolitos aislados fueron evaluados frente a la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*. Este microorganismo es una bacteria que forma parte de la microbiota intestinal de humano y que está involucrada en el metabolismo de carbohidratos. La enzima α -glucosidasa de *R. obeum* pertenece a la familia GH31, y además es un homólogo estructural del dominio amino-terminal de la maltasa glucoamilasa de humano (2QMJ) con un dominio catalítico altamente conservado (Tan *et al.*, 2010). La alineación 3D de ambas enzimas se muestra en la **Figura 35**. Entonces, los resultados derivados de la evaluación de compuestos con esta enzima permiten inferir mejor los posibles efectos de los mismos sobre las enzimas de humano que aquellos que se deriven de evaluaciones con enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* (Flores-Bocanegra *et al.*, 2017).

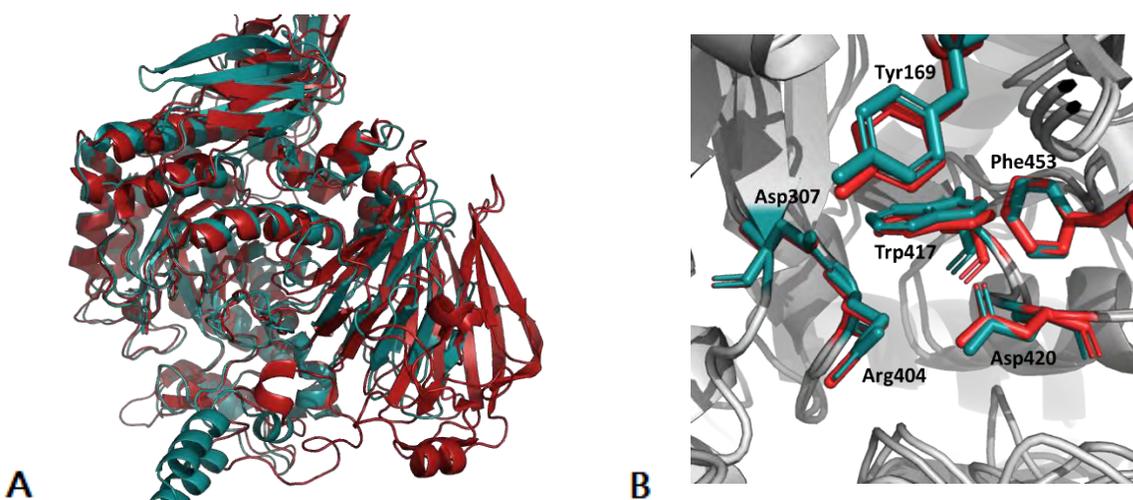


Figura 35. Comparación estructural de las enzimas α -glucosidasas de *R. obeum* (azul) y la maltasa glucoamilasa de humano (rojo). (A) Alineación 3D de las enzimas. (B) Aminoácidos conservados de ambos sitios catalíticos.

Los compuestos **68**, **70**, **71** y **73** mostraron una actividad inhibitoria débil ($CI_{50} > 3mM$) frente a la α -glucosidasa de *R. obeum*. Sin embargo, los compuestos **72** y **76** presentaron un efecto inhibitorio comparable al de la acarbosa, utilizada como control positivo (**Tabla 17**, **Figura 36**).

Las CI_{50} de ambos compuestos son bastante similares, a pesar de la diferencia en la estereoquímica y de la sustitución en los diferentes nitrógenos del anillo de benzodiazepindiona. Sin embargo, el producto natural permanece como el metabolito más activo.

Tabla 17. CI_{50} de los compuestos evaluados contra α -glucosidasa de *R. obeum*

| Compuesto | CI_{50} (mM) |
|-----------|------------------|
| 68 | > 3 |
| 69 | Sin datos |
| 70 | >> 3 |
| 71 | > 3 |
| 72 | 1.33 ± 0.051 |
| 73 | > 3 |
| 76 | 1.68 ± 0.070 |
| Acarbosa | 1.05 ± 0.020 |

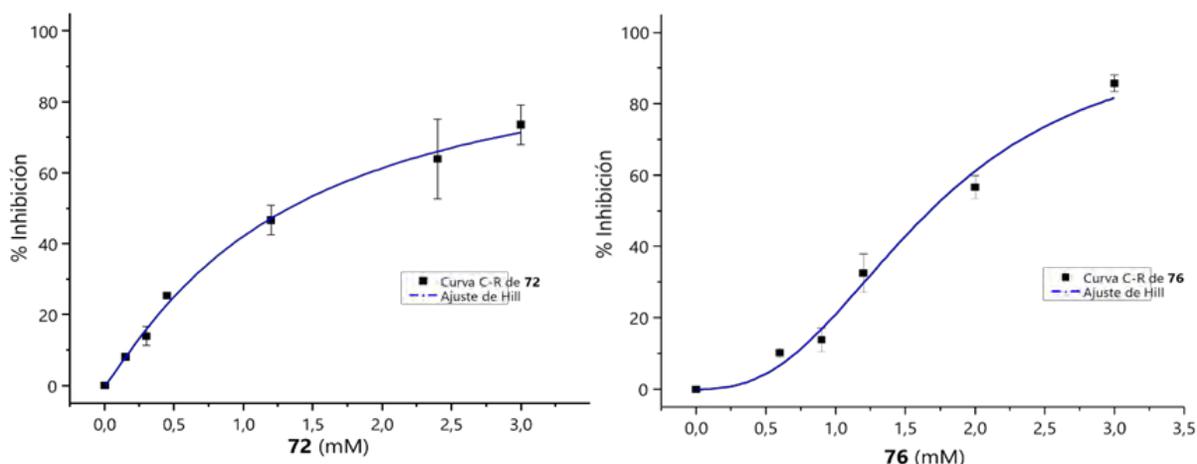


Figura 36. Curvas C-R de los metabolitos **72** y **76** frente a la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*.

6.9 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO Y DINÁMICA MOLECULAR

Con la finalidad de complementar la actividad biológica observada *in vitro* se realizaron estudios de acoplamiento y dinámica molecular de los compuestos activos con la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*.

El acoplamiento molecular es una técnica computacional que predice la estructura del complejo que se forma entre un ligando y su proteína blanco. Su objetivo principal es simular el proceso de identificación molecular del ligando con la proteína y lograr una conformación optimizada para que la energía libre del sistema se minimice (Chaudhary & Mishra, 2016). El proceso de acoplamiento implica dos pasos: en el primero, se realiza la predicción de la conformación del ligando, así como su posición y orientación dentro de la proteína, y, en el segundo paso, la afinidad de unión se evalúa con una función de puntuación empírica simple (Sakano *et al.*, 2016).

En este experimento se observó que los compuestos **72** y **76** interactúan en el sitio catalítico de la enzima y que los aminoácidos que intervienen en la unión del compuesto con la enzima son Tyr169, Asp197, Ile234, Trp271, Trp305, Asp307, Arg404, Trp417, Asp420, Phe453 e His478 (**Figura 37**).

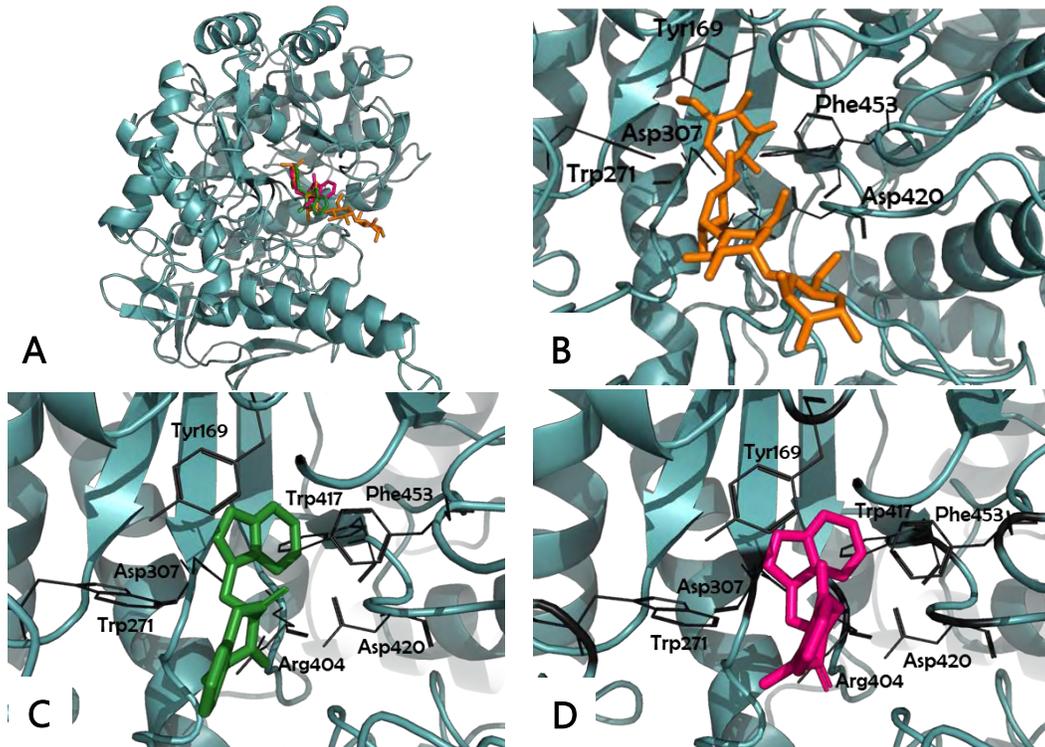


Figura 37. (A) Modelo estructural de los complejos formados entre la α -glucosidasa de *R. obeum* con acarbosa (naranja), **72** (verde) y **76** (rosa). Representación 3D de los sitios de unión entre (B) acarbosa, (C) **72**, y (D) **76** con la enzima de *R. obeum*.

En ambos compuestos se observó la formación de un puente de hidrógeno entre el nitrógeno del indol y el residuo Asp 197. De acuerdo con las visualizaciones en LigPlot+, el compuesto **72** podría presentar interacciones tipo π - π entre el anillo aromático de la benzodiazepina y los residuos Phe453, Phe314 y Trp 271. Mientras que el compuesto **76** presentaría este tipo de interacciones con los residuos Phe 314, Trp417 y Tyr 169 (**Figura 38**).

A pesar de su uso extendido y exitoso, el acoplamiento molecular adolece de un inconveniente principal asociado con el segundo paso de su algoritmo. La precisión del puntaje empírico es limitada, ya que este se calcula para una única estructura pronosticada. El acoplamiento molecular no muestra los principales reajustes conformacionales de las proteínas observados durante la unión del ligando (De Vivo *et al.*, 2016).

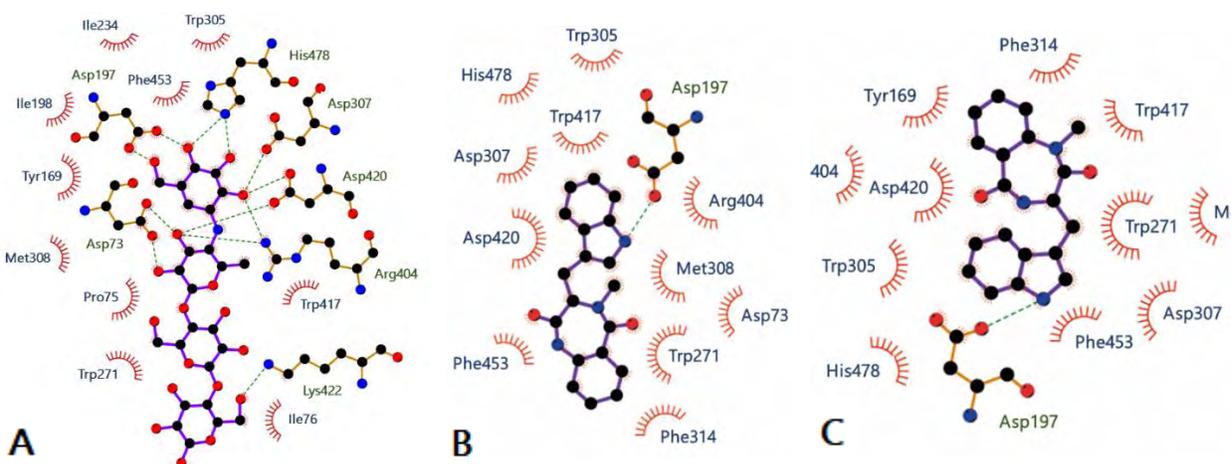


Figura 38. Aminoácidos involucrados en la unión de (A) acarbosa, (B) **72** y (C) **76** con la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*.

Por lo tanto, se propuso que la simulación de la dinámica molecular (DM) podría utilizarse para mejorar la predicción de la energía libre de unión. La dinámica molecular es un método que usa las ecuaciones de movimiento de Newton para simular computacionalmente la evolución temporal de un conjunto de átomos que interactúan. La simulación DM provee una representación mucho mejor de las macromoléculas reales, ya que se considera la flexibilidad y las propiedades dinámicas (incluida toda la información termodinámica), además del papel de las moléculas de agua estructurales dentro del sitio de unión (De Vivo *et al.*, 2016; Sakano *et al.*, 2016; Hospital *et al.*, 2015).

La DM se puede usar como herramienta de postprocesamiento para validar y/o refinar resultados de acoplamiento molecular. Aquí, la suposición subyacente es que una mala "pose" de acoplamiento generará una trayectoria inestable, durante la cual el ligando podría incluso abandonar el sitio de unión. Por el contrario, una postura de acoplamiento significativa mostrará interacciones estables y específicas con la macromolécula diana, mostrando un RMSD bajo en el tiempo, con respecto a la conformación inicial (De Vivo *et al.*, 2016).

Debido a esto, se realizó una simulación de dinámica molecular de los complejos de la enzima de *R. obeum* con la acarbosa y los compuestos **72** y **76**.

La energía (ΔG) obtenida del análisis mostró que ambos compuestos tienen muy buena afinidad por la enzima, mostrando valores de energía de -22.9 y -23.6 kcal/mol, respectivamente, en comparación con la obtenida para la acarbosa (-31.0 kcal/mol).

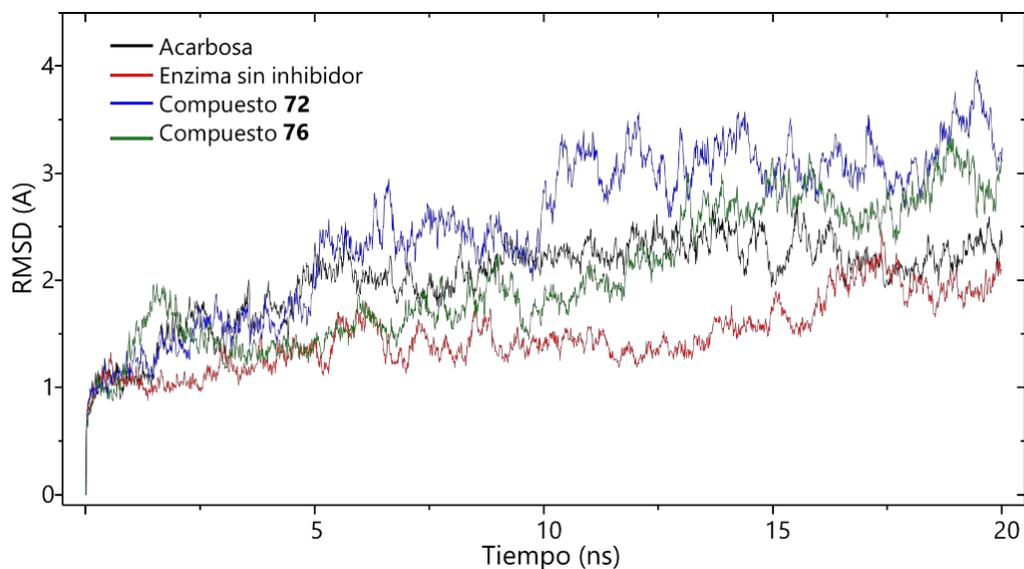


Figura 39. RMSD en función del tiempo para una simulación de DM de 20 ns.

Por otro lado, la gráfica de RMSD en función del tiempo (**Figura 39**) mostró que existe una diferencia en el cambio conformacional de la enzima cuando está en presencia de los compuestos activos, lo que indica que los compuestos de prueba realmente interactúan con la enzima, en congruencia con los resultados experimentales obtenidos *in vitro*.

El compuesto **76** resultó también un prototipo prometedor como inhibidor de las enzimas α -glucosidasas, ya que la actividad no se ve disminuida a pesar del cambio de la configuración en el centro estereogénico de la molécula y del cambio de posición del grupo *N*-metilo. Además, este análogo es relativamente sencillo de sintetizar, por lo que tiene potencial para estudios farmacológicos posteriores.

7 CONCLUSIONES

- ⋄ El hongo *Malbranchea flavorosea* es una fuente importante de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. En el estudio previo se comprobó que la masarigenina C representa un prototipo nuevo de inhibidores de estas enzimas, y en este estudio se encontró que las benzodiazepindionas también lo son.
- ⋄ El aislamiento del flavorroseósido B (**71**) muestra de nueva cuenta que en el género *Malbranchea* se biosintetizan compuestos halogenados. Así, *M. flavorosea* se une a *M. aurantiaca*, *M. graminicola* y *M. sulfurea* como especie productora de este tipo de compuestos.
- ⋄ El aislamiento del metabolito **73** permite evidenciar el metabolismo en rejilla del hongo *M. flavorosea* ya que este compuesto está relacionado estructuralmente con el clavatul (**63**), aislado previamente de esta especie.
- ⋄ El metabolismo secundario de este hongo se caracteriza por la biosíntesis de policétidos.

8 PERSPECTIVAS

- ⌘ Realizar la síntesis del producto natural **72** para caracterizar con detalle el potencial antidiabético del producto mediante la realización de pruebas *in vivo* y otras pruebas *in vitro*.
- ⌘ Evaluar el análogo **79** en pruebas *in vivo* para corroborar su actividad como inhibidor de las α -glucosidasas.
- ⌘ Sintetizar análogos de la benzodiazepindiona **72** con diferentes aminoácidos con la finalidad de realizar un análisis de relación estructura-actividad de estos productos como inhibidores de las α -glucosidasas.

9 REFERENCIAS

- Akssira, M., Boumzebra, M., Kasmi, H., Dahdouh, A., Roumestant, M.L., Viallefont, Ph. (1994). New routes to 1,4-benzodiazepin-2,5-diones. *Tetrahedron*, 50 (30), 9051-9060.
- Albinati, A., Bruckner, S., Camarda, L., Nasini, G. (1980) Rosigenin, an unusual metabolite from *Mycosphaerella rosigena*. *Tetrahedron*, 36, 117-121.
- Asano, N. (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, 13(10), 93-104.
- Bailey, C.J. (2011). Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32 (2), 63-71.
- Barrow, C.J. & Sun, H.H. (1994). Spiroquinazoline, a novel substance P inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from *Aspergillus flavipes*. *Journal of Natural Products*, 57 (4), 471-476.
- Blackburn, B.K., Lee, A., Baier, M., Kohl, B., Olivero, A.G., Matamoros, R., Robarge, K.D., McDowell, R.S. (1997). From peptide to non-peptide. 3. Atropisomeric GPIIb/IIIa antagonists containing the 3,4-dihidro-1*H*-1,4-benzodiazepine-2,5-dione nucleus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 717-729.
- 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.
- Bouillant, M.L., Bernillon, J., Favre-Bonvin, J., Salin, N. (1989). New hexaketides related to sordariol in *Sordaria macrospora*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, 44 (9-10), 719-723.
- Bouillant, M.L., Favre-Bonvin, J., Salin, N., Bernillon, J. (1988). Sordariol and related compounds, hexaketides in the fungus *Sordaria macrospora*. *Phytochemistry*, 27 (5), 1517-1519.
- Centko, R.M., Ratnaweera, P.B., Tysoe, C., Withers, S.G., De Silva, E.D., Andersen, R.J. (2017). Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibiting thiodiketopiperazines from the endophytic fungus *Setosphaeria rostrata* isolated from the medicinal plant *Costus speciosus* in Sri Lanka. *Phytochemistry Letters*, 22, 76-86.
- Chaudhary, K.K., Mishra, N. (2016). A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. *JSM Chemistry*, 4 (3), 1029.
- Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61 (8), 1233-1239.
- 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. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 46(12), 1819-1826.

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*. *Journal of Natural Products*, 68, 1226-1230.

Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2da edición. Wiley-VCH.

Davies, G., Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9), 853-859.

De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., Cavalli, A. (2016). Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 4035-4061.

Del Valle, P., Martínez, A.L., Figueroa, M., Raja, H.A., Mata, R. (2016). Alkaloids from the fungus *Penicillium spathulatum* as α -glucosidase inhibitors. *Planta Medica*, 82, 1286-1294.

Derosa, G., Maffioli, P. (2012). α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science*, 8 (5), 899-906.

Ernst, H.A., Lo Leggio, L., Willemoes, M., Leonard, G., Blum, P., Larsen, S. (2006). Structure of the *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase: Implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *Journal of Molecular Biology*, 358, 1106-1124.

Figueroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Rio-Portilla, F., González M.C., Mata, R. (2011). Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 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. *Journal of Natural Products*, 75(4), 812-833.

Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (2017). α -Glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *Journal of Natural Products*, 80 (5), 1584-1593.

Framm, J., Nover, L., El Azzouny, A., Richter, H., Winter, K., Werner, S., Luckner, M. (1973). Cyclopeptin and dehydrocyclopeptin. Intermediates in the biosynthesis of cyclopeptin-viridicatin alkaloids in *Penicillium cyclopium* Westling. *European Journal of Biochemistry*, 37, 78-85.

Ghani, U. (2015). Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 133-162.

Gilman, N.W., Rosen, P., Earley, J.V., Cook, C., Todaro, L.J. (1990). Atropisomers of 1,4-benzodiazepines. Synthesis and resolution of a diazepam-related 1,4-benzodiazepine. *Journal of the American Chemical Society*, 112, 3969-3978.

Glunz, P.W. (2018). Recent encounters with atropisomerism in drug discovery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 28, 53-60.

Guarro, J., Gené, J., de Vroey C.H. (1993). Studies of keratinophilic fungi I. A new *Malbranchea* from Sulawesi. *Mycotaxon*, 48, 471-476.

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. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(2), 420-435.

Höller, U., Gloer, J.B., Wicklow, D.T. (2002). Biologically active polyketide metabolites from an undetermined fungicolous hyphomycete resembling *Cladosporium*. *Journal of Natural Products*, 65, 876-882.

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.

Hospital, A., Goñi, J.R., Orozco, M., Gelpí, J.L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 8, 37-47.

IDF. (2017). International Diabetes Federation Atlas (8th ed.).

INEGI. (2017). Estadísticas a propósito del día de muertos. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Obtenido el 15 de enero de 2018, de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf

Israili, Z.H. (2011). Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *American Journal of Therapeutics*, 18, 117-152.

Kahaly, G.J., Hansen, M.P. (2016). Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 15, 644-648.

Krasikov, V.V., Karelou, D.V., Firsov, L.M. (2001). α -Glucosidases. *Biochemistry*, 66(3), 267-281.

Kusano, M., Koshino, H., Uzawa, J., Fujioka, S., Kawano, T., Kimura, Y. (2000). Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64 (12), 2559-2568.

Lawson, P.A., Finegold, S.M. (2015). Reclassification of *Ruminococcus obeum* as *Blautia obeum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 789-793.

Li, T., Wang, X., Luo, J., Yang, M., Kong, L. (2016). Antioxidant sordariol dimers from *Sordaria macrospora* and the absolute configuration determinations of their two simultaneous linear 1,2-diols. *Tetrahedron Letters*, 57, 2754-2757.

Lin, A.H.M., Lee, B.H., Chang, W.J. (2016). Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*, 53, 163-171.

Liu, Z., Chen, S., Qiu, P., Tan, C., Long, Y., Lu, Y., She, Z. (2017). (+)- and (-)-Ascomlactone A: a pair of novel dimeric polyketides from a mangrove endophytic fungus *Ascomycota* sp. SK2YWS-L. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15, 10276-10280.

- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., Mata, R. (2015). Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 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. *Bioresource Technology*, 200, 55-63.
- Mannina, F.M., Mosca Luppi, A.M. (1983). Su una nuova specie di *Malbranchea*, *M. multicolor*. *Allionia*, 26, 19-27.
- Martínez-Luis, S. (2007). *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmichael, una fuente novedosa de fitotoxinas antagonistas de la proteína calmodulina. (Tesis de Doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- 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 *Malbranchea filamentosa* IFM 41300: inhibitory behaviors of adenosine in different solvents. *Journal of Health Science*, 55(1), 103-108.
- Mullapudi, V., Ramana, C.V. (2016). The total synthesis and structural assignment of hexaketide xylarinol B and its C1'-epimer. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 5, 417-422.
- Nakai, H., Okuyama, M., Kim, Y.M., Saburi, W., Wongchawalit, J., Mori, H., Chiba, S., Kimura, A. (2005). Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia Bratislava*, 60, 131-135.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1982 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- 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*. *Journal of Natural Products*, 66, 73-79.
- OMS. (2017). Las diez principales causas de defunción. Obtenido el 15 de enero de 2018, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>

OMS. (2018). Complicaciones de la diabetes. Obtenido el 15 de enero de 2018, de http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index3.html

Osadebe, P.O., Odoh, E.U., Uzor, P.F. (2014). Natural products as potential sources of antidiabetic drugs. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(17), 2075-2095.

Pan, C., Shi, Y., Chen, X., Chen C. A., Tao, X., Wu, B. (2017). New compounds from a hydrothermal vent crab-associated fungus *Aspergillus versicolor* XZ-4. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15, 1155-1163.

Premabai, M., Narasimharao, P.L. (1966). Thermophilic microorganisms. IV. Elaboration of malbranchins A and B by *Malbranchea pulchella*. *Indian Journal of Biochemistry*, 3,187-190.

Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Madariaga-Mazón, A., Figueroa, M., Mata, R. (2017). α -Glucosidase inhibitors from *Preussia minimoides*. *Journal of Natural Products*, 80, 582-587.

Rebollar-Ramos, D. (2016). Inhibidores de alfa-glucosidasas de la especie fúngica *Malbranchea flavorosea* Sigler et Carmichael (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Ríos, J.L., Francini, F., Schinella, G.R. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (I): Mecanismos de acción. *Revista de Fitoterapia*, 16 (1), 17-31.

Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., González M.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.

Rukachaisirikul, V., Rungsaiwattana, N., Klaiklay, S., Pakawatchai, C., Saithong, S., Phongpaichit, S., Borwornwiriyan, K., Sakayaroj, J. (2013). Indole-benzodiazepine-2,5-dione derivatives from a soil fungus *Aspergillus* sp. PSU-RSPG185. *Tetrahedron*, 69, 11116-11121.

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

Sakano, T., Mahamood, M.I., Yamashita, T., Fujitani, H. (2016). Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction. *Biophysics and Physicobiology*, 13, 181-194.

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. *Journal of Antibiotics (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. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 56(9), 792-794.

Sharma, M., Chadha, B.S., Saini, H.S. (2010). Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. *Bioresource Technology*, 101, 8834-8842.

- Sigler, L., Carmichael J.W. (1976). Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon*, 4, 349-488.
- Sigler, L., Lacey, J., Carmichael, J.W. (1982). Two new species of *Malbranchea*. *Mycotaxon*, 15, 465-471.
- Sujatha, E.; Girisham, S.; Reddy, S. M. (2002). Production of indole acetic acid and free amino acids by three thermophilic fungi. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 44, 37-41.
- Sun, H.H., Barrow, C.J., Cooper, R. (1995). Benzomalvin D, a new 1,4-benzodiazepine atropisomer. *Journal of Natural Products*, 58 (10), 1575-1580.
- Takase, S., Kawai, Y., Uchida, I., Tanaka, H., Aoki, H. (1985). Structure of amauromine, a new hypotensive vasodilator produced by *Amauroascus* sp. *Tetrahedron*, 41, 3037-3048.
- Tan, K., Tesar, C., Wilton, R., Keigher, L., Babnigg, G., Joachimiak, A. (2010). Novel α -glucosidase from human gut microbiome: substrate specificities and their switch. *The FASEB Journal*, 24 (10), 3939-3949.
- 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*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1-8.
- Upadhyay, J., Polyzos, S.A., Perakakis, N., Thakkar, B., Paschou, S.A., Natsiki, N., Underwood, P., Park, K.H., Seufert, J., Kang, E.S., Sternthal, E., Karagiannis, A., Mantzoros, C.S. (2018). Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update. *Metabolism*, 78, 13-42.
- Van Oorschot, C., De Hoog, C.S. (1984). Some hyphomycetes with thallic conidia. *Mycotaxon*, 20, 129-132.
- Verástegui-Omaña, B., Rebollar-Ramos, D., Pérez-Vázquez, A., Martínez, A.L., Madariaga-Mazón, A., Flores-Bocanegra, L., Mata, R. (2017). α -Glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea*. *Journal of Natural Products*, 80, 190-195.
- 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*. *Journal of Antibiotics (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*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 67(8), 585-588.

- Wang, J.F., Zhou, L.M., Chen, S.T., Yang, B., Liao, S.R., Kong, F.D., Lin, X.P., Wang, F.Z., Zhou, X.F., Liu, Y.H. (2018). New chlorinated diphenyl ethers and xanthenes from a deep-sea-derived fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 41001. *Fitoterapia*, 125, 49-54.
- 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. *Journal of Organic Chemistry*, 76(15), 6201-6208.
- Yang, S., Xiong, H., Yan, Q., Yang, H., Jiang, Z. (2014). Purification and characterization of a novel alkaline β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 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: A European Journal*, 15(43), 11573-11580.
- Zhang, L., Niaz, S.I., Wang, Z., Zhu, Y., Lin, Y., Li, J., Liu, L. (2017). α -Glucosidase inhibitory and cytotoxic botryorhodines from mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. 307. *Natural Product Research*. ASAP <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1385023>
- 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.
- Zhou, X., Fang, P., Tang, J., Wu, Z., Li, X., Li, S., Wang, Y., Liu, G., He, Z., Gou, D., Yao, X., Wang, L. (2016). A novel cyclic dipeptide from deep marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO2. *Natural Products Research*, 30, 52-57.

APÉNDICE I: Taxonomía del hongo *M. flavorosea*

En colaboración con el Dr. Huzefa A. Raja de la Universidad de Greensboro, Carolina del Norte, se llevó a cabo la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal de *Malbranchea flavorosea* (ATCC 34529). El ITS es conocido por ser un marcador de código de barras empleado para predecir la relación filogenética en hongos (Schoch *et al.*, 2012).

Las especies del género *Malbranchea* se consideran filogenéticamente relacionadas con los miembros de Onygenaceae, Onygenales, Eurotiomycetes, Ascomycota (Currah, 1985; Sarrocco *et al.*, 2015); sin embargo, no hay evidencia molecular para confirmar esta aseveración debido a que las regiones ITS de las especies que conforman el género no están secuenciadas. Por ello, se secuenció el ITS de *M. flavorosea* (ATCC 34529) con la finalidad de conocer la relación filogenética de este hongo con otros miembros del GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Cabe mencionar que existe una secuencia del gen parcial de la subunidad grande nuclear (LSU) de *M. flavorosea*, la cual se encuentra depositada en GenBank (AB359419), sin embargo, no hay datos publicados al respecto por lo que la autenticidad de la secuencia no puede ser verificada.

Para la obtención del ITS, se llevó a cabo la extracción del ADN, posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la secuenciación por el método de Sanger y el análisis filogenético molecular utilizando la máxima verosimilitud siguiendo los protocolos descritos recientemente (Raja *et al.*, 2017). Las secuencias de ITS obtenidas ($n = 4$) se analizaron con BLAST y se buscaron en GenBank para verificar la identidad y homología con otras secuencias ITS. Los datos secuenciados fueron depositados en GenBank con los números de acceso MH037295, MH037296, MH037297 y MH037298.

De acuerdo con los resultados BLAST del GenBank, la relación más cercana de la secuencia de ITS de *M. flavorosea* fue con *Myxotrichum stipitatum* [GenBank AF062816; Identidad 479/493 (97%), Espacios 3/493 (0%)] (Hambleton *et al.*, 1998); seguido de *Myxotrichum stipitatum* cepa SFCF20120912-11 [GenBank KF313096; Identidad 493/514 (96%), Espacios 3/514 (0%)] (Min *et al.*,

2014); a continuación con *Myxotrichum carminoparum* UAMH 159 [GenBank AF062812; Identidad 459/494 (93%), Espacios 3/494 (0%)] (Hambleton *et al.*, 1998); y finalmente con la familia *Myxotricheaceae* [GenBank KC007174; Identidad 779/895 (87%), Espacios (32/895) (3%)] (Bonito *et al.*, 2016).

Así, los datos encontrados sugieren que *M. flavorosea* muestra una relación filogenética con *Myxotrichum* spp. (**Figura A1**), lo cual fue indicado por Sigler y Carmichael (1976) en su monografía de *Malbranchea* spp. De manera adicional, un estudio de *Malbranchea* también indicó que *M. flavorosea* puede tener un estado sexual como *Myxotrichum* (Okada *et al.*, 1985).

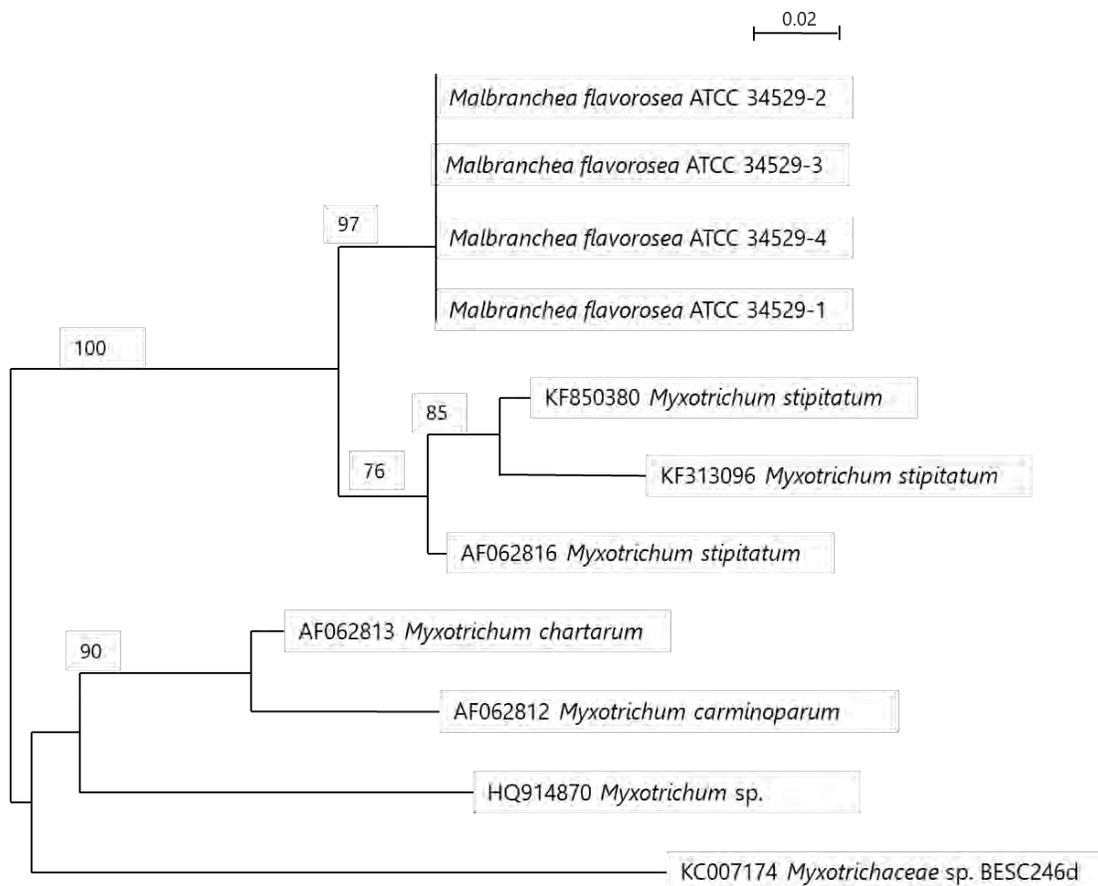


Figura A1. Filograma donde se muestra que *Malbranchea flavorosea* (ATCC 34529) está filogenéticamente relacionada con *Myxotrichum stipitatum* (Leotiomyces incertae sedis, Ascomycota).

Las especies de *Myxotrichum* (Myxotrichaceae Locq. & Currah) fueron previamente relacionadas con los Onygenales, Eurotiomyces; sin embargo, los estudios filogenéticos recientes los sitúan en una posición aislada dentro de la clase de los Leotiomyces (Hambleton *et al.*, 1998, Cannon & Kirk, 2007).

Este análisis preliminar junto con la secuenciación de los *loci* ribosomales y análisis filogenéticos adicionales de otras especies de *Malbranchea*, permitirán tener un mejor entendimiento en la disposición filogenética del género.

REFERENCIAS

Bonito, G., Hameed, K., Ventura, R., Krishnan, J., Schadt, C.W., Vilgalys, R. (2016). Isolating a functionally relevant guild of fungi from the root microbiome of *Populus*. *Fungal Ecology*, 22, 35-42.

Cannon, P.F., Kirk, P.M. (2007). *Fungal families of the world*. Reino Unido, Centre for Agricultural Bioscience International.

Currah, R.S. (1985). Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon*, 24, 1-216.

Hambleton, S., Egger, K.N., Currah, R.S. (1998). The genus *Oidiodendron*: Species delimitation and phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal DNA analysis. *Mycologia*, 90 (5), 854-868.

Min, Y.J., Park, M.S., Fong, J.J., Quan, Y., Jung, S., Lim, Y.W. (2014). Diversity and saline resistance of endophytic fungi associated with *Pinus thunbergii* in coastal shelterbelts of Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (3), 324-333.

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.

Raja, H.A., Miller, A.N.; Pearce, C.J., Oberlies, N.H. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80 (3), 756-770.

Sarrocco, S. Di quattro, S., Cimmino, A., Evidente, A., Vannacci, G., Doveri, F. (2015). A polyphasic contribution to the knowledge of *Auxarthron* (Onygenaceae). *Mycological Progress*, 14, 112.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (16), 6241-6246.

Sigler, L., Carmichael J.W. (1976). Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon*, 4, 349-488.

APÉNDICE II

| | |
|---|----|
| Figura S1. Espectro RMN- ¹³ C de la rosigenina (68) en CD ₃ OD. | 69 |
| Figura S2. Espectro RMN- ¹ H de la rosigenina (68) en CD ₃ OD. | 69 |
| Figura S3. Espectro RMN- ¹³ C del ribo-xylarinol B (69) en CD ₃ OD. | 70 |
| Figura S4. Espectro RMN- ¹ H del ribo-xylarinol B (69) en CD ₃ OD. | 70 |
| Figura S5. Espectro RMN- ¹³ C de la masarilactona B (70) en CD ₃ OD. | 71 |
| Figura S6. Espectro RMN- ¹ H de la masarilactona B (70) en CD ₃ OD. | 71 |
| Figura S7. Espectro RMN- ¹³ C del flavorroseósido B (71) en CD ₃ OD. | 72 |
| Figura S8. Espectro RMN- ¹ H del flavorroseósido B (71) en CD ₃ OD. | 72 |
| Figura S9. Experimento HSQC del compuesto 71 | 73 |
| Figura S10. Experimento COSY para el compuesto 71 | 73 |
| Figura S11. Experimento HMBC para el compuesto 71 | 74 |
| Figura S12. Espectro de masas del compuesto 71 | 74 |
| Figura S13. Espectro en el IR del compuesto 71 | 75 |
| Figura S14. Espectro en el UV del compuesto 71 | 75 |
| Figura S15. Espectro RMN- ¹³ C del (<i>S</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-4-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (72) en CD ₃ OD. | 76 |
| Figura S16. Espectro RMN- ¹ H del (<i>S</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-4-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (72) en CD ₃ OD. | 76 |
| Figura S17. Espectro RMN- ¹ H del (<i>S</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-4-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (72) en DMSO- <i>d</i> ₆ a 50 °C. | 77 |
| Figura S18. Experimento HSQC del compuesto 72 | 77 |
| Figura S19. Experimento HMBC del compuesto 72 | 78 |
| Figura S20. Experimento TOCSY para el compuesto 72 | 78 |
| Figura S21. Experimento ROESY para el compuesto 72 | 79 |
| Figura S22. Espectro de masas del compuesto 72 | 79 |
| Figura S23. Espectro en el IR del compuesto 72 | 80 |
| Figura S24. Espectro en el UV del compuesto 72 | 80 |
| Figura S25. Espectro RMN- ¹³ C del 4-hidroxi-2- <i>O</i> - α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (73) en CD ₃ OD. | 81 |
| Figura S26. Espectro RMN- ¹ H del 4-hidroxi-2- <i>O</i> - α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (73) en CD ₃ OD. | 81 |
| Figura S27. Experimento HSQC del compuesto 73 | 82 |
| Figura S28. Experimento HMBC del compuesto 73 | 82 |
| Figura S29. Experimento TOCSY del compuesto 73 | 83 |
| Figura S30. Espectro de masas del compuesto 73 | 83 |
| Figura S31. Espectro en el IR del compuesto 73 | 84 |
| Figura S32. Espectro en el UV del compuesto 73 | 84 |
| Figura S33. Espectro RMN- ¹³ C del (<i>R</i>)-3,4-dihidro-3-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetil)-1-metil-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2,5-diona (76) en CD ₃ OD. | 85 |

Figura S34. Espectro RMN-¹H del (*R*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-1-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**76**) en CD₃OD.85

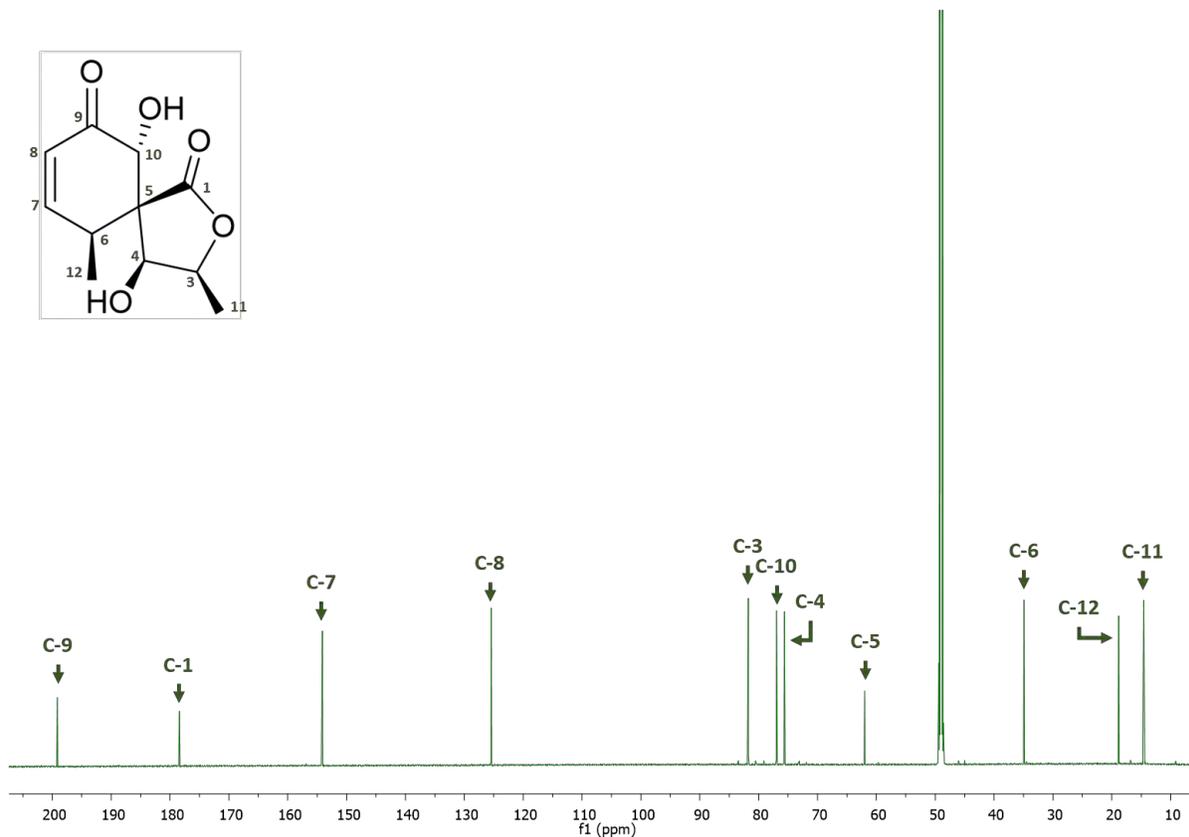


Figura S1. Espectro RMN- ^{13}C de la rosigemina (**68**) en CD_3OD .

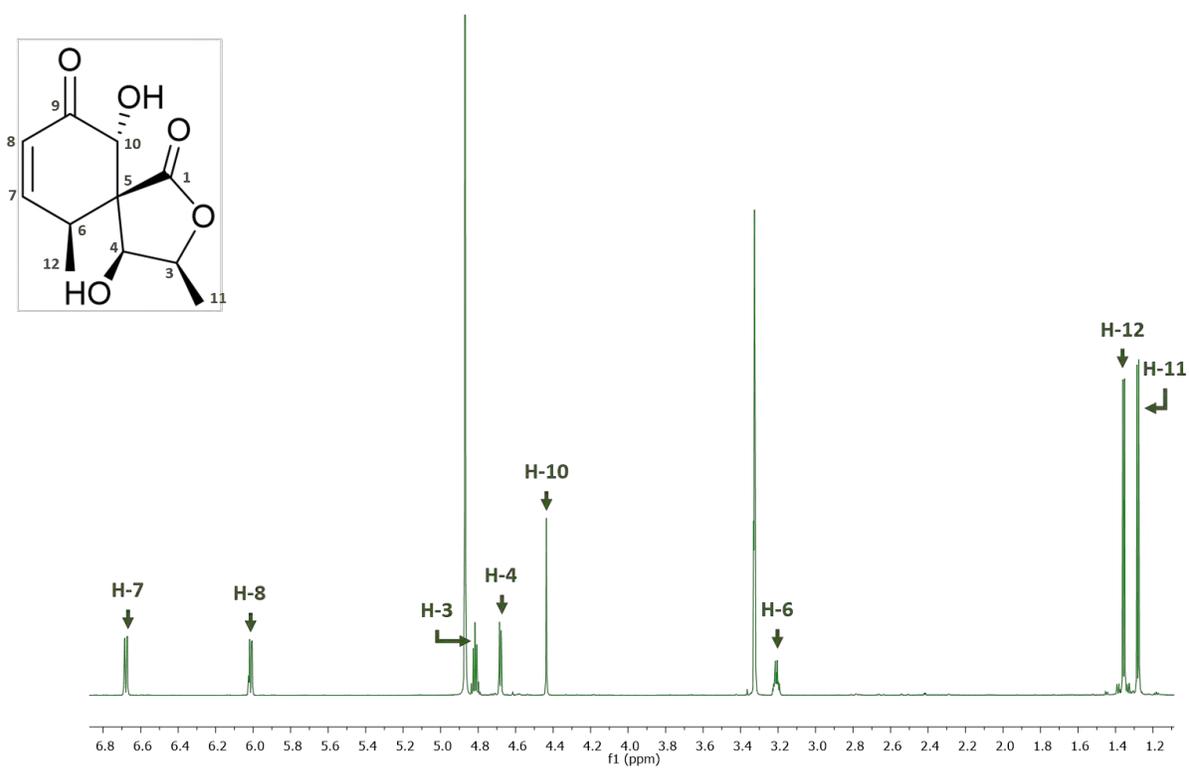


Figura S2. Espectro RMN- ^1H de la rosigemina (**68**) en CD_3OD .

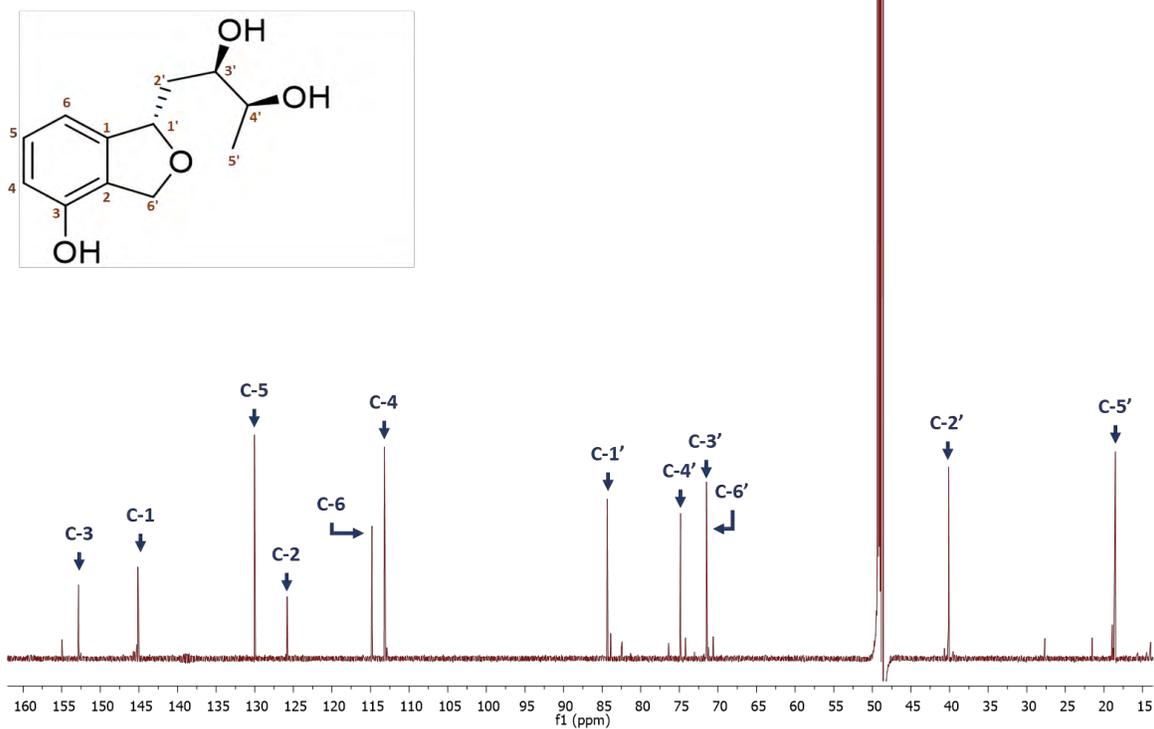


Figura S3. Espectro RMN- ^{13}C del *ribo*-xylarinol B (69) en CD_3OD .

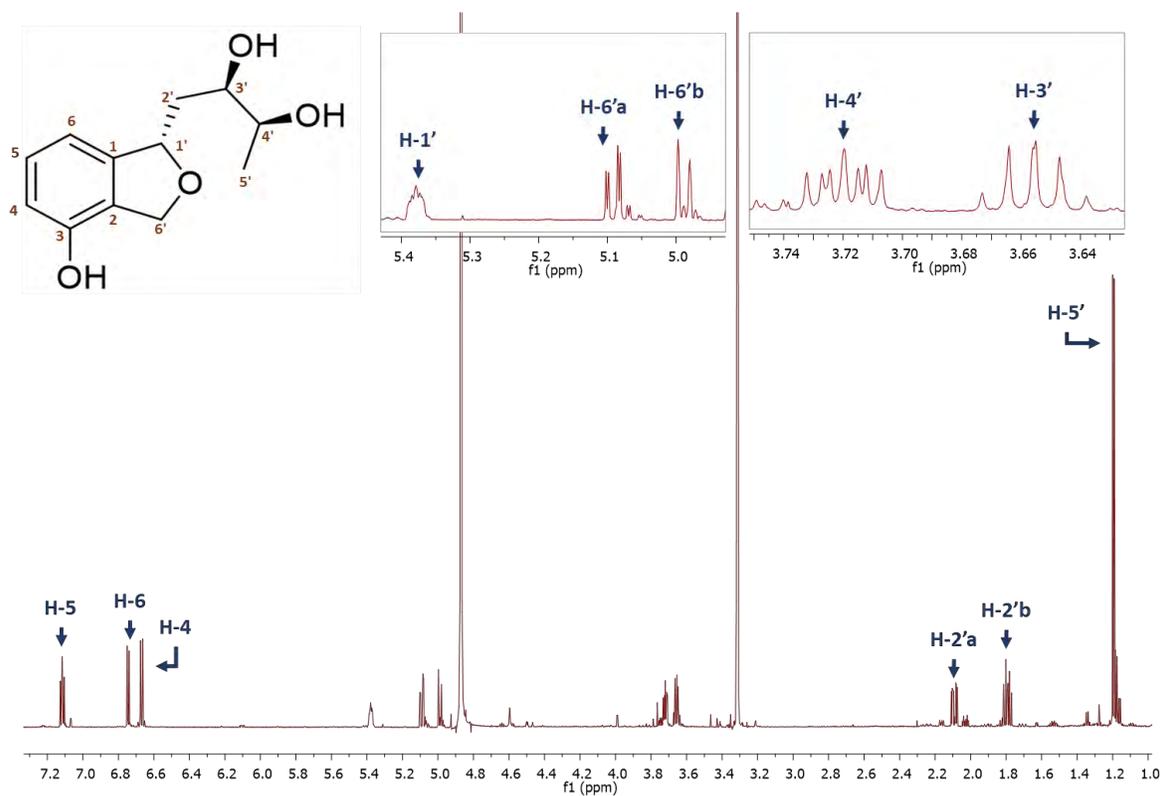


Figura S4. Espectro RMN- ^1H del *ribo*-xylarinol B (69) en CD_3OD .

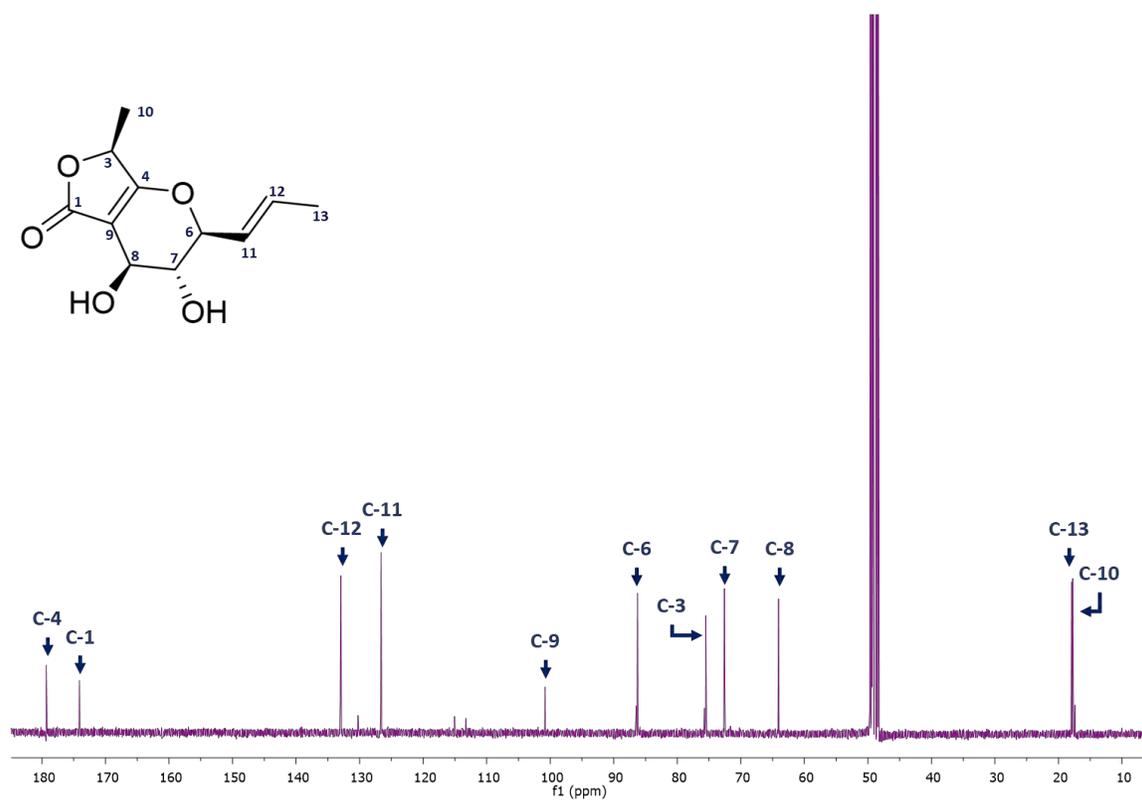


Figura S5. Espectro RMN- ^{13}C de la masarilactona B (70) en CD_3OD .

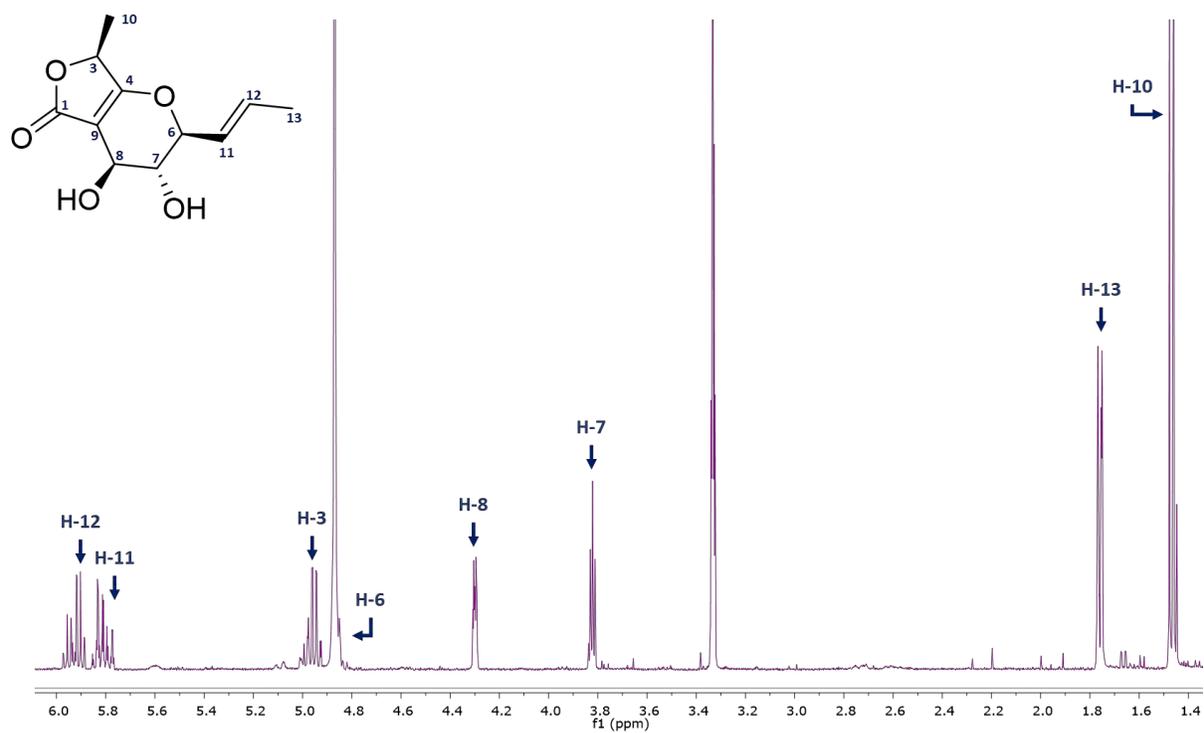


Figura S6. Espectro RMN- ^1H de la masarilactona B (70) en CD_3OD .

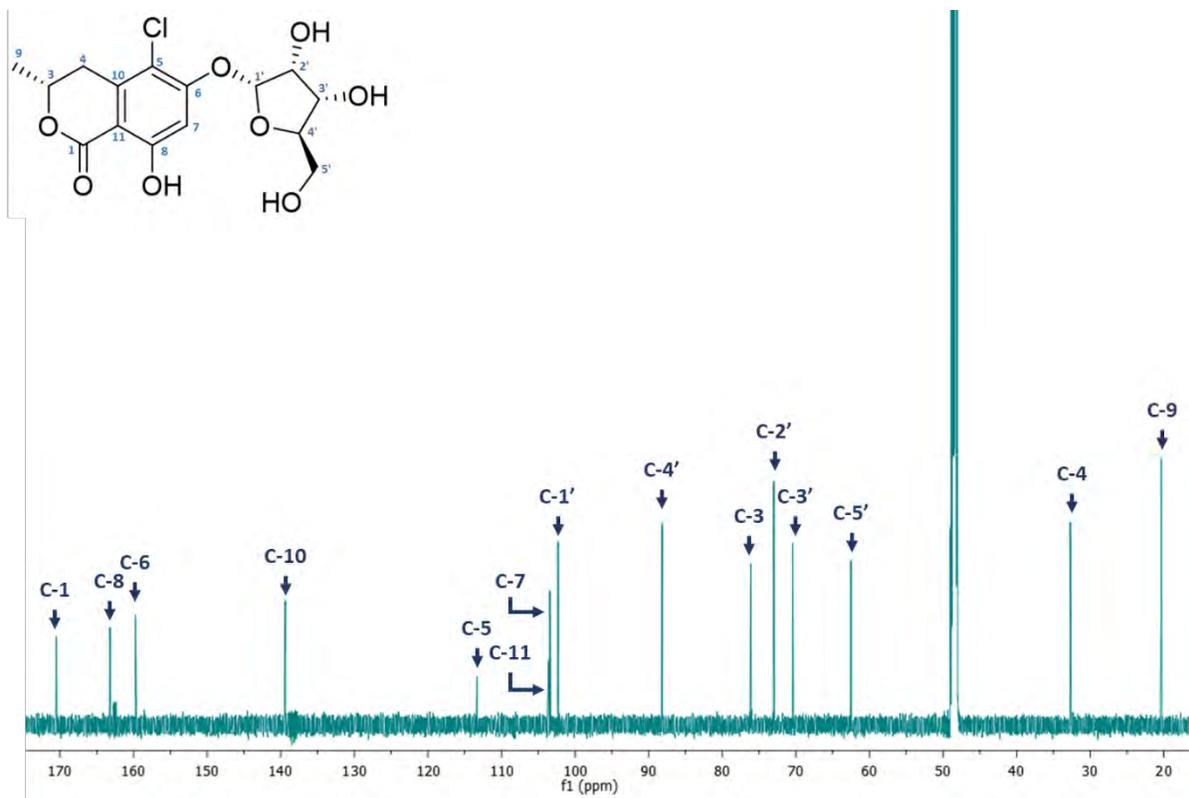


Figura S7. Espectro RMN- ^{13}C del flavoroseósido B (71) en CD_3OD .

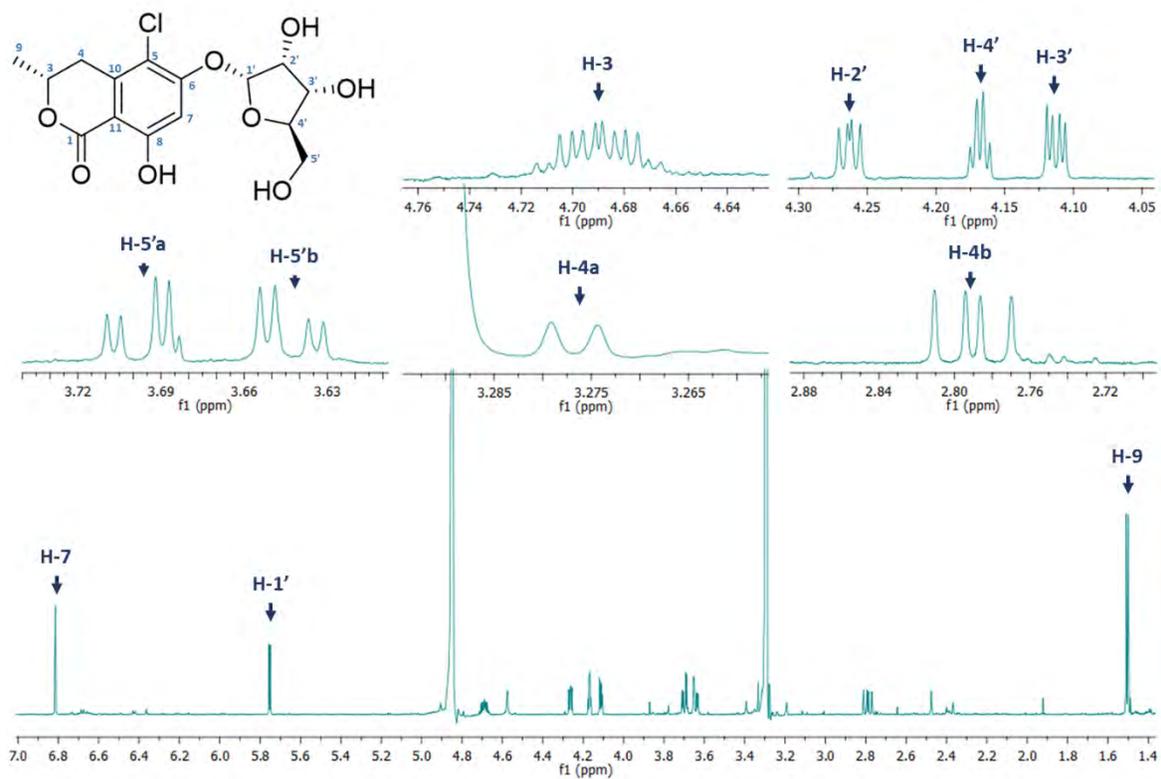


Figura S8. Espectro RMN- ^1H del flavoroseósido B (71) en CD_3OD .

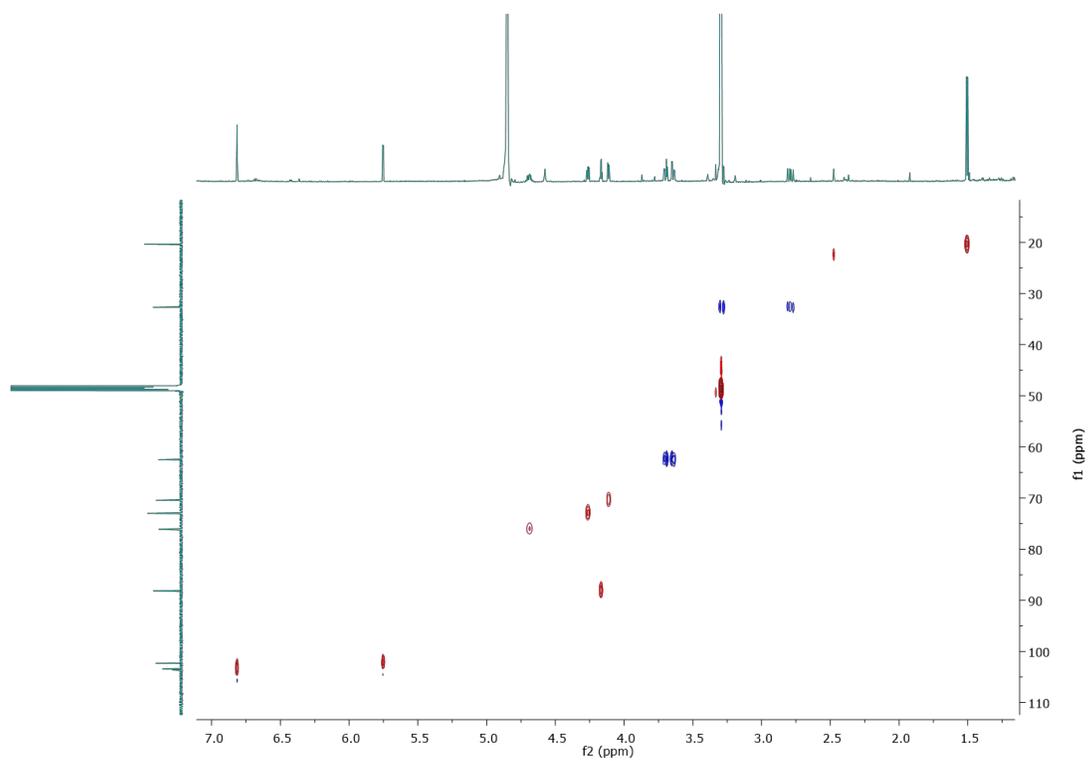


Figura S9. Experimento HSQC del compuesto **71**.

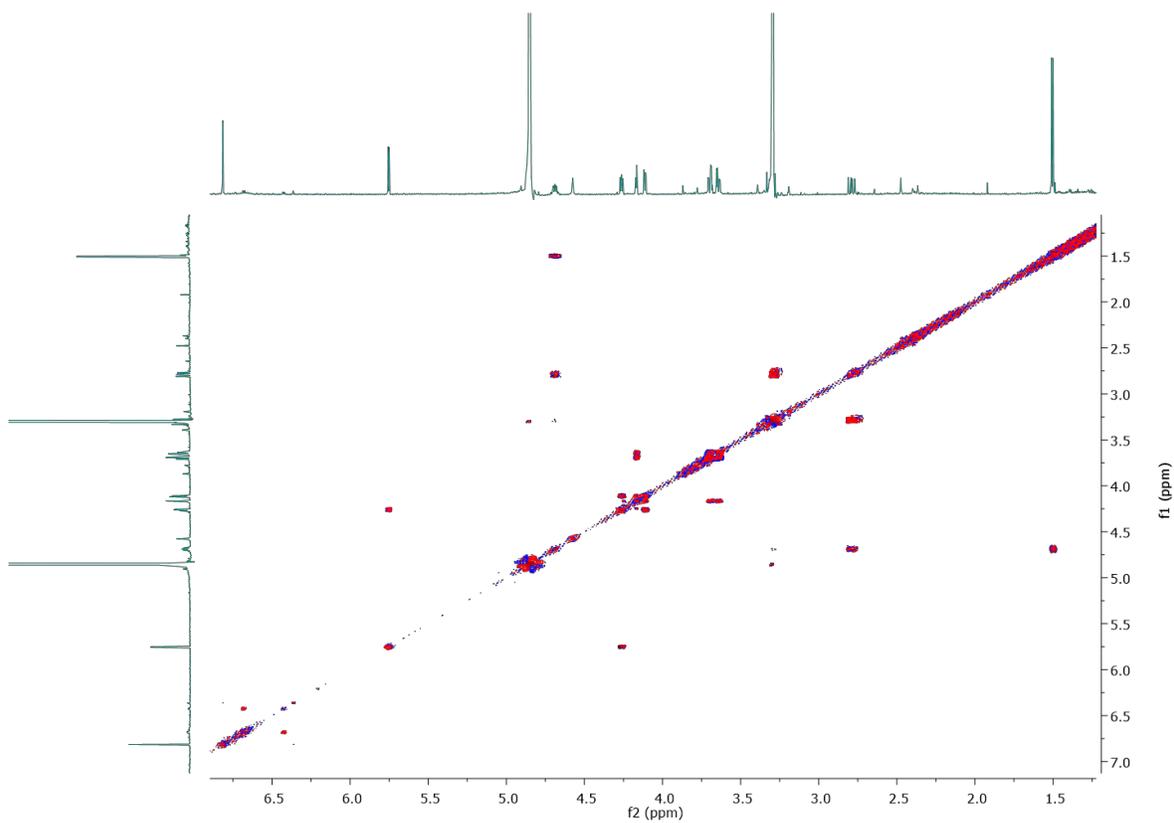


Figura S10. Experimento COSY para el compuesto **71**.

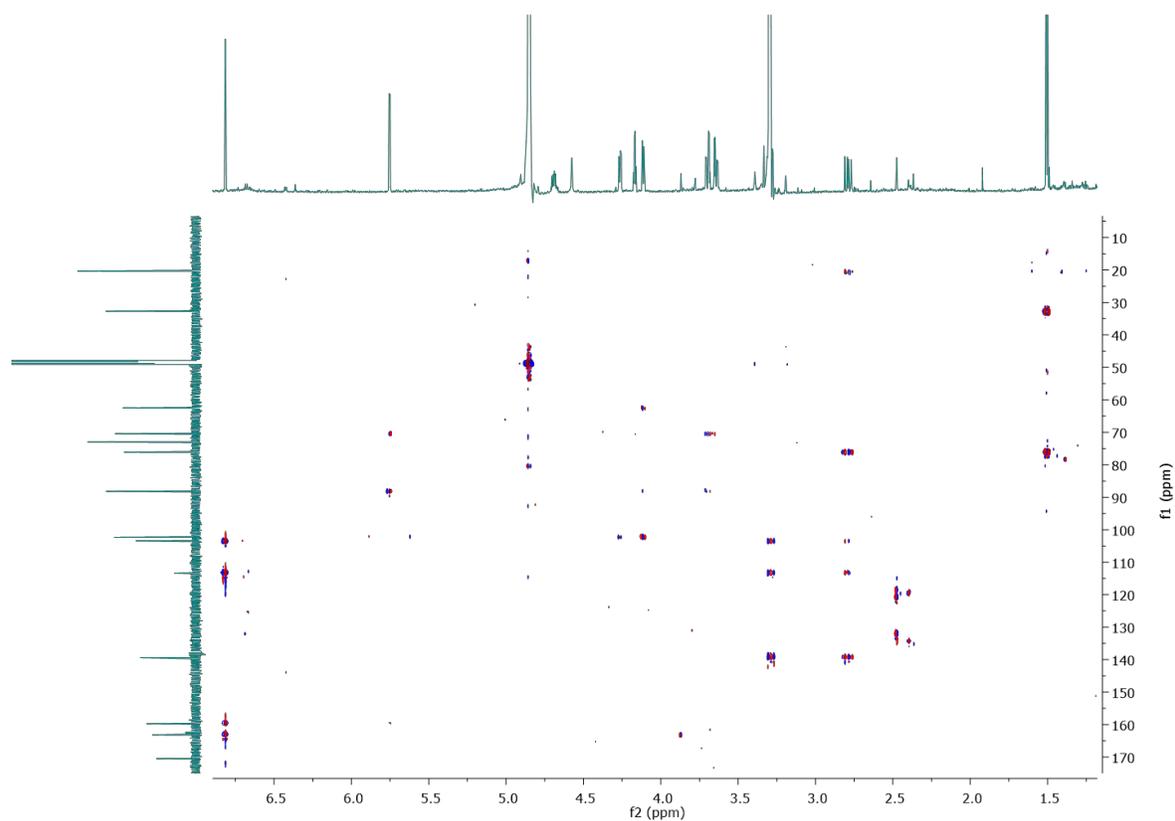


Figura S11. Experimento HMBC para el compuesto 71.

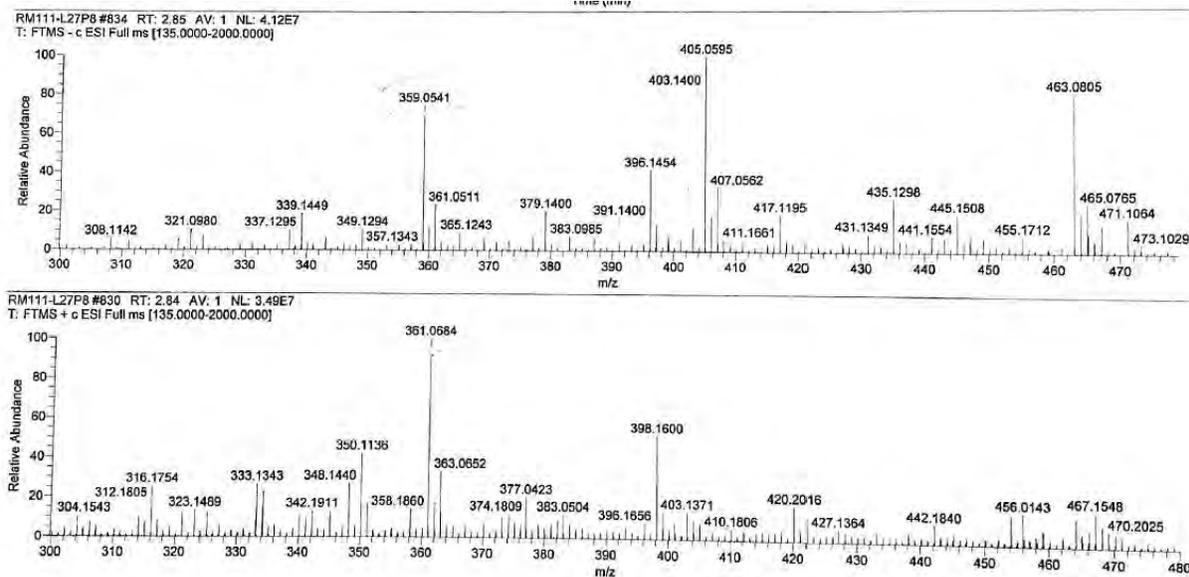


Figura S12. Espectro de masas del compuesto 71.

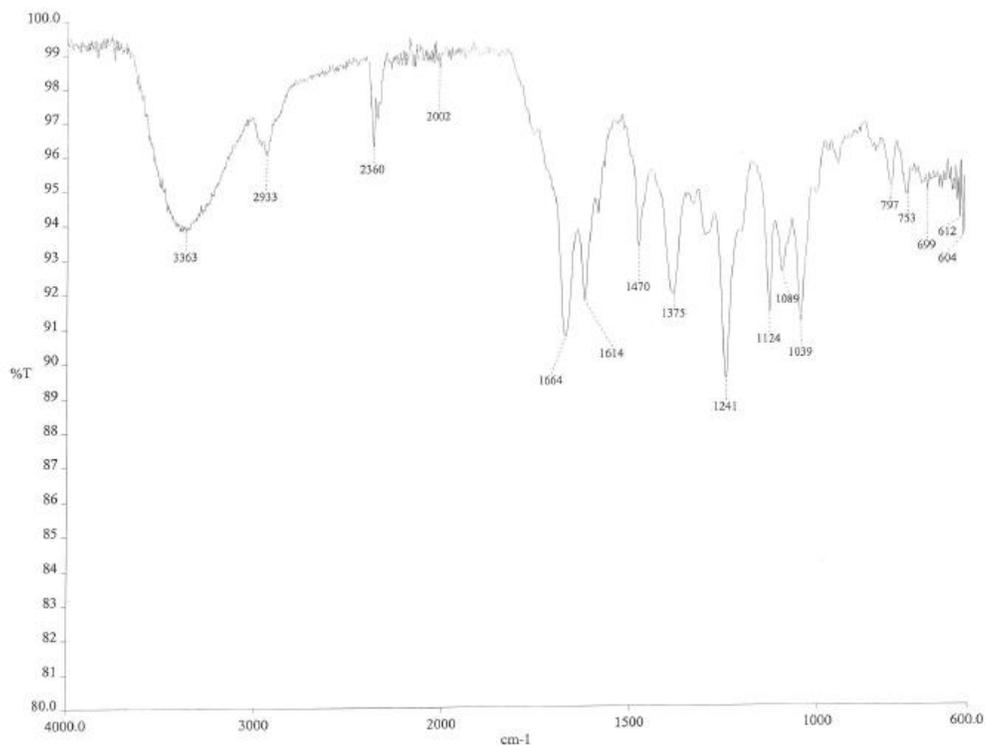


Figura S13. Espectro en el IR del compuesto **71**.

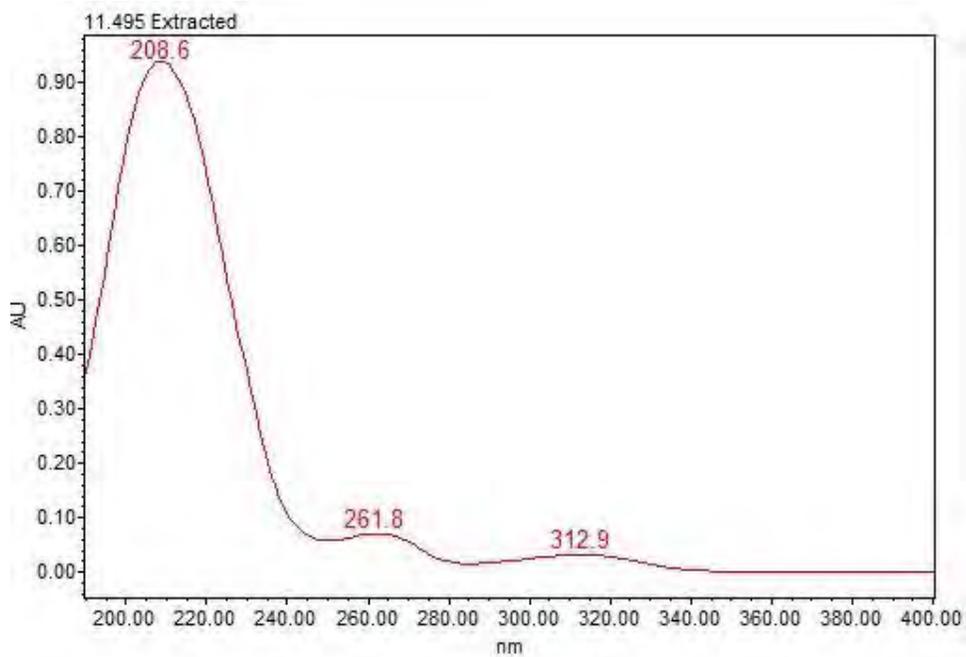


Figura S14. Espectro en el UV del compuesto **71**.

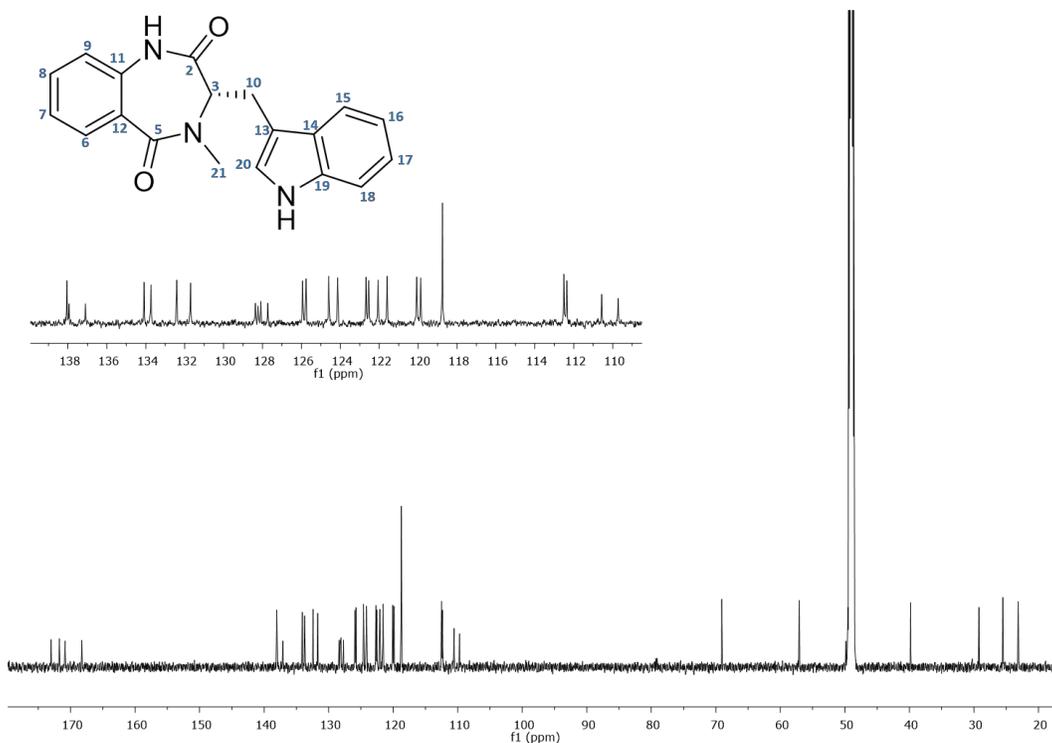


Figura S15. Espectro RMN-¹³C del (S)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**) en CD₃OD.

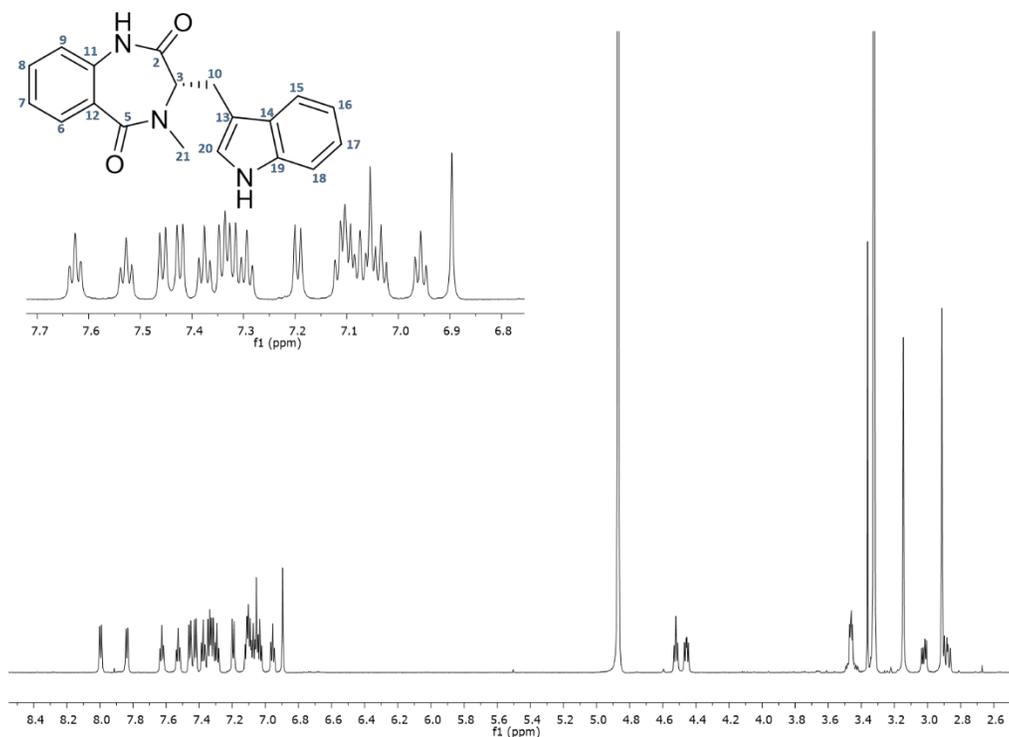


Figura S16. Espectro RMN-¹H del (S)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**) en CD₃OD.

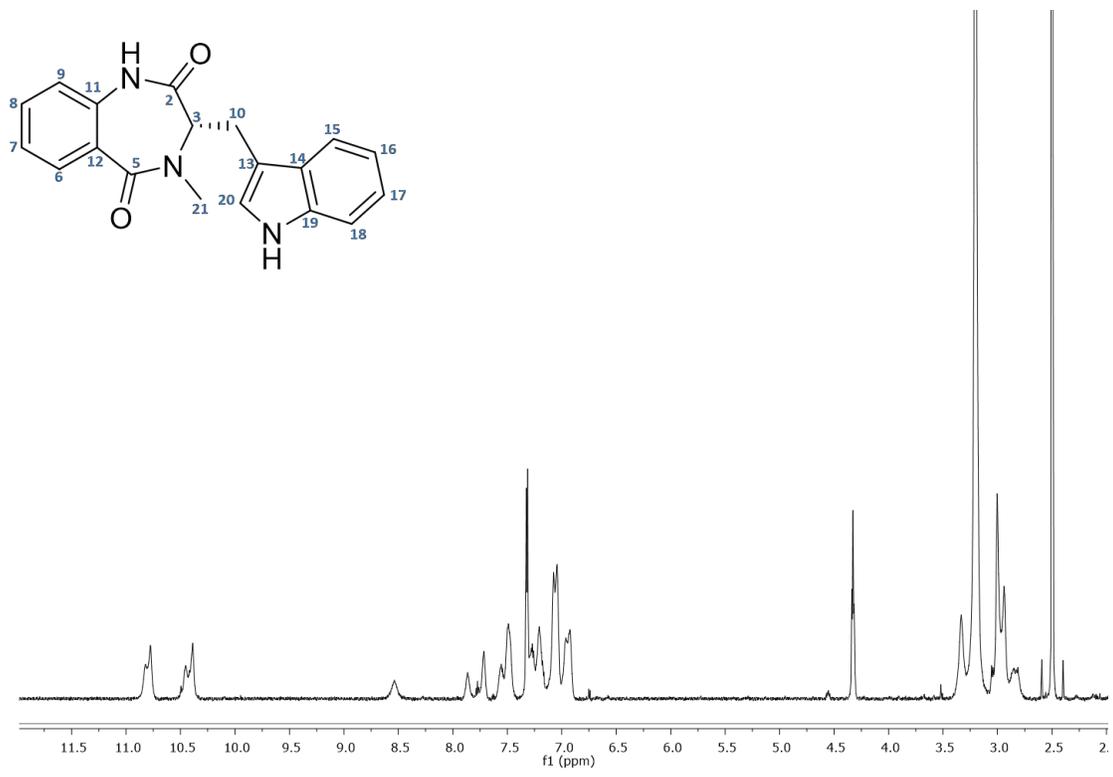


Figura S17. Espectro RMN-¹H del (*S*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**72**) en DMSO-*d*₆ a 50 °C.

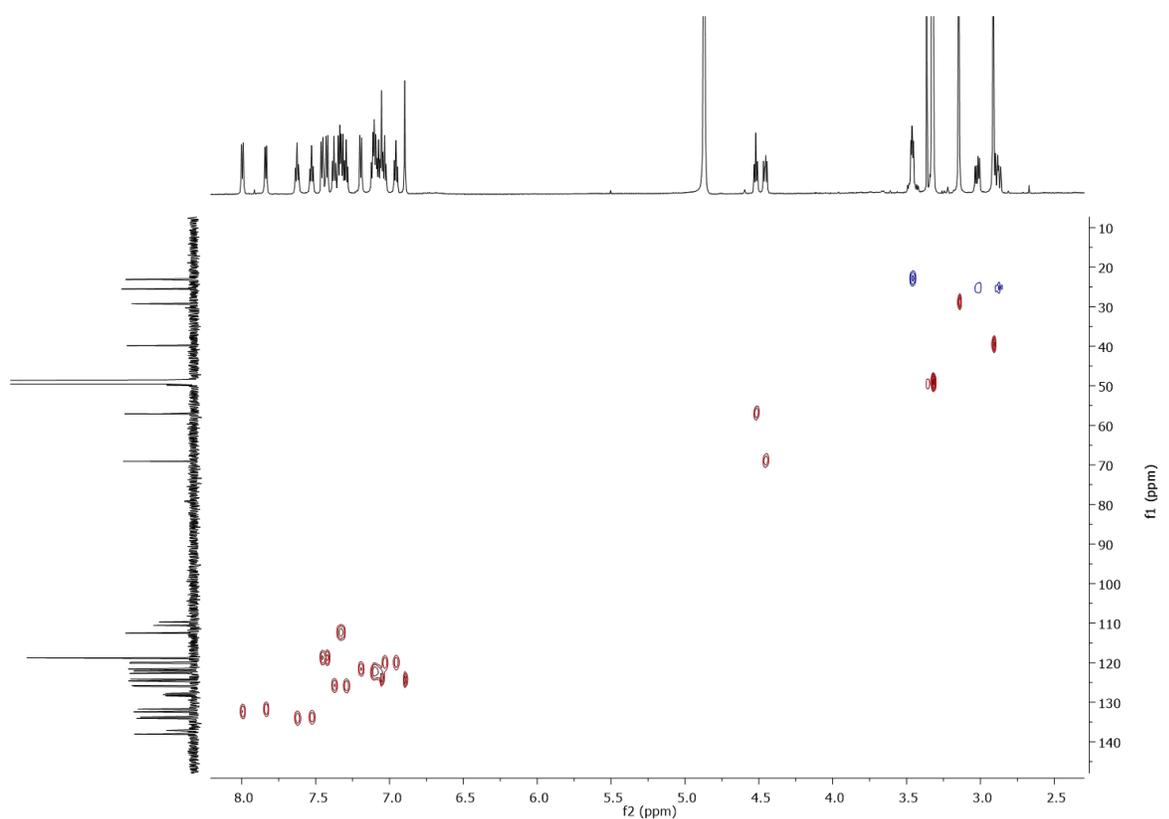


Figura S18. Experimento HSQC del compuesto **72**.

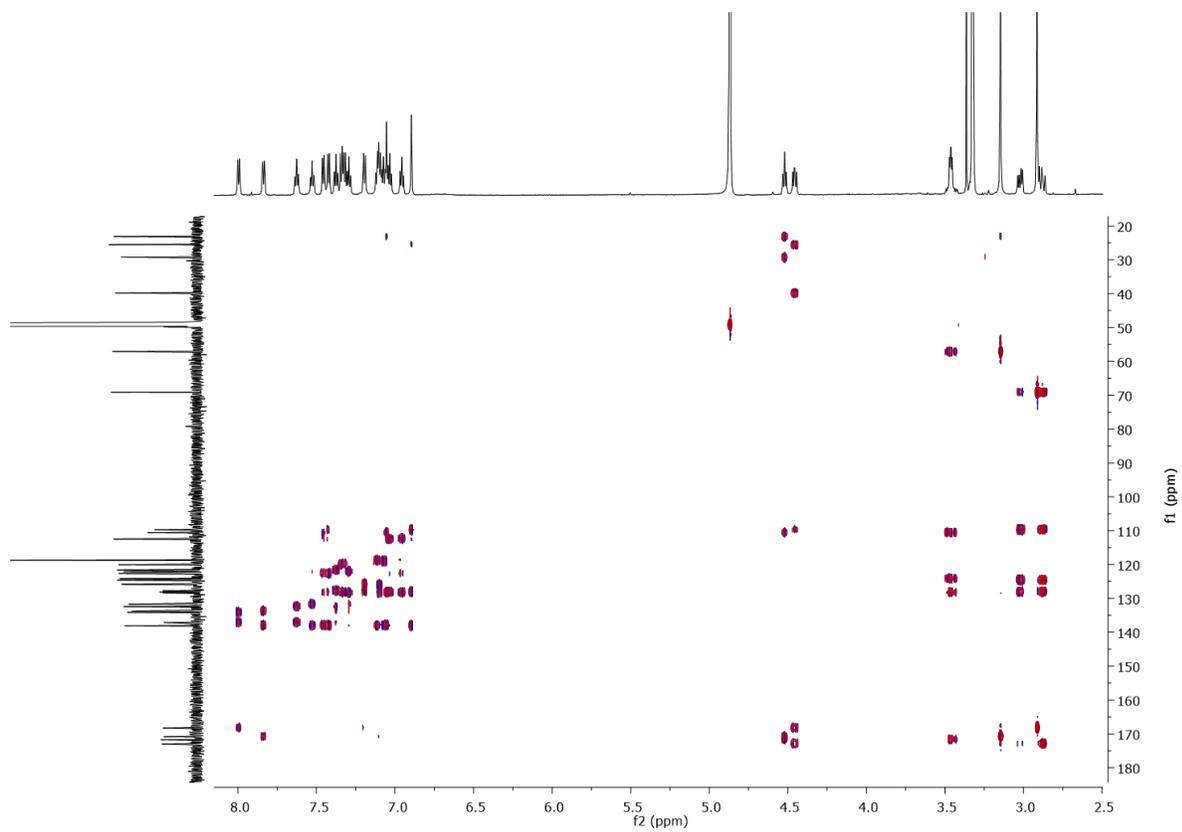


Figura S19. Experimento HMBC del compuesto 72.

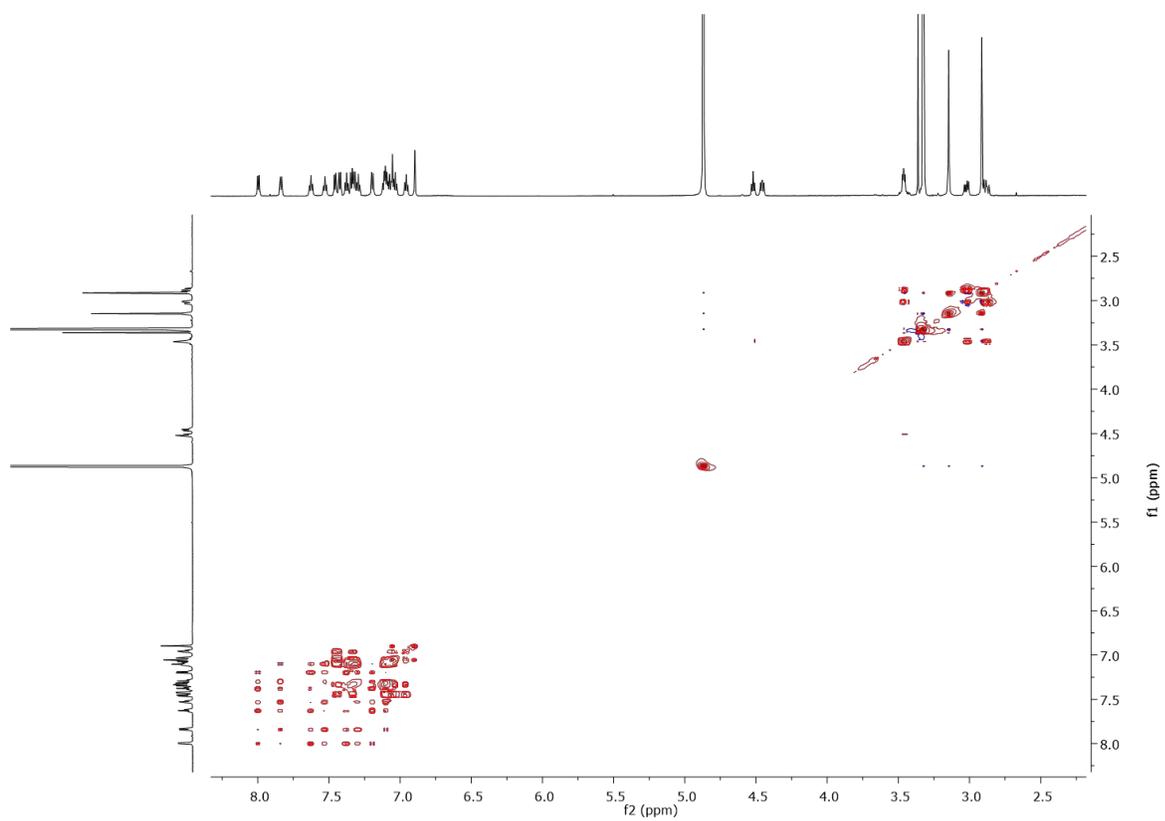


Figura S20. Experimento TOCSY para el compuesto 72.

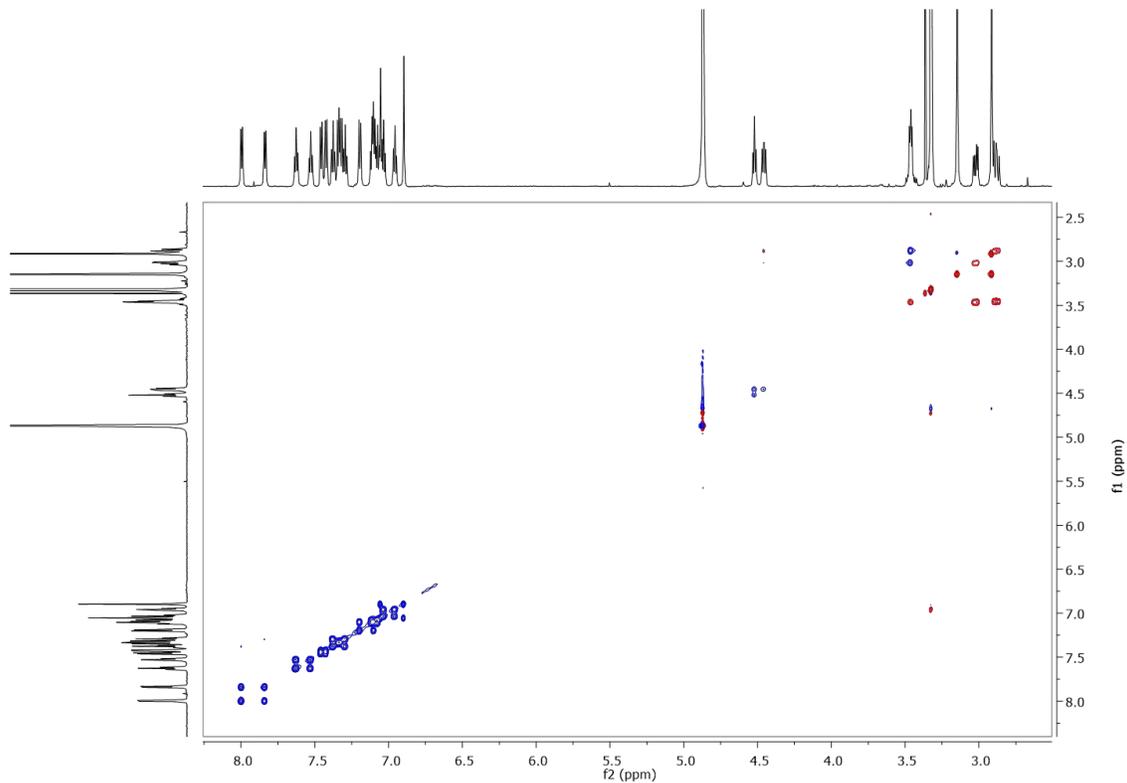
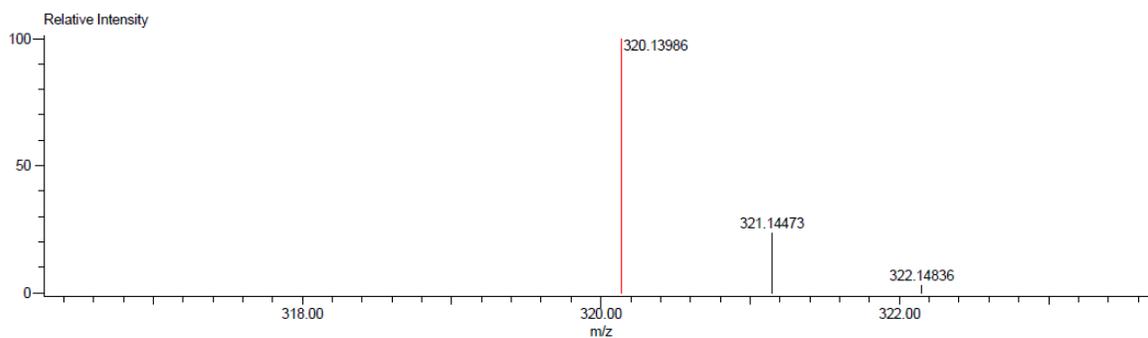


Figura S21. Experimento ROESY para el compuesto **72**.

Data: 1821 MR12-L2710
 Sample Name: Dr Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 50, Area]; Correct Base [80.0%]]; Correct Base [5.0%]; Average (MS [1] 1..1)
 Acquired: 8/21/2017 11:50:36 AM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: Cal Peg 600
 Created: 8/29/2017 1:58:56 PM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1
 Element: ¹²C: 0 .. 19, ¹H: 0 .. 30, ¹⁴N: 0 .. 3, ¹⁶O: 0 .. 2
 Tolerance: 50.00 (mmu)
 Unsaturation Number: 0.0 .. 30.0 (Fraction: Both)



| Mass | Intensity | Calc. Mass | Mass Difference (mmu) | Mass Difference (ppm) | Possible Formula | Unsaturation Number |
|-----------|-----------|------------|-----------------------|-----------------------|--|---------------------|
| 320.13986 | 77927.71 | 320.13990 | -0.04 | -0.13 | ¹² C ₁₉ ¹ H ₁₈ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₂ | 12.5 |

Figura S22. Espectro de masas del compuesto **72**.

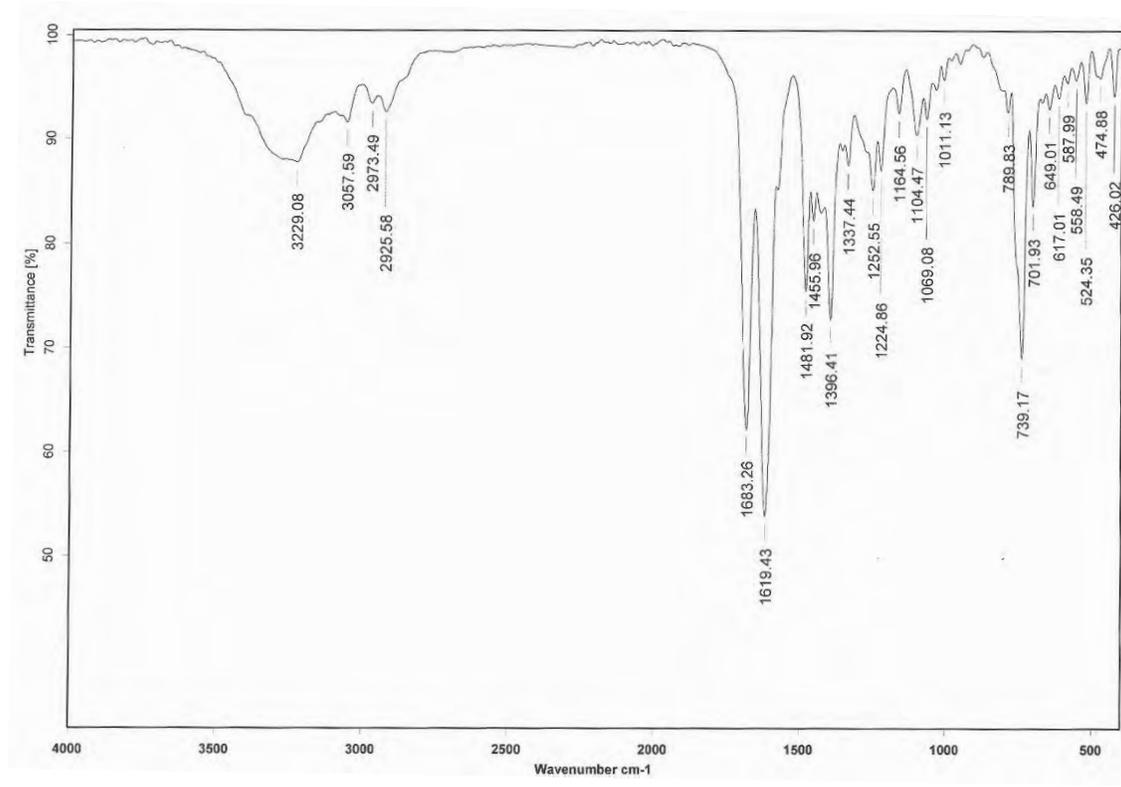


Figura S23. Espectro en el IR del compuesto 72.

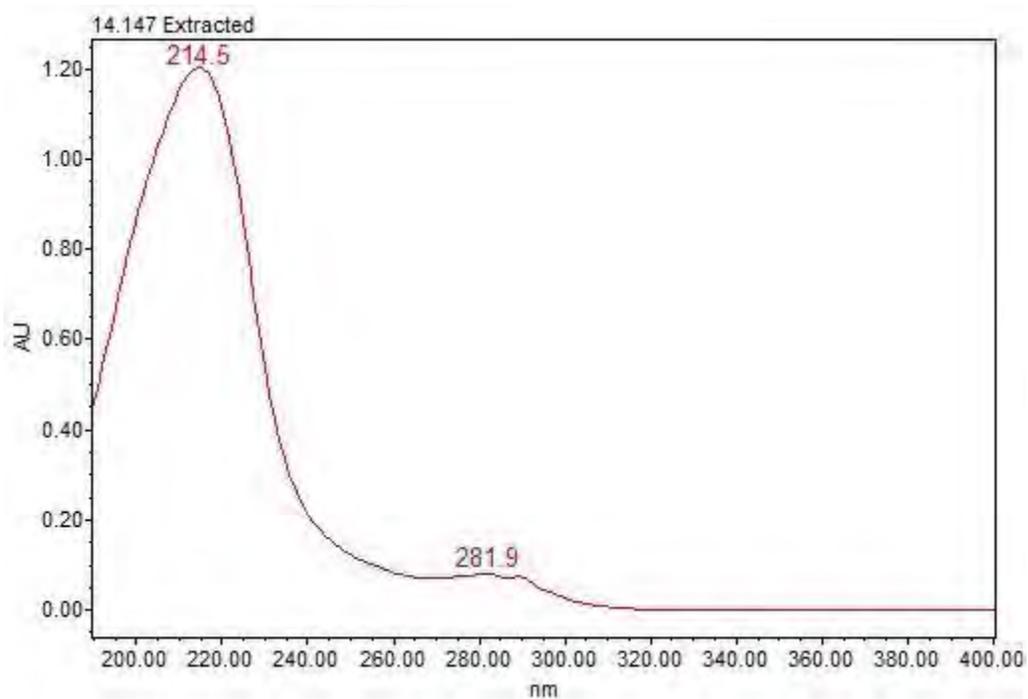


Figura S24. Espectro en el UV del compuesto 72.

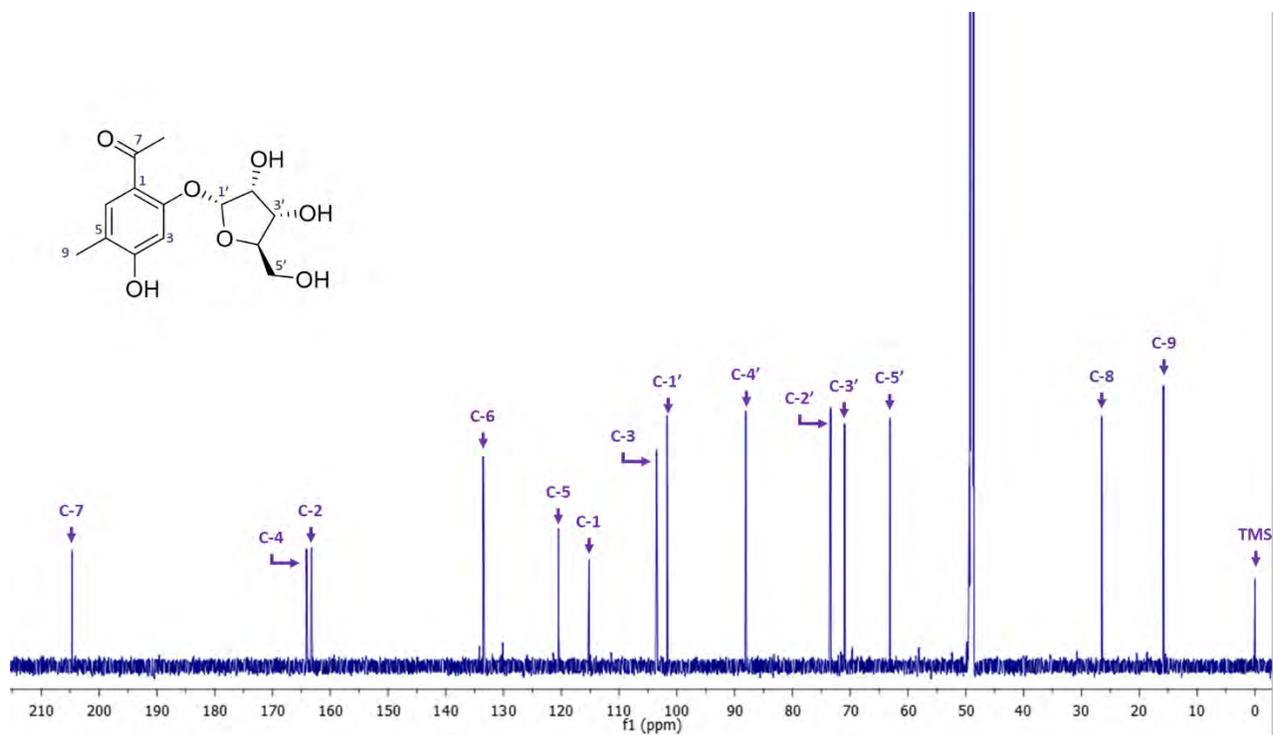


Figura S25. Espectro RMN-¹³C del 4-hidroxi-2-O- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**) en CD₃OD.

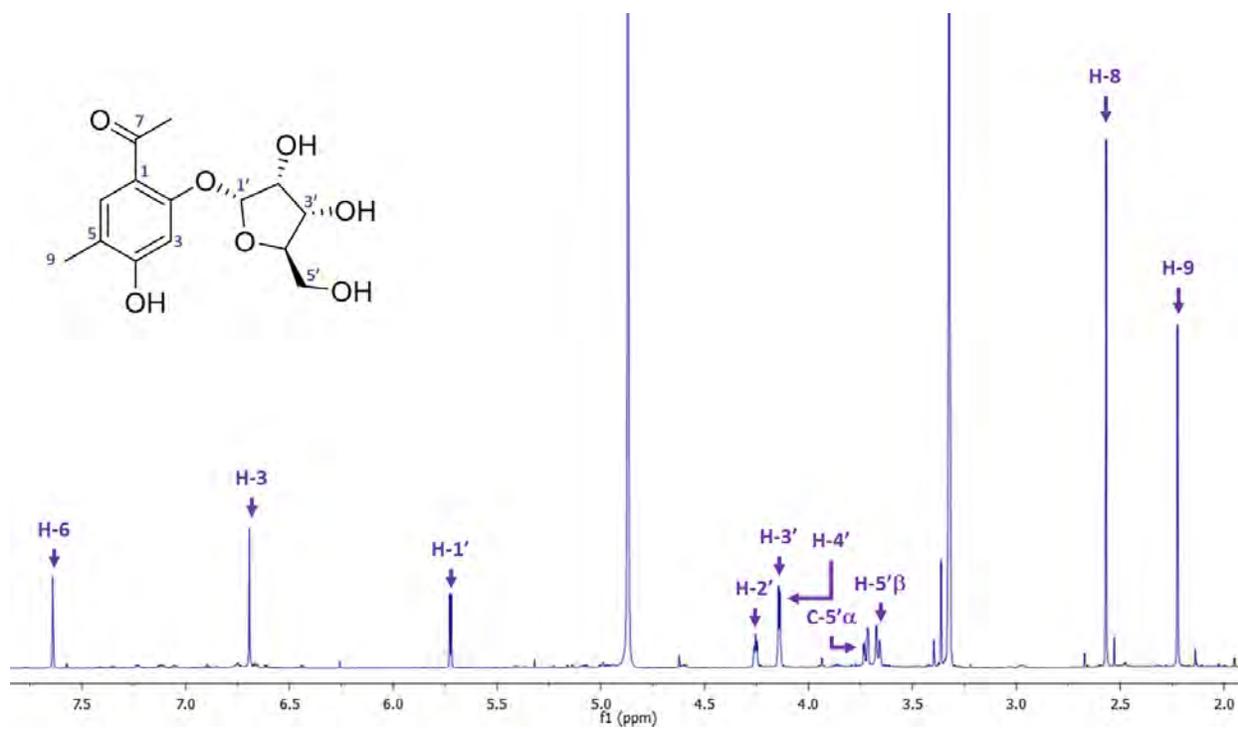


Figura S26. Espectro RMN-¹H del 4-hidroxi-2-O- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**73**) en CD₃OD.

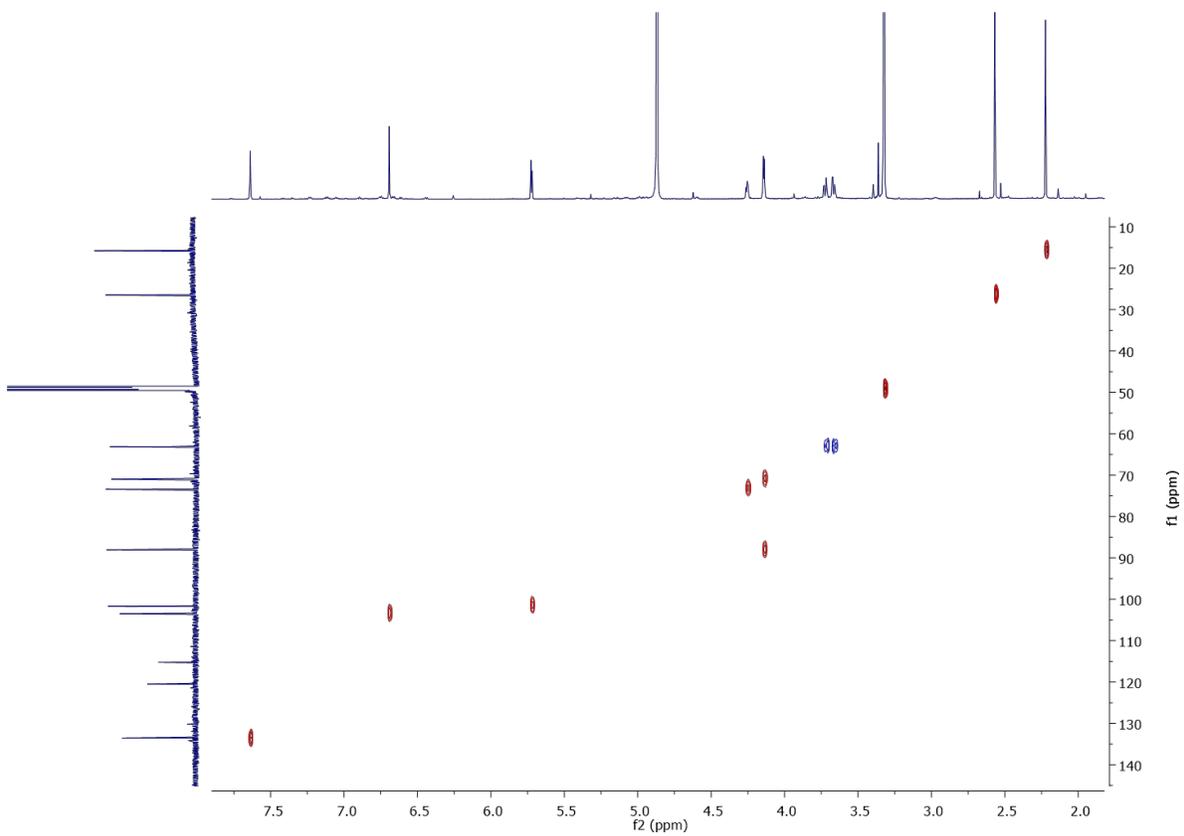


Figura S27. Experimento HSQC del compuesto **73**.

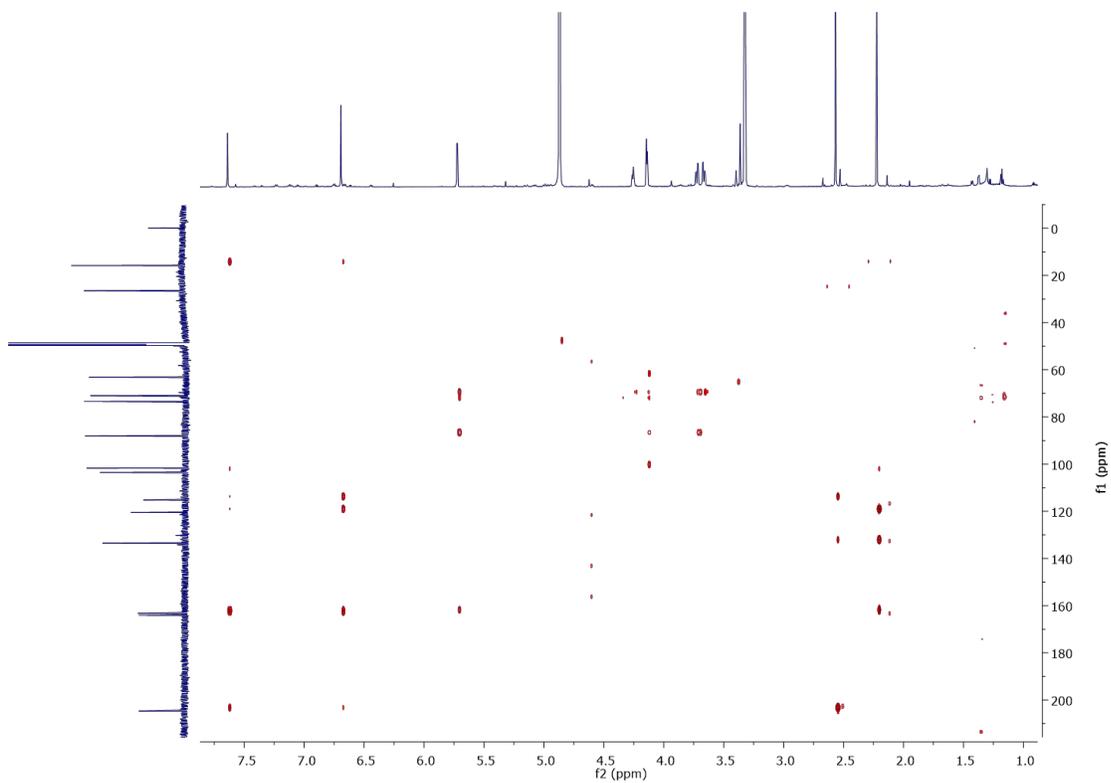


Figura S28. Experimento HMBC del compuesto **73**.

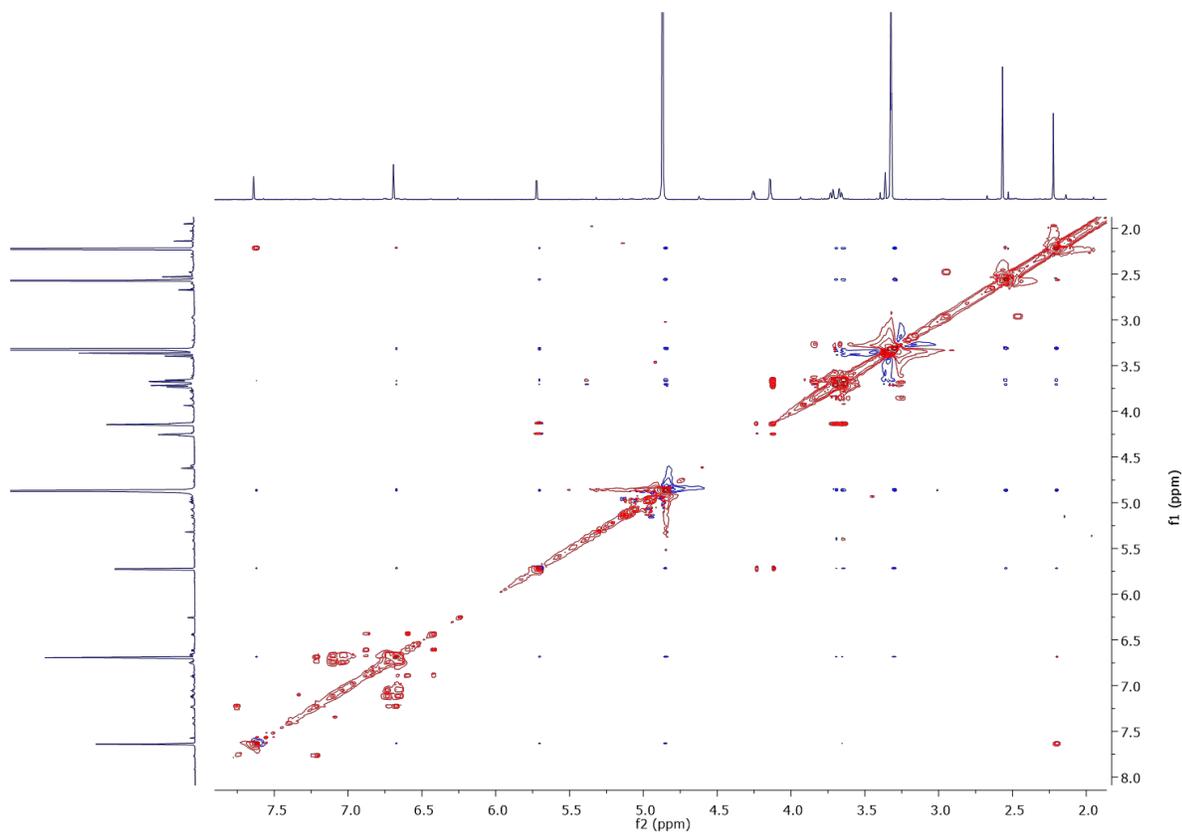
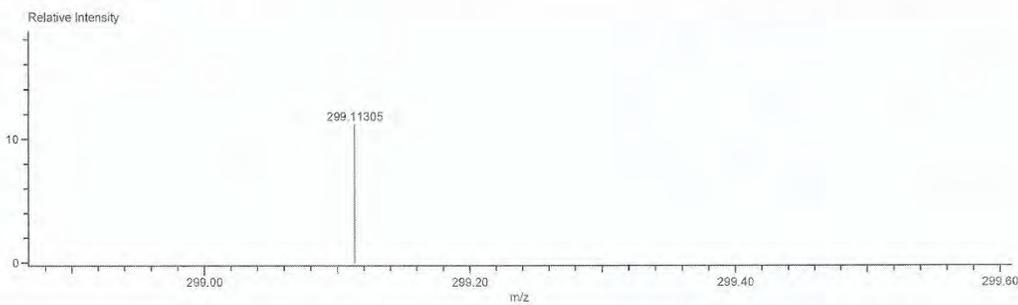


Figura S29. Experimento TOCSY del compuesto 73.

Data: 1845 MR12-M5
 Sample Name: Dr Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[80.0%]];Correct Base[5.0%];Average[MS[1] 1..1)
 Acquired: 8/31/2017 12:54:56 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: Cal Peg 600
 Created: 9/1/2017 11:51:36 AM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1
 Element: ¹²C: 0 .. 16, ¹H: 0 .. 29, ¹⁶O: 0 .. 7
 Tolerance: 3.00 (mmu)
 Unsaturation Number: 0.0 .. 30.0 (Fraction: Both)



| Mass | Intensity | Calc. Mass | Mass Difference (mmu) | Mass Difference (ppm) | Possible Formula | Unsaturation Number |
|-----------|-----------|------------|-----------------------|-----------------------|---|---------------------|
| 299.11305 | 30417.29 | 299.11308 | -0.03 | -0.09 | ¹² C ₁₄ ¹ H ₁₈ ¹⁶ O ₇ | 5.5 |

Figura S30. Espectro de masas del compuesto 73.

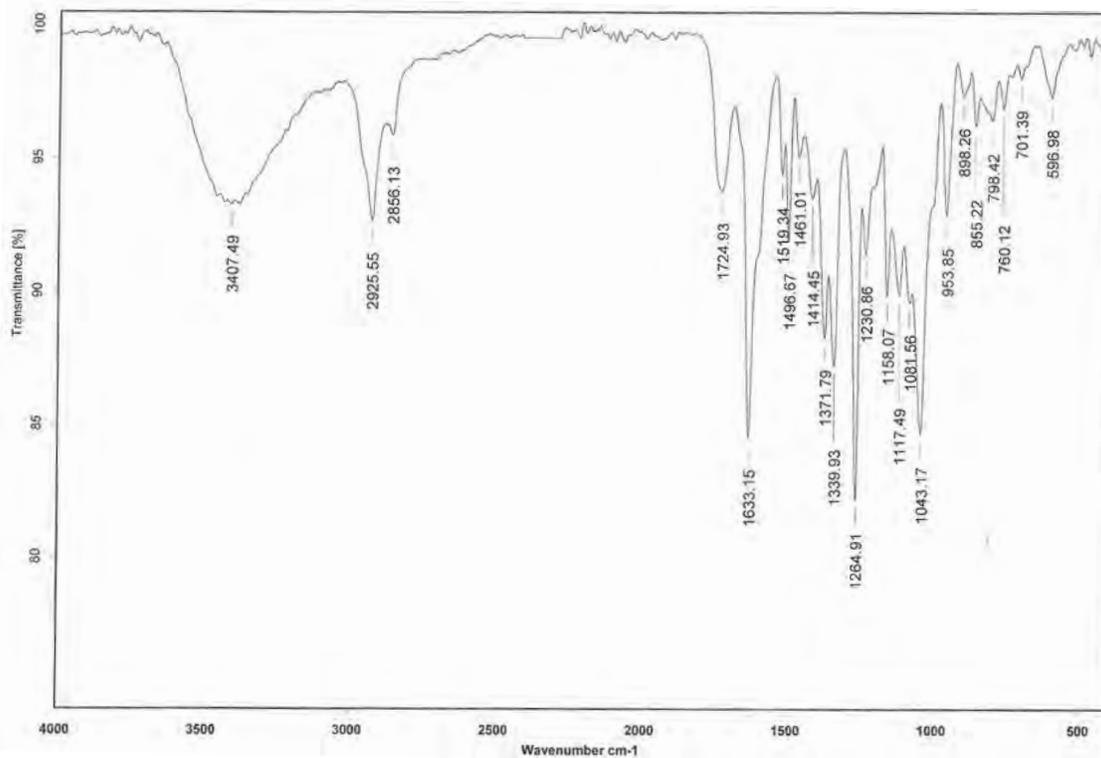


Figura S31. Espectro en el IR del compuesto **73**.

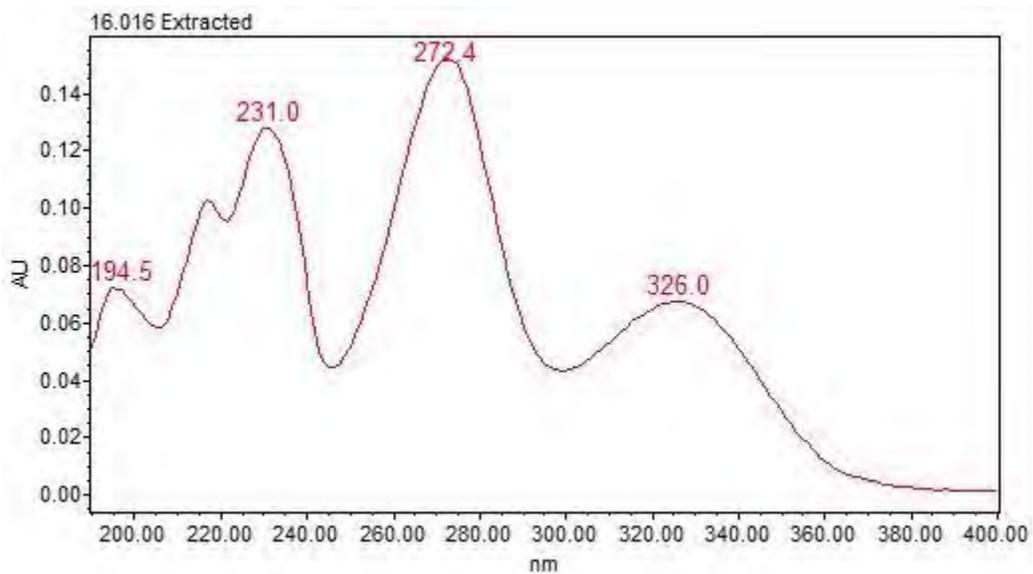


Figura S32. Espectro en el UV del compuesto **73**.

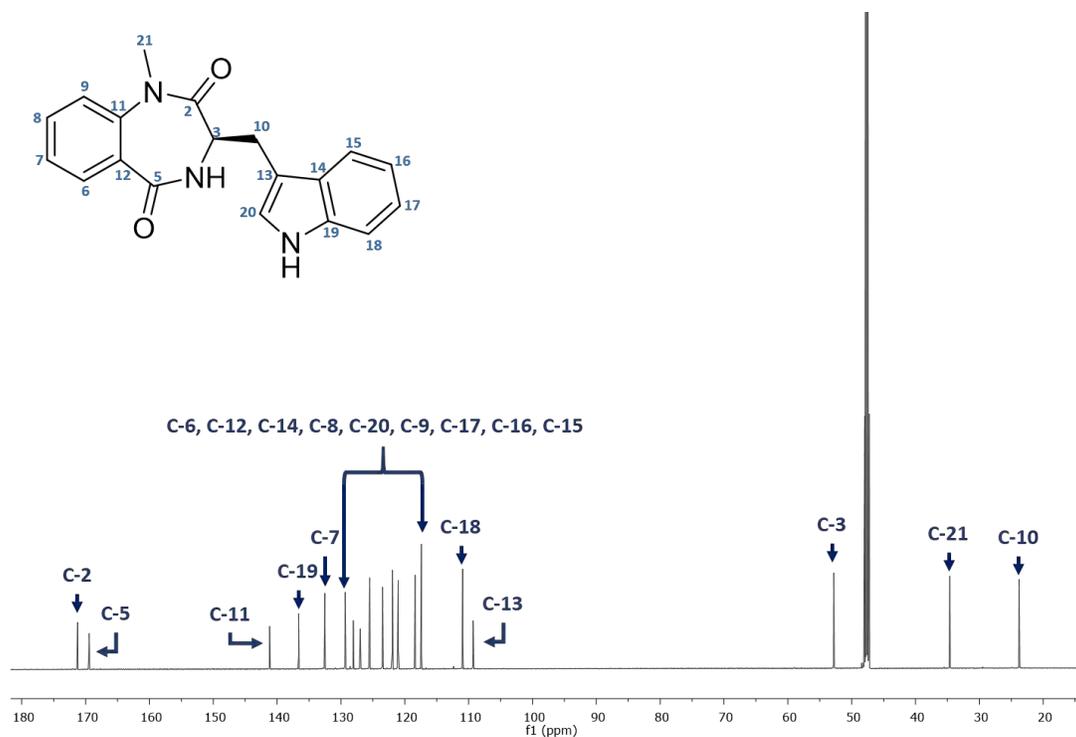


Figura S33. Espectro RMN-¹³C del (R)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-1-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**76**) en CD₃OD.

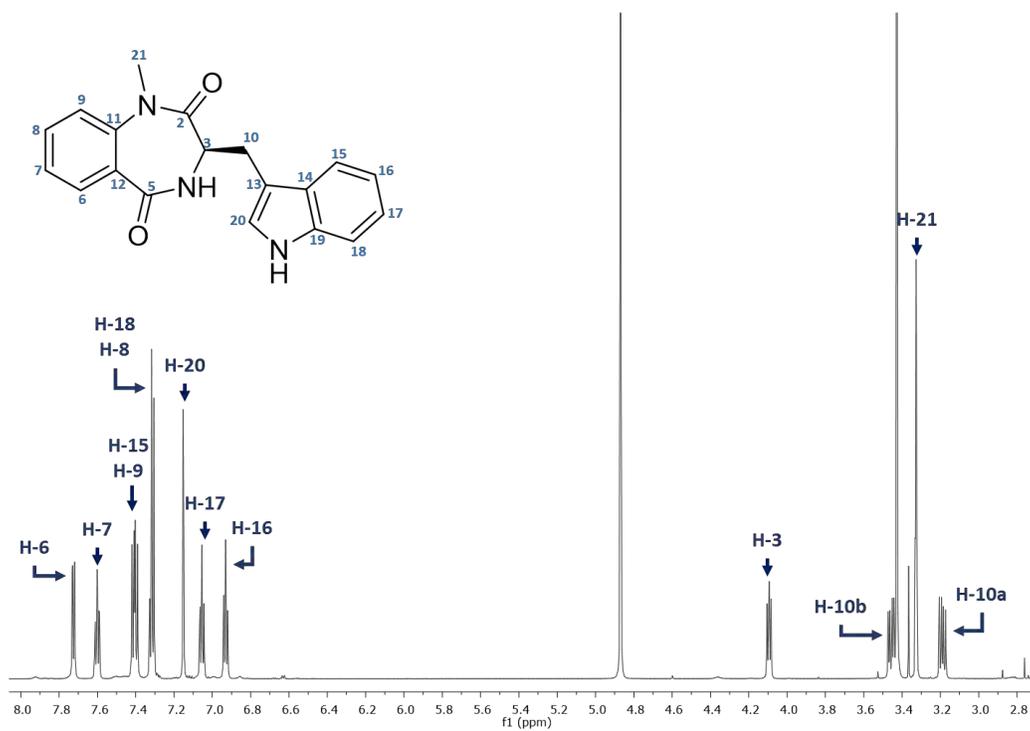


Figura S34. Espectro RMN-¹H del (R)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-1-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**76**) en CD₃OD.