UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN FÚNGICO CON ACTIVIDAD PARA EL CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS TIPO II

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Blanca Daniela Martínez Aviña

Cuidad Universitaria, CDMX, 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Rachel Mata Essayag

VOCAL: Dr. Luis Alejandro Díaz Flores

SECRETARIO: Dr. José Alberto Rivera Chávez

1er SUPLENTE: Q.F.B. Genaro Jiménez Reyes

2do SUPLENTE: M. en C. Adriana Berenice Pérez Jiménez

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio 2-6, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

_____

Dr. José Alberto Rivera Chávez

SUSTENTANTE:

_____

Blanca Daniela Martínez Aviña

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado a través del proyecto de infraestructura No. 295057.

- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el financiamiento otorgado mediante el proyecto PAPIIT-IA200818.

Índice

1. Introducción 1

2. Objetivos 2
2.1 Objetivo general 2
2.2 Objetivos particulares 2

3. Hipótesis 3

4. Antecedentes 4
4.1 Diabetes Mellitus 4
4.1.1 Generalidades y tipos 4
4.1.2 Prevalencia 5
4.1.3 Tratamiento para la DMTII 6
4.2 Enzimas α-glucosidasas 8
4.2.1 Generalidades 8
4.2.2 Importancia en el tratamiento de la DMTII 9
4.2.3 Inhibidores de las enzimas α-glucosidasas 9
4.3 Productos naturales 11
4.3.1 Generalidades 11
4.3.2 Microorganismos fúngicos como fuente de productos naturales 11
4.4 Género *Penicillium* 14
4.4.1 Generalidades 14

5. Metodología 26
5.1 Obtención de muestras para el aislamiento de especies fúngicas 26
5.2 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos 27
5.3 Obtención de los extractos orgánicos 28
5.4 Procedimientos cromatográficos generales 28
5.5 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.. 29
5.6 Estandarización del ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata 29
5.6.1 Curva patrón de *p*-NP 29
5.6.2 Efecto de la concentración de sustrato y volumen de enzima 30

5.6.3 Curva de saturación por sustrato *p*-NPG 30
5.6.4 Curva de inhibición con acarbosa 30
5.7 Ensayo de inhibición de α-glucosidasas 31
5.8 Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado 32
5.9 Obtención del perfil cromatográfico del extracto orgánico de *Penicillium* sp. 32
5.10 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *Penicillium* sp. 33
5.11 Evaluación del efecto de curvularina (**49**) sobre la actividad de la enzima α-glucosidasa 33

6. Resultados y discusión 34
6.1 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos 34
6.2 Obtención de los extractos orgánicos 35
6.3 Estandarización del ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata 37
6.3.1 Curva patrón de *p*-NP 37
6.3.2 Efecto de la concentración de sustrato *p*-NPG y volumen de enzima 37
6.3.3 Curva de saturación por sustrato *p*-NPG 38
6.3.4 Curva de inhibición con acarbosa (**1**) 39
6.4 Ensayo de inhibición de α-glucosidasas 40
6.5 Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado 42
6.6 Estudio químico del extracto activo de la especie *Penicillium* sp. 42
6.7 Obtención y elucidación estructural de curvularina (**49**) 43
6.8 Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de *Penicillium* sp. 49
6.9 Evaluación del efecto de curvularina (**49**) sobre la actividad de la enzima α-glucosidasa 50

7. Conclusiones 52

8. Perspectivas 53

9. Bibliografía 54

Lista de figuras

Figura 1. Panorama mundial de personas con diabetes mellitus 6

Figura 2. Enzimas α-glucosidasas. (a) Familia GH13 (*Saccharomyces cerevisiae*) (b) Familia GH31 (humana)..... 8

Figura 3. Efecto de los inhibidores de las enzimas α-glucosidasas 9

Figura 4. Distribución de algunos hongos del género *Penicillium*. 14

Figura 5. Ubicación del municipio de Chapantongo, Hgo. 26

Figura 6. Rama de árbol con líquenes de diferente morfología en su superficie.. 26

Figura 7. Microorganismos fúngicos aislados 34

Figura 8. Cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos orgánicos con sistema de elución CH_2Cl_2:MeOH 95:5. C, Cheerios®; R, arroz y Erg Ergosterol. 36

Figura 9. Curva patrón de *p*-NP..... 37

Figura 10. Efecto de la concentración de sustrato *p*-NPG y volumen de enzima. 38

Figura 11. Curva de saturación por sustrato *p*-NPG 38

Figura 12. Curva de inhibición con acarbosa..... 39

Figura 13. Porcentaje de inhibición de las enzimas α-glucosidasas, (a) enzima de *Saccharomyces cerevisiae*, (b) enzima de intestino de rata 41

Figura 14. Microorganismo fúngico seleccionado IQ-168, (a) crecimiento en caja de Petri con APD (aislamiento), (b) crecimiento en caja de Petri con APD (resiembra), (c) crecimiento de aproximadamente 30 días en arroz. 41

Figura 15. Árbol filogenético del microorganismo fúngico IQ-168 42

Figura 16. Espectro de masas por DART de la curvularina (**49**) 43

Figura 17. Espectro de RMN-^{1}H (500 MHz, MeOD) de la curvularina (**49**) 46

Figura 18. Espectro de RMN-^{13}C (125 MHz, MeOD) de la curvularina (**49**) 46

Figura 19. Unidades estructurales parciales del compuesto (**49**) 47

Figura 20. Correlaciones observadas en los espectros bidimensionales HMBC y COSY 47

Figura 21. Espectro bidimensional COSY de la curvularina (**49**) 47

Figura 22. Espectro bidimensional HSQC de la curvularina (**49**) 48

Figura 23. Espectro bidimensional HMBC de la curvularina (**49**) 48

Figura 24. Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de *Penicillium* sp. (a) medio de cultivo de Cheerios®, (b) medio de cultivo de arroz. 50

Figura 25. Curva de concentración-respuesta. 51

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de la diabetes mellitus 5

Tabla 2. Tipos de fármacos antihiperglucémicos e hipoglucemiantes y su mecanismo de acción 7

Tabla 3. Inhibidores de α-glucosidasas de origen fúngico 12

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* 16

Tabla 5. Ejemplos de metabolitos con actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas aislados de diferentes especies del género *Penicillium* 23

Tabla 6. Distribución para el ensayo de inhibición de α-glucosidasas 31

Tabla 7. Condiciones experimentales para la obtención del perfil cromatográfico 32

Tabla 8. Número de microorganismos aislados y clave asignada 34

Tabla 9. Microorganismos seleccionados y rendimientos de los extractos orgánicos 36

Tabla 10. Concentración y volumen estandarizados para el ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata 39

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C de la curvularina (**49**) en MeOD (^{1}H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz) 45

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
$[\alpha]_D^{25}$	Rotación óptica específica a 25 °C
A	Absorbancia
APD	Agar papa-dextrosa
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
c	Concentración
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CH_2Cl_2	Diclorometano
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
d	Señal doble
ddd	Señal doble de doble de doble
EM	Espectrometría de masas
DART	EM modalidad ionización por análisis directo en tiempo real
DMTI	Diabetes mellitus tipo I
DMTII	Diabetes mellitus tipo II
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-4	Proteína dipeptidil peptidasa 4
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo
g	Gramos
GH	Glucósido-hidrolasa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
h	horas
Hz	Hertz

HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
Hsp90	Proteína 90
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
HTS	*High Throughput Screening*
IDF	Federación Internacional de Diabetes
ITS	*Internal transcribed spacer*
J	Constante de acoplamiento
LPS	Lipopolisacáridos
MeCN	Acetonitrilo
MHz	MegaHertz
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
m	Señal múltiple
mult.	Multiplicidad de las señales
N	Norte
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NO	Óxido nítrico
nm	Nanómetros
O	Oeste
PDA	Detector de Arreglo de Fotodiodos
PDB	Caldo papa dextrosa
P.f.	Punto de fusión
p-NPG	*p*-nitrofenil-α-D-glucopiranósido
p-NP	*p*-nitrofenol

PGE_2	Prostaglandina E_2
PPAR-γ	Receptores activados por proliferadores Peroxisomales γ
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN-^{1}H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
SGLT2	Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2
UV	Ultravioleta
U	Unidades
V	Volumen
δ	Desplazamiento químico
δ_C	Desplazamiento químico de carbono
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno
λ	Longitud de onda
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar

1. Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica degenerativa caracterizada por hiperglucemia, deficiencia en la secreción de insulina y/o resistencia a la acción de esta hormona (Ríos *et al.*, 2015).

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), alrededor de 500 millones de personas padecen diabetes en el mundo y México se encuentra entre los 10 primeros países con mayor incidencia de personas adultas que padecen dicha enfermedad. La diabetes tipo II es la más frecuente, y representa alrededor del 90% de los casos (Malathi *et al.*, 2010). Por lo tanto, es de gran importancia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden al tratamiento, prevención o retraso de su desarrollo.

Las estrategias implementadas para su tratamiento incluyen cambios en el estilo de vida y el uso de agentes terapéuticos tanto de origen sintético como fuentes naturales, por ejemplo acarbosa y voglibosa, obtenidos de microorganismos de los géneros *Actinoplanes* y *Streptomyces* (Ríos *et al*., 2015).

Investigaciones recientes colocan a los hongos microscópicos como una fuente potencial de nuevos metabolitos, con posible aplicación en el tratamiento o prevención de la diabetes, debido a su gran capacidad de sintetizar compuestos bioactivos, su gran variedad y diversidad de sus hábitats (Schueffler & Anke, 2014; Azzollini et al., 2018).

Considerando lo anterior y aunado a la gran biodiversidad de México, el presente trabajo se enfocó en la búsqueda de nuevos agentes inhibidores de las enzimas α-glucosidasas, un blanco farmacológico para el tratamiento de la diabetes, a partir del aislamiento de microorganismos fúngicos de muestras de tierra de hormiguero y de liquen obtenidas del estado de Hidalgo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Aislar e identificar metabolitos secundarios fúngicos con actividad inhibitoria de las enzimas α-glucosidasas, a partir de especies fúngicas de muestras de hormiguero y de liquen, para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

2.2 Objetivos particulares

- Aislar y cultivar los microorganismos fúngicos de muestras obtenidas del estado de Hidalgo
- Obtener el extracto orgánico de los microorganismos cultivados
- Estandarizar el ensayo de inhibición de las enzimas α-glucosidasas de intestino de rata
- Evaluar el potencial inhibitorio sobre la actividad hidrolasa de las enzimas α-glucosidasas de los extractos orgánicos
- Identificar taxonómicamente el microorganismo fúngico activo seleccionado
- Aislar los metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico activo seleccionado mediante técnicas cromatográficas
- Caracterizar químicamente los metabolitos secundarios aislados utilizando técnicas espectrométricas y espectroscópicas
- Evaluar la actividad de los metabolitos aislados como inhibidores de las enzimas α-glucosidasas

3. Hipótesis

El estudio químico de al menos uno de los microorganismos fúngicos aislados de muestras de hormiguero y de liquen permitirá el aislamiento de compuestos con actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

4. Antecedentes

4.1 Diabetes Mellitus

4.1.1 Generalidades y tipos

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica degenerativa que se caracteriza por deficiencia en la producción de insulina y/o en su efecto (Abdel y Mohamed, 2018), lo que provoca hiperglucemia y alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas (Malathi *et al*., 2010).

El control de los niveles de glucosa en sangre se efectúa por la actividad de dos hormonas, insulina y glucagón; la primera de ellas es secretada por las células β-pancreáticas en los islotes de Langerhans cuando se presentan altos niveles de glucosa. La insulina es una hormona anabólica que regula no sólo el metabolismo de la glucosa sino también el metabolismo de las grasas y proteínas. Por otro lado, el glucagón es secretado por las células α-pancreáticas, al presentarse una deficiencia de glucosa en sangre. Es una hormona catabólica que se caracteriza por oponerse a los efectos de la insulina (Abdel y Mohamed, 2018).

Por lo tanto, al presentarse una alteración o disminución en la producción de insulina, se genera un estado de hiperglucemia crónica asociada a disfunciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatías) y macrovasculares (enfermedad cardiovascular arterosclerótica, arterial periférica y cerebrovascular), éstas últimas con una mayor incidencia (Díaz y Delgado, 2016).

Existen diferentes tipos de diabetes (**Tabla 1**), sin embargo las más comunes son tipo I y tipo II. La diabetes mellitus tipo I (DMTI), o diabetes mellitus insulino-dependiente, es ocasionada por la falla en la producción de insulina debido a la destrucción autoinmune de las células beta mediada por células T. Por otro lado, la diabetes mellitus tipo II (DMTII), o diabetes mellitus no insulino-dependiente, ocurre en pacientes que tienen resistencia a la insulina y una reducción en su secreción (Tan *et al*., 2019).

Tabla 1. Clasificación de la diabetes mellitus (modificado *de American Diabetes Association*, 2014)

Diabetes mellitus tipo I (DMTI)
Diabetes mellitus tipo II (DMTII)
Otros tipos de diabetes por:
Defectos genéticos de la función de la célula beta
Defectos genéticos en la acción de la insulina
Enfermedad del páncreas exocrino
Endocrinopatías
Diabetes inducida por fármacos
Infecciones
Causas de diabetes mediada por inmunidad
Síndromes genéticos que se asocian con diabetes
Diabetes gestacional

4.1.2 Prevalencia

En la actualidad, de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, alrededor de 500 millones de personas en el mundo padecen diabetes y se estima que para el 2040 aumente a 642 millones (**Figura 1**). Tan sólo en América del Norte y el Caribe existen 46 millones de personas con diabetes y en comparación con otras regiones, tiene un mayor índice de prevalencia (IDF, 2017).

México se encuentra entre los 10 primeros países con alto índice de personas adultas con dicha enfermedad ocupando el quinto lugar. Comparando México con EUA y Canadá, se encuentra en segundo lugar con aproximadamente 12 millones de personas diabéticas, mientras que los otros dos países cuentan con 30.2 y 2.6 millones de diabéticos, respectivamente (IDF, 2017).

El tipo de diabetes más prevaleciente es la DMTII al representar aproximadamente el 90% total de los casos y cuya incidencia aumenta cada año, convirtiéndola en uno de los problemas más graves del siglo XXI. Por lo cual, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en mantener los niveles de

glucosa dentro de los valores de referencia (Munhoz y Frode, 2018) y, así prevenir y/o retrasar el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones.

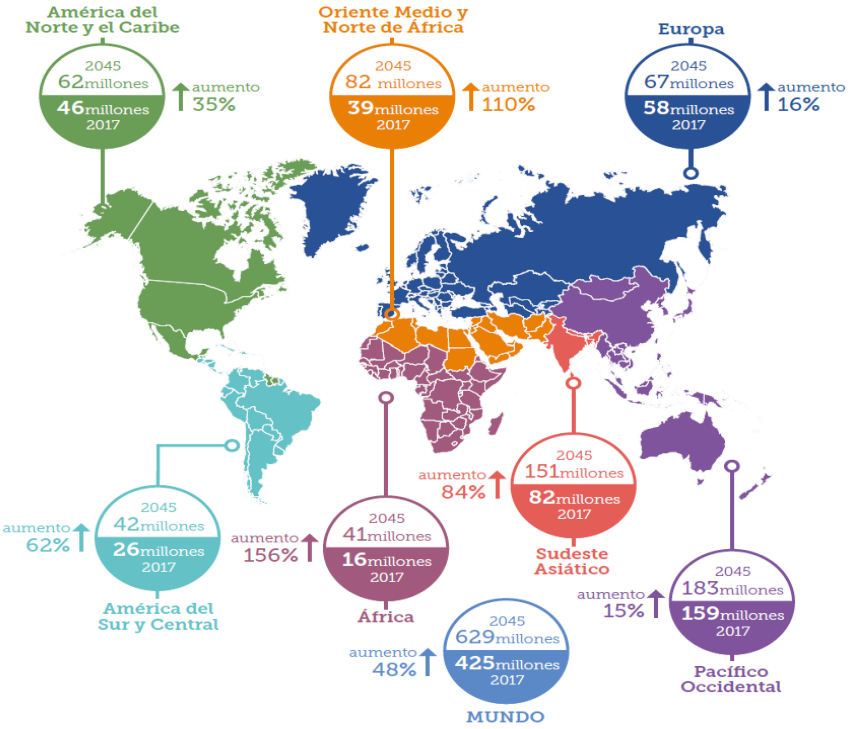


Figura 1. Panorama mundial de personas con diabetes mellitus (tomado de IDF, 2017)

4.1.3 Tratamiento para la DMTII

La DMTII inicialmente puede controlarse mediante el ejercicio y la regulación de la dieta, pero si el nivel de glucosa en sangre no se controla adecuadamente con estas medidas, es necesario emplear fármacos (Zhou *et al*., 2018). Existe una variedad de agentes antihiperglucémicos e hipoglucemiantes con diferentes mecanismos de acción que son capaces de controlar la hiperglucemia (**Tabla 2**).

El fármaco de primera línea más recetado para el tratamiento de la DMTII es la metformina (Abdel y Mohamed, 2018). Este fármaco pertenece a las biguanidas y su mecanismo de acción se basa en reducir la producción de glucosa hepática, su absorción intestinal, promover las funciones de las células β pancreáticas y mejorar la sensibilidad a la insulina (Zhou *et al*., 2018).

Sin embargo, algunos fármacos presentan efectos secundarios y no son efectivos contra las complicaciones diabéticas (Malathi *et al*., 2010). Por ello, es necesario la identificación y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, especialmente en aquellos casos en que los medicamentos disponibles no han sido efectivos (Munhoz y Frode, 2018).

Tabla 2. Tipos de fármacos antihiperglucémicos e hipoglucemiantes y su mecanismo de acción (modificado de Munhoz y Frode, 2018)

Tipos de fármacos	Mecanismo de acción
Biguanidas	↑ actividad AMPk, ↓ producción de glucosa en el hígado
Sulfonilureas y Metaglinidas	Bloquea el canal de K^+ en células β, ↑ secreción de insulina
Agonistas de la PPAR-γ	↑ actividad de la enzima PPAR-γ, ↑ sensibilidad a la insulina
Inhibidores de α-glucosidasas	Inhibición de las enzimas α-glucosidasas, ↓ digestión y absorción de los hidratos de carbono
Inhibidores de DPP-4	Inhibición de las enzimas DPP-4, ↑ actividad de GLP-1, ↑ secreción de insulina, ↓ secreción de glucagón
Inhibidores de SGLT2	Inhibición de SGLT2, ↓ reabsorción de glucosa por los riñones
Agonistas de receptores de dopamina tipo 2	↑ actividad de los receptores dopaminérgicos, ↑ sensibilidad a la insulina
Agonistas de GLP-1	↑ actividad de los receptores GLP-1, ↑ secreción de insulina, ↓ secreción de glucagón, ↓ vaciado gástrico, ↑ saciedad
Análogos de amilina	↑ actividad de los receptores de amilina, ↓ secreción de glucagón, ↓ vaciado gástrico, ↑ saciedad

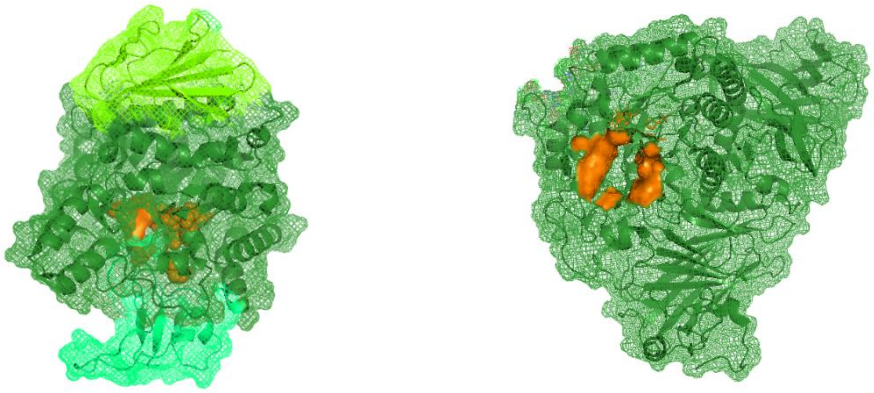
↑ Aumenta, ↓ Disminuye

4.2 Enzimas α-glucosidasas

4.2.1 Generalidades

Las glucosidasas son un grupo de enzimas responsables del metabolismo de los hidratos de carbono, las cuales hidrolizan el enlace glucosídico de diversos sustratos como polisacáridos, oligosacáridos y glicoconjugados (Borges de Melo *et al.*, 2006). Pertenecen a la familia de las glucósido-hidrolasas (GH) y se clasifican dependiendo del tipo de enlace que hidrolizan.

Las α-glucosidasas (número EC 3.2.1.20) forman parte de la familia GH13 y GH31, se encuentran distribuidas en animales, plantas y microorganismos (**Figura 2**) (Kimura *et al*., 2004). En mamíferos se localizan en las microvellosidades del intestino delgado, y son las responsables de la liberación de glucosa para ser absorbida y aprovechada por el organismo (Okuyama *et al.*, 2016).



(a) **(b)**

Figura 2. Enzimas α- glucosidasas. (a) Familia GH13 (*Saccharomyces cerevisiae*) (b) Familia GH31 (humana). Sitio catalítico en color naranja

Presentan especificidad de sustrato, característica que las clasifica en dos tipos, tipo I y tipo II. Las enzimas α-glucosidasas tipo I muestran una mayor actividad en sustratos heterogéneos como sacarosa y el *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranósido (*p*-NPG), se encuentran en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, insectos y bacterias. Mientras que las α-glucosidasas de tipo II, presentes en mamíferos y plantas, hidrolizan de manera eficiente sustratos homogéneos como la maltosa, α-glucanos como el almidón soluble y el glucógeno. Además se diferencian por el sitio

catalítico, las tipo I presentan cuatro regiones catalíticas y las tipo II cuentan con dos (Kimura *et al*., 2004).

4.2.2 Importancia en el tratamiento de la DMTII

Una de las estrategias terapéuticas empleada para el tratamiento de la DMTII es el uso de agentes inhibidores de distintos blancos terapéuticos, entre los que destacan los inhibidores de α-glucosidasas.

El uso de dichos inhibidores retrasa la digestión y absorción de los hidratos de carbono, evitando la elevación de glucosa en sangre en la etapa posprandial y, disminuye la aparición de complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la enfermedad (Joshi *et al.*, 2015), siendo benéfico para los pacientes diabéticos (**Figura 3**).

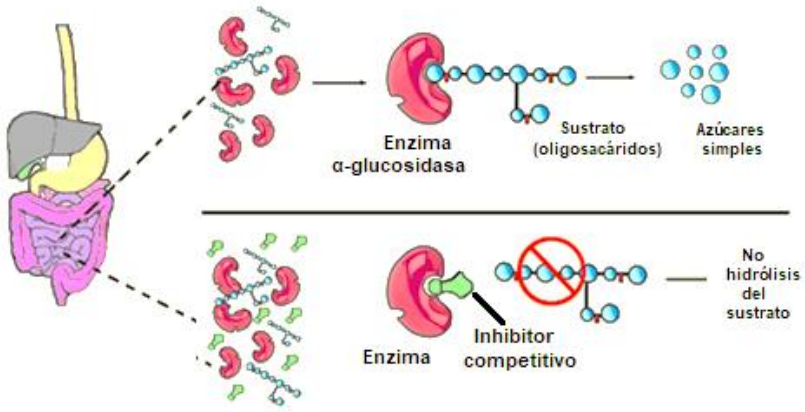


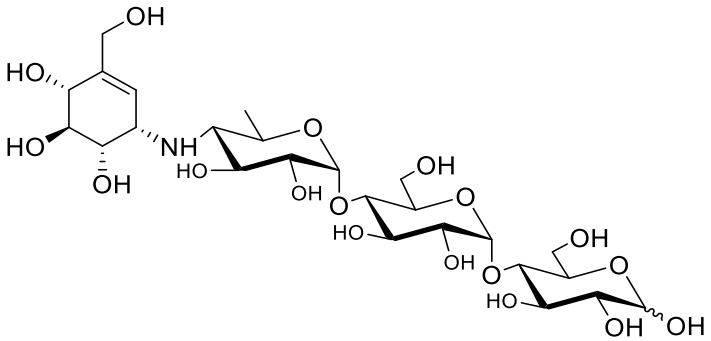
Figura 3. Efecto de los inhibidores de las enzimas α-glucosidasas (modificado de Deepak *et al.*, 2014)

4.2.3 Inhibidores de las enzimas α-glucosidasas

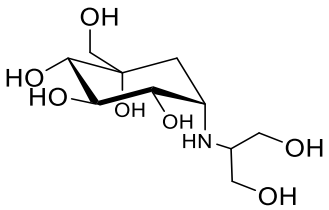
Debido al aumento en los índices de prevalencia de la DMTII, el uso de metabolitos secundarios de origen natural con actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas ha cobrado mayor relevancia.

Existen varios compuesto, tanto naturales como sintéticos, que presentan actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas entre los cuales están la acarbosa (**1**), la voglibosa (**2**) y el miglitol (**3**), sin embargo sólo se detallará el primero de ellos.

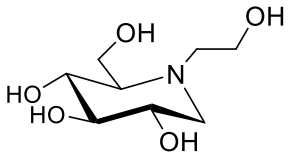
La acarbosa (**1**) fue aislada de *Actinoplanes* sp. y es el inhibidor de α-glucosidasas más utilizado para prevenir el desarrollo de la DMTII (Ríos *et al*., 2015). Es un pseudotetrasacárido compuesto por acarviosina (la cual se compone de un ciclitol y un amino-azúcar) y dos moléculas de glucosa. Presenta una elevada afinidad por las enzimas α-glucosidasas debido a su similitud con los oligosacáridos pero no sólo inhibe a dichas enzimas, sino también a las α-amilasa, sacarasa y maltasa, pero sin propiedades insulinotrópicas (Ríos *et al*., 2015).



Acarbosa (**1**)



Voglibosa (**2**)



Miglitol (**3**)

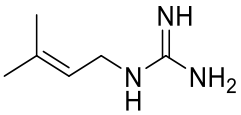
La acarbosa (**1**) se absorbe con baja eficiencia en el tracto gastrointestinal, es metabolizada por las enzimas digestivas intestinales y por biotransformación de la microbiota (Lee *et al*., 2012). Es utilizada en combinación con otros fármacos como metformina y glibenclamida.

4.3 Productos naturales

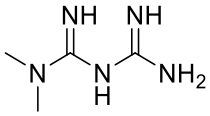
4.3.1 Generalidades

Las fuentes naturales (plantas, hongos, microorganismos marinos, etc.) han sido objeto de estudio para la obtención de compuestos con actividad terapéutica debido a su basta disponibilidad, el bajo costo y la capacidad de biosintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios (Munhoz y Frode, 2018).

La primera planta reportada con actividad antidiabética fue *Galega officinalis L.,* de la cual se aisló galegina (**4**). Dicho compuesto era responsable de reducir la cantidad de glucosa en sangre y fue introducido en el tratamiento de la diabetes en 1920. Sin embargo, al observar la toxicidad del compuesto, su uso disminuyó y dio paso a la síntesis de metformina (**5**) (Bailey, 2017). A partir de este compuesto de origen natural, aumentó el interés en el estudio de los productos naturales y el aislamiento de nuevos agentes hipo y antihiperglucemiantes.



Galegina (**4**)



Metformina (**5**)

Algunos ejemplos relevantes de moléculas con una actividad similar incluyen: compuestos fenólicos (flavonoides y antocianinas), quercetina y picnogenol derivados de plantas; acarbosa (**1**), miglitol (**3**) y voglibosa (**2**) de microorganismos (Ríos *et al*., 2015). Esos últimos de gran interés para el tratamiento de la diabetes como se mencionó.

4.3.2 Microorganismos fúngicos como fuente de productos naturales

Además de plantas y bacterias, los microorganismos fúngicos son otra fuente de compuestos naturales debido a que son capaces de sintetizar metabolitos bioactivos con muy alta quimiodiversidad (Azzollini *et al*., 2018).

Al tener en cuenta que existe gran variedad de especies y hábitats, algunos de ellos menos explorados, los hongos continúan siendo una fuente rica de nuevos metabolitos que puede ser estudiada para la obtención de compuestos con

actividades terapéuticas y en específico, nuevos compuestos antidiabéticos (Schueffler y Anke, 2014).

El aislamiento de especies fúngicas no sólo se ha limitado a cepas terrestres saprófitas sino se ha extendido hasta hábitats marinos, plantas para la obtención de hongos endófitos, interacciones simbióticas con otras fuentes como los líquenes, e insectos, los cuales son poco estudiados (Schueffler & Anke, 2014; Kellogg & Raja, 2016).

A la fecha, se han reportado compuestos aislados de microorganismos fúngicos que presentan actividad inhibitoria para las enzimas α-glucosidasas (**Tabla 3**), lo cual refuerza la idea de que los hongos son una fuente de metabolitos con potencial antidiabético aunado a la gran biodiversidad fúngica en México.

Tabla 3. Inhibidores de α-glucosidasas de origen fúngico

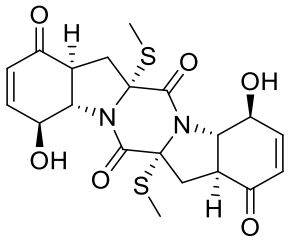
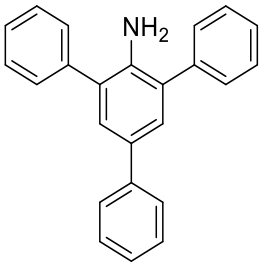
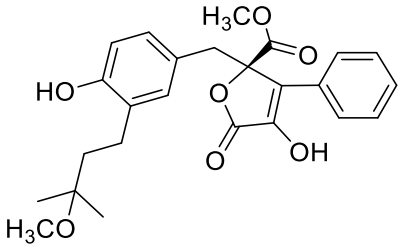
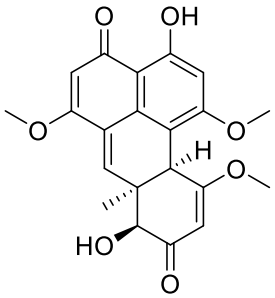
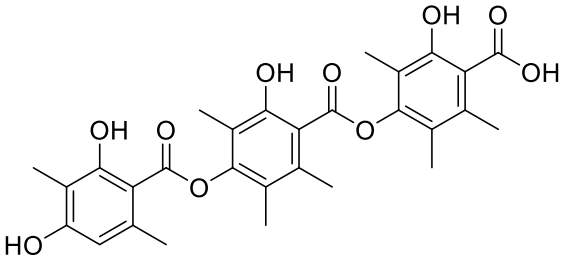
Metabolito	Fuente de obtención	Referencia
 Exserohilona (**6**) **CI_{50}** 195 µM.	*Setosphaeria rostrata,* hongo endófito de *C. speciosus*	Centko *et al*., 2017
 2,4,6-trifenilanilina (**7**) **CI_{50}** 121.4 µM	*Alternaria longipes* VITN14G, hongo endófito de la planta de manglar *A. officinalis*	Ranganathan y Mahalingam, 2018

Tabla 3. Inhibidores de α-glucosidasas de origen fúngico (continuación)

Metabolito	*Fuente de Obtención*	Referencia
 Versicolactona G (**8**) **CI_{50}** 104.8 µM	*Aspergillus terreus*, hongo marino asociado al coral *Sarcophyton subviride*	Liu *et al*., 2018
 Minimoidiona A(**9**) **CI_{50}** 95.2 µM	*P. minimoides,* hongo endófito de *Hintonia latiflora*	Rangel *et al*., 2017
 Thielavina A(**10**) **CI_{50}** 23.8 µM	*MEXU 27095,* hongo endófito de *Hintonia latiflora*	Rivera *et al.*, 2013

4.4 Género *Penicillium*

4.4.1 Generalidades

Los microorganismos fúngicos del género *Penicillium* pertenecen al filo *Ascomycota* y a la familia *Trichocomaceae*. Se subdivide en *Penicillium, Furcatum, Aspergilloides y Biverticillium*, siendo el primero el más estudiado (Kumar *et al.*, 2018).

El género comprende a más de 300 especies y muchas de ellas se encuentran en gran variedad de hábitats, incluidos suelo, aire, ambientes extremos (temperatura, salinidad, deficiencia de agua y pH) y productos alimenticios (**Figura 4**) (Yadav *et al*., 2018), ya que en dichos hábitats convergen numerosos factores que conllevan a la activación de genes involucrados en la producción de varios metabolitos.

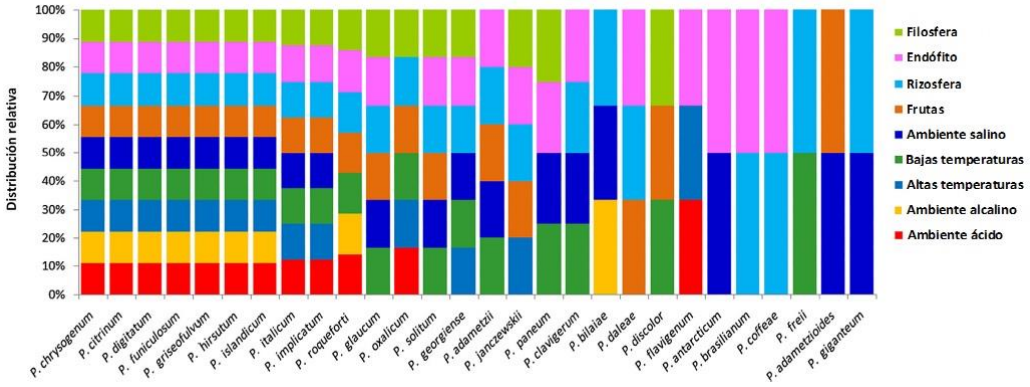


Figura 4. Distribución de algunos hongos del género *Penicillium*.
(modificado de Yadav *et al*., 2018)

A pesar de que el género *Penicillium* representa una gran parte de la diversidad microbiana y es una alternativa en el aislamiento de biomoléculas con actividad farmacológica (Kozlovsky *et al.*, 2013), es difícil su identificación a nivel de especie (Visagie *et al*., 2014).

Los metabolitos representativos del género son del tipo alcaloides del ergot, dicetopiperacinas, benzodiacepinas, quinolinas, quinazolinas y policétidos (**Tabla 4**), estos últimos son el grupo más producido (Kozlovskii et al., 2013; Rabha & Jha, 2018).

Algunas actividades biológicas de los metabolitos son: antibacterianos, antifúngicos, inmunosupresores, agentes reductores del colesterol y micotoxinas (Petit *et al.*, 2009; Rabha y Jha, 2018). Además, se han reportado compuestos aislados de *Penicillium* que presentan actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas (**Tabla 5**).

Desde el descubrimiento de la penicilina, que revolucionó los enfoques médicos para tratar las enfermedades bacterianas (Yadav *et al*., 2018), los microorganismos del género *Penicillium* han sido estudiados en programas de bioprospección resaltando su importancia actual como fuente de moléculas bioactivas para el tratamiento de distintos padecimientos (Petit *et al*., 2009).

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium*

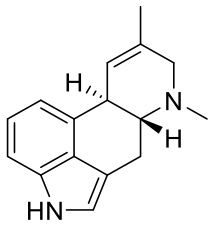
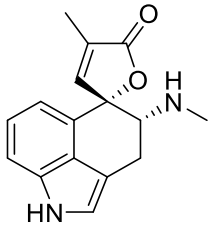
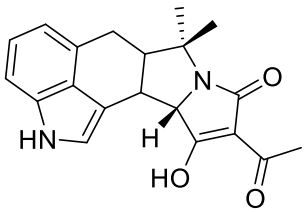
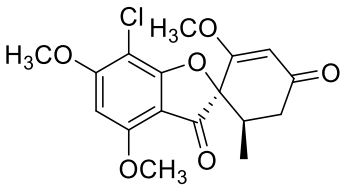
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica
Alcaloides del ergot		
 Agroclavina-I (**9**)	*P. waksmanii*	Antimicrobiano y citotóxico (Rabha y Jha, 2018)
 Rugulovasina A (**10**)	*P. commune* *P. variabile* VKM FW-655	Efectos hipotensivos (Rabha y Jha, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
 Ácido ciclopiazónico (**11**)	*P. camemberti*	Micotoxina, nefrotóxico (Kumar *et al.*, 2018; Rabha y Jha, 2018)
Policétidos		
 Griseofulvina (**12**)	*P. griseofulvum* *P. janczewskii* VKM F-312 *P. vulpinum* VKM F-257	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

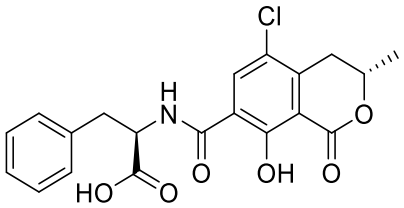
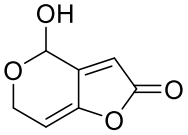
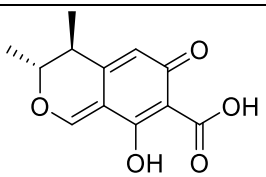
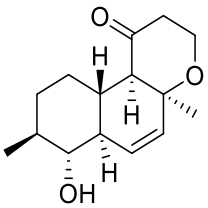
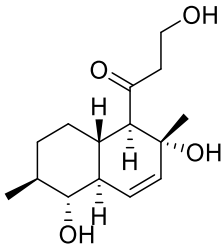
Metabolito	***Especie productora***	**Actividad biológica**
 Ocratoxina A (**13)**	*P. viridicatum* *P. verrucosum*	Micotoxina, Nefrotóxico (Kumar *et al.*, 2018; Rabha y Jha, 2018)
 Patulina (**14**)	*P. expansum* *P. janczewskii* VKM F-312 *P. vulpinum* VKM F-257	Micotoxina, Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
 Citrinina (**15**)	*P. citrinum*	Micotoxina, Nefrotóxico (Kumar *et al.*, 2018; Rabha y Jha, 2018)
 Zosteropenilina A (**16**)	*P. chrysogenum*	Antimicrobiano (Rabha y Jha, 2018)
 Palidopenilina A (**17**)	*P. thomii*	Anticancerígeno (Rabha y Jha, 2018)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

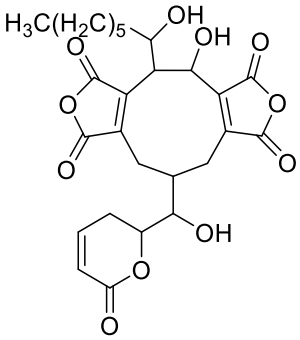
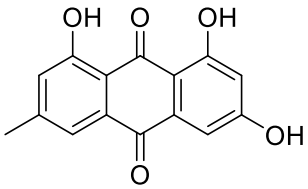
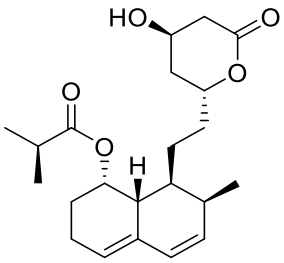
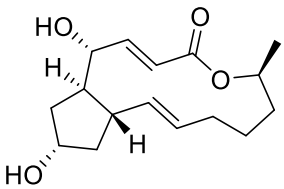
Metabolito	***Especie productora***	**Actividad biológica**
 Rubratoxina (**18**)	*P. rubrum*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)
 Emodina (**19**)	*P. islandicum* *P. brunneum* *P. janthinellum*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)
 Compactina (**20**)	*P. citrinum* *P. brevicompactum*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)
 Brefeldina A (**21**)	*P. cyaneum* *P. simplicissimum* *P. cremeogriseum* *P. onobense*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

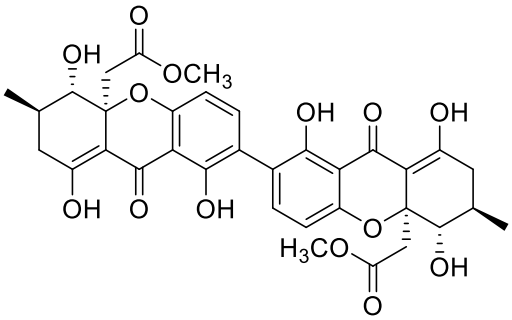
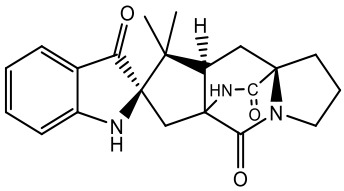
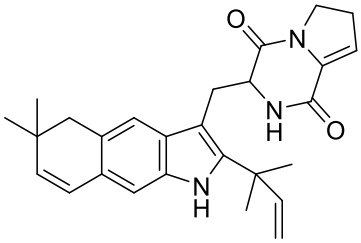
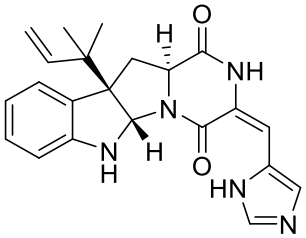
Metabolito	*Especie productora*	Actividad biológica
 Ácido secalónico (**22**)	*P. oxalicum* *P. dendriticum* *F. funiculosum* *P. chrysogenum*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)
Dicetopiperacinas		
 Brevianamida A (**23**)	*P. brevicompactum* *P. chrysogenun* *P. waksmanii* VKM F-682	Antimicrobiano y citotóxico (Rabha y Jha, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
 Piscarina A (**24**)	*P. piscarium* *P. simplicissimum* VKM F-691	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
 Roquefortina C (**25**)	*P. roqueforti* *P. spinulosum* KBP no. 15 *P. citrinum* VKM F-1290 *P. vulpinum* VKM F-256	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

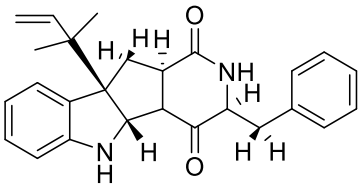
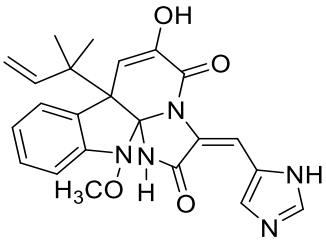
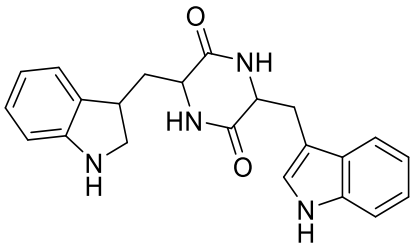
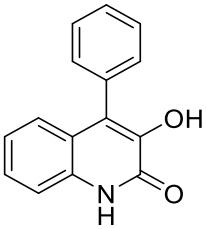
Metabolito	***Especie productora***	**Actividad biológica**
 Rugulosuvina A (**26**)	*R. rugulosum* *P. piscarium* *P. simplicissimum* VKM F-325	Antimicrobiano, anticancerígeno, antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
 Meleagrina (**27**)	*P. chrysogenum* *P. expansum*	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Rabha y Jha, 2018)
 Fulatanina (**28**)	*P. fellutanum* *P. spinulosum* KBP no. 15 *P. canescens* VKM F-1148 *P. simplicissimum* VKM F-325	Antimicrobiano. anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
Quinolinas		
 Viridicatina (**29**)	*P. viridicatum* *P. polonicum* IMBP 2-2	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

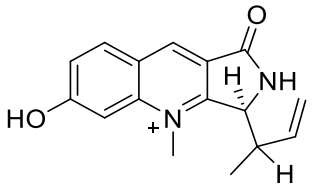
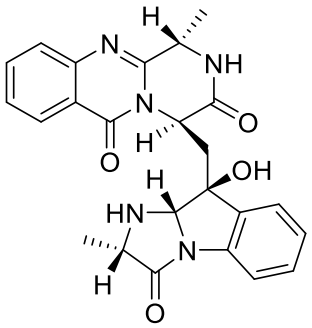
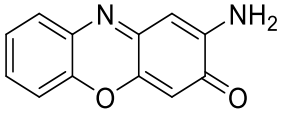
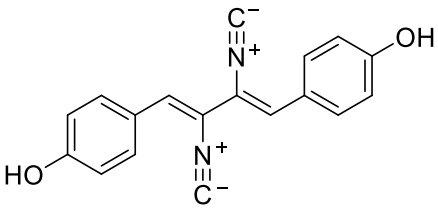
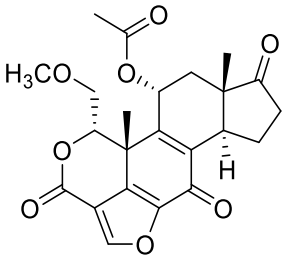
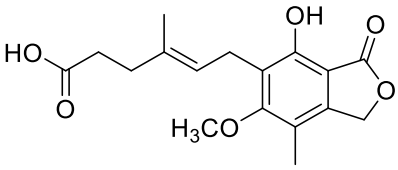
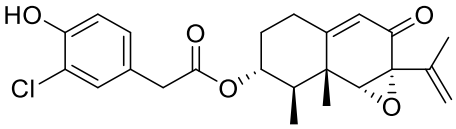
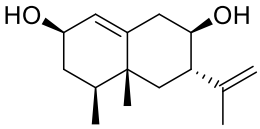
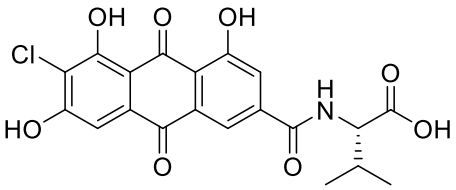
Metabolito	***Especie productora***	**Actividad biológica**
 Quinocitrinina A (**30**)	*P. citricum* *P. woksmanii*	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Rabha y Jha, 2018)
Quinazolinas		
 Fumiquinazolina A (**31**)	*P. lanosum*	Citotóxico (Rabha y Jha, 2018)
Derivados de aminoácidos		
 Questiomicina A (**32**)	*P. expansum* *P. chrysogenum* IMBP 1-5 *P. polonicum* IMBP 2-7	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)
 Xantocilina (**33**)	*P. expansum* *P. chrysogenum* IMBP 1-5	Antimicrobiano, anticancerígeno y antitumoral (Kumar *et al.*, 2018; Zhelifonova *et al.*, 2010)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

Metabolito	*Especie productora*	Actividad biológica
Terpenoides		
 Wortmanina (**34**)	*P. wortmanii* *P. funiciosum* *P. duclauxii*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)
 Ácido micofenólico (**35**)	*P. bialowiezense* *P. brevicompactum* *P. roqueforti* *P. raciborskii*	Citotóxico (Koul y Singh, 2016)
 Penicilerefilano A (**36**)	*P. copticola* PSU-RSPG138	Actividad antimicobacteriana baja, antipalúdico (Daengrot *et al.*, 2014)
 Sesquiterpeno eremofilano I * (**37**)	*P.* sp. PR19 N-1	Citotóxico (Lin *et al.*, 2013)
Antraquinona conjugada		
 Emodacidamida C (**38**)	*P.* sp. SCSIO sof101	Citotóxico (Luo *et al.*, 2017)

* 7*β*-H-eremofil-1(10),11(12)-dien-2*β*,8*β*-diol

Tabla 5. Ejemplos de metabolitos con actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas aislados de diferentes especies del género *Penicillium*

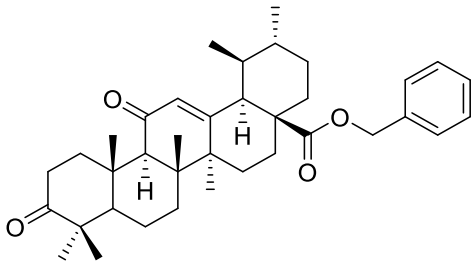
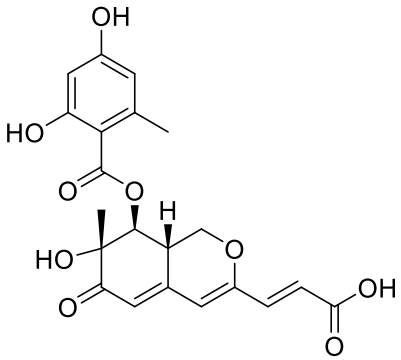
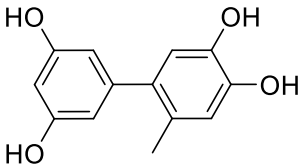
Compuesto	Especie productora	Referencia
 Éster bencílico del ácido 3, 11-dioxoursólico (**39**) **CI$_{50}$** 273.87 µg/mL	*P. citricum*, hongo endófito de la planta *Boswellia sacra*	Ali *et al.*, 2017
 Pinazafilona B (**40**) **CI$_{50}$** 28 µM	*P.* sp. HN29-3B1, hongo endófito de la planta *Cerbera manghas*	Liu *et al.*, 2015
 6’,metil-[1,1’-bifenil]-3,3’,4’,5-tetraol (**41**) **CI$_{50}$** 2.2 µM	*P.* sp. HN29-3B1, hongo endófito de la planta *Cerbera manghas*	Liu *et al.*, 2015

Tabla 5. Ejemplos de metabolitos con actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

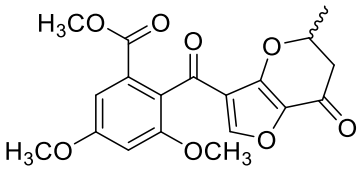
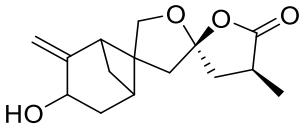
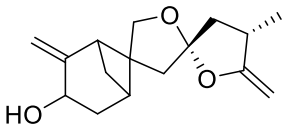
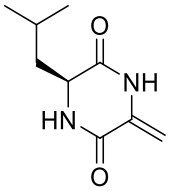
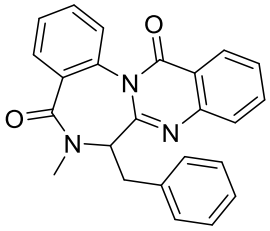
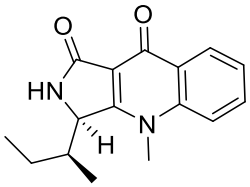
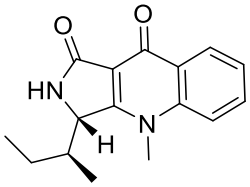
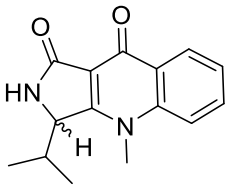
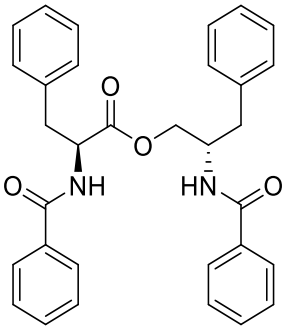
Compuesto	Especie productora	Referencia
 (±)-penifupirona (**42**) **CI$_{50}$** 14.4 µM	*P.* sp. HN29-3B1, hongo endófito de la planta *Cerbera manghas*	Liu *et al.*, 2015
 Expansolida C  Expansilida D (**43**) **CI$_{50}$** 1.90 mM (mezcla epimérica 2:1)	*P. expansum* ACCC37275	Ying *et al.*, 2016
 Ciclo-(dehidroala-L-leu) (**44**) **CI$_{50}$** 35 µM	*P.* sp. F70614	Kwon *et al.*, 2000
 Benzomalvina A (**45**) **CI$_{50}$** 383.2 µM	*P. spathulatum* B35	Del Valle *et al.*, 2016

Tabla 5. Ejemplos de metabolitos con actividad inhibitoria contra las enzimas α-glucosidasas aislados de diferentes especies del género *Penicillium* (continuación)

Compuesto	Especie productora	Referencia
 Quinolactacina A1  Quinolactacina A2 (**46**) **CI_{50}** 383.2 µM (mezcla epimérica 7:3)	*P. spathulatum* B35	Del Valle *et al.*, 2016
 Quinolactacina B (**47**) **CI_{50}** 57.3 µM (mezcla racémica)	*P. spathulatum* B35	Del Valle *et al.*, 2016
 Asperfenamato (**48**) **CI_{50}** 8.3 µM	*P. spathulatum* B35	Del Valle *et al.*, 2016

5. Metodología

5.1 Obtención de muestras para el aislamiento de especies fúngicas

Las muestras biológicas obtenidas para el aislamiento de microorganismos fúngicos se recolectaron en el municipio de Chapantongo, en el estado de Hidalgo (**Figura 5**).

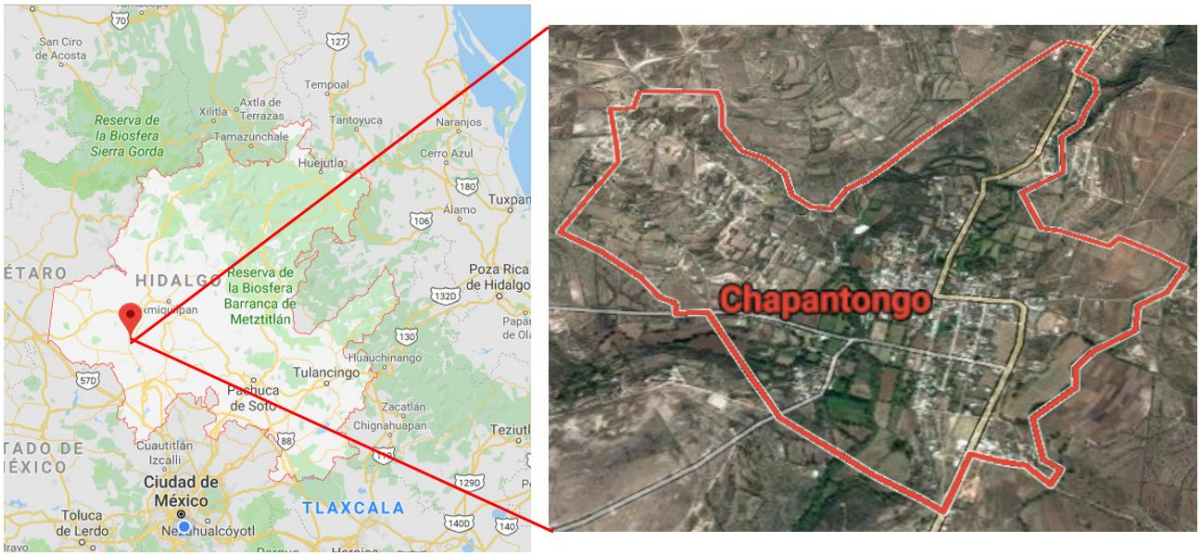


Figura 5. Ubicación del municipio de Chapantongo, Hgo.
(20°17’19.9’’N, 99°24’57.8’’O)

Las muestras consistieron en tierra de dos hormigueros diferentes y una rama de Huizache colonizada con líquenes de diferentes características morfológicas (**Figura 6**).

Figura 6. Rama de árbol con líquenes de diferente morfología en su superficie. Liquen no. 1 color amarillo, liquen no. 2 color verde pistache, liquen no. 3 color grisáceo verdoso, liquen no. 4 color verde pasto y liquen no. 5 gris (adherido a la corteza).

5.2 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos

Para el aislamiento de los microorganismos fúngicos de las muestras de tierra de hormiguero, se realizaron diluciones seriadas. La solución stock se preparó con 1 g de tierra y se añadieron 9 mL de agua destilada estéril.

A partir de la suspensión se realizaron cuatro diluciones para tener cinco soluciones en concentración 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5} g tierra/mL. Posteriormente, se tomaron 200 µL de cada disolución y se inocularon en una caja de Petri con medio agar papa-dextrosa (APD) y amoxicilina. Este procedimiento se realizó por duplicado. Dichas cajas se dejaron en crecimiento por aproximadamente 48–72 h a temperatura ambiente, y se monitoreó el crecimiento de los microorganismos fúngicos tratando de tomar un inóculo cada vez que se observara un nuevo crecimiento.

En el caso de las muestras de líquenes, se realizó un proceso de sanitización antes de inocular la caja de Petri para asegurar la obtención de hongos endoliquénicos. Se tomaron cuatro fragmentos de cada liquen y se sometieron a dicho proceso con agua destilada estéril, etanol al 70% y disolución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Finalmente, las muestras se dejaron secar en gasa estéril y se inocularon en cajas de Petri con APD y amoxicilina. Al igual que las muestras de tierra, se dejó el crecimiento por aproximadamente 48–72 h a temperatura ambiente y se monitoreó el crecimiento de los microorganismos fúngicos.

Una vez aislados los hongos, se seleccionaron veinte cepas de forma aleatoria para realizar su cultivo en dos medios. Para ello se prepararon dos cultivos semilla en tubos para centrífuga Falcon® con 15 mL de medio caldo papa-dextrosa (CPD).

Posteriormente, los cultivos semilla se vertieron a dos matraces, uno con 12 g de una mezcla de 3 diferentes tipos de arroz (largo, integral y grueso) y otro con 10 g de Cheerios®. Se dejaron crecer por 30 días a temperatura ambiente.

5.3 Obtención de los extractos orgánicos

Después del periodo de fermentación se obtuvo el extracto orgánico. A cada matraz de arroz o Cheerios® con cultivo se le añadieron 60 mL de una mezcla de CH_2Cl_2:MeOH 1:1, la biomasa se fragmentó y se dejó macerar con agitación por aproximadamente 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los cultivos se filtraron al vacío y los residuos fúngicos se lavaron con 90 mL de CH_2Cl_2. En seguida se realizó un reparto con 75 mL de agua. Las fracciones orgánicas se concentraron a presión reducida en rotavapor mientras que las fracciones acuosas se desecharon.

Los extracto orgánicos resultantes se reconstituyeron con 100 mL de hexano y se realizó un segundo reparto con 100 mL de una mezcla MeCN:MeOH 1:1. Las fracciones de MeCN:MeOH se concentraron a presión reducida y se colocaron en un vial para su posterior análisis.

5.4 Procedimientos cromatográficos generales

El análisis cromatográfico en capa delgada (CCD) de los extractos obtenidos se llevó a cabo en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (Macherey-Nagel 60 F_{254}) y como sistema de elución una mezcla de CH_2Cl_2:MeOH 95:5. La visualización de las placas se realizó en una lámpara de UV (λ 254 y 365 nm) y se utilizó como agente cromógeno una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico.

El análisis cromatográfico en columna abierta (CCA) del extracto activo seleccionado se realizó con gel de sílice como fase estacionaria (Macherey-Nagel 230-400) y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2:MeOH.

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se ejecutó en un equipo marca Waters®, equipado con un detector UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo así como la adquisición y manejo de los datos, se efectuó con el programa Empower versión 3.0 Waters®. Los análisis cromatográficos de tipo analítico se hicieron en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 (5 µm, 250×4.6 mm) y en

los análisis semipreparativos se empleó una columna Phenomenex Gemini Nx-C18 (5 µm, 250×10 mm). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente y a diferentes longitudes de onda (200-800 nm) para la detección de los compuestos.

5.5 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-^{1}H, 500 MHz) y de carbono 13 (RMN-^{13}C, 125 MHz) se registraron en un equipo de Brucker Advance III 500, utilizando metanol deuterado (MeOD) como referencia para los desplazamientos químicos (δ).

El análisis de rotación óptica se llevó a cabo en un polarímetro Perkin Elmel 343 a 25 °C en metanol y a la longitud de onda de la línea D-sodio (589 nm); mientras que los espectros de masas por la técnica análisis directo en tiempo real (DART) se obtuvieron con un espectrómetro de masas Jeol, AccuTOF JMS-T100LC.

5.6 Estandarización del ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata

Para la estandarización del ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata se empleó la enzima α-glucosidasa de intestino de mamífero, como sustrato *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranósido (*p*-NPG), acarbosa como control positivo y *p*-nitrofenol (*p*-NP). Todos obtenidos de Sigma-Aldrich®. Los ensayos se realizaron en pH 6.8 en una solución amortiguadora de fosfatos 67 mM. Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 405 nm con un lector Synergy HT. La obtención y análisis de los datos se hicieron con el programa Gen 5 y con GraphPad Prism 6.0, respectivamente.

5.6.1 Curva patrón de *p*-NP

La curva patrón de *p*-NP se realizó por triplicado utilizando 10 disoluciones en un rango de concentración de 0.2–2 mM. Todas las disoluciones se prepararon a partir de la 2 mM en solución amortiguadora de fosfatos. Se colocaron 100 µL de cada disolución estándar en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia.

5.6.2 Efecto de la concentración de sustrato y volumen de enzima

La concentración de sustrato y volumen de enzima se evaluó con disoluciones de diferente concentración de sustrato *p*-NPG y una disolución de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata 50 mg/mL. Se usaron 4 disoluciones de sustrato *p*-NPG (5, 10, 15 y 20 mM), de las cuales 10 µL de cada una se colocaron en una placa de 96 pozos, se les añadió diferente volumen de enzima (5, 10, 15 y 20 µL) y el volumen se completó a 100 µL con solución amortiguadora de fosfatos. Posteriormente, se realizó la lectura de la absorbancia a 0 y 30 min.

5.6.3 Curva de saturación por sustrato *p*-NPG

Para la curva de saturación por sustrato se utilizaron disoluciones de *p*-NPG en un rango de concentración de 0.5–5 mM. Para ello, se preparó una disolución stock de 50 mM en solución amortiguadora de fosfatos. Se colocaron 10 µL de cada disolución en una placa de 96 pozos por triplicado, se agregaron 20 µL de enzima α-glucosidasa de intestino de rata 50 mg/mL y el volumen se completó a 100 µL con solución amortiguadora de fosfatos. Se midió la absorbancia a 0 y 30 min.

5.6.4 Curva de inhibición con acarbosa

La curva de inhibición se realizó con disoluciones logarítmicas de acarbosa en un rango de concentración de $1x10^{-5}$ -1 mM. Para ello se elaboró una disolución stock 50 mM en solución amortiguadora de fosfatos. Se colocaron 2 µL de cada disolución en una placa de 96 pozos, se añadieron 20 µL de enzima α-glucosidasa 50 mg/mL y el volumen se completó a 90 µL con solución amortiguadora de fosfatos. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C con agitación por 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 10 µL de *p*-NPG 20 mM y se registró la absorbancia. Nuevamente se incubó a 37 °C con agitación por 30 min y una vez terminado el tiempo, se midió la absorbancia. Con los valores obtenidos de 7 repeticiones se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

5.7 Ensayo de inhibición de α-glucosidasas

El estudio de inhibición *in vitro* se efectuó con las enzimas α-glucosidasas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich®) y de intestino de rata (Sigma-Aldrich®), a una concentración de 1U/mL y 50 mg/mL respectivamente. Como sustrato *p*-NPG 5 mM para la enzima de levadura y 20 mM para la de mamífero. Los ensayos se realizaron en solución amortiguadora de fosfato 100 mM pH 7 para levadura y 67 mM pH 6.8 para la enzima de mamífero. La acarbosa se utilizó como control positivo a 30 mM para levadura y 1.26 mM para la de mamífero. Para los extractos o compuesto puro se empleó una disolución de 10 mg/mL en DMSO. La inhibición se determinó por espectrofotometría a 405 nm en placas de 96 pozos. Las absorbancias registradas se adquirieron y analizaron mediante los softwares mencionados previamente.

Los volúmenes empleados para cada experimento se resumen en la **Tabla 6**, bajo las condiciones indicadas en el apartado anterior (5.6.4).

Tabla 6. Distribución para el ensayo de inhibición de α-glucosidasas

	α-glucosidasa de *S. cerevisiae*			**α-glucosidasa de intestino de rata**		
Disolución	**Blanco**	**Extracto / Compuesto**	**Control (+)**	**Blanco**	**Extracto / Compuesto**	**Control (+)**
Buffer de fosfatos	83 µL		81 µL	68 µL		66 µL
Extracto / Compuesto	-	2 µL	-	-	2 µL	-
Acarbosa	-	-	2 µL	-	-	2 µL
Enzima	5 µL			20 µL		
DMSO	2 µL	-	2 µL	2 µL	-	2 µL
***p*-NPG**	10 µL			10 µL		

El porcentaje de inhibición de los extractos orgánicos se calculó con la siguiente ecuación y considerando la absorbancia del blanco:

$$\%Inh = \left(1 - \frac{A_{m_{405\,nm}}}{A_{b_{405\,nm}}}\right) x\ 100$$

Donde %Inh corresponde al porcentaje de inhibición de la enzima, $A_{m_{405\,nm}}$ a la absorbancia corregida de la muestra ($A_{m_{405\,nm}} = A_{30\,min.\ muestra_{405nm}} - A_{inicial\ muestra_{405nm}}$) y $A_{b_{405\,nm}}$ a la absorbancia corregida del blanco ($A_{b_{405\,nm}} = A_{30\,min.\ blanco_{405nm}} - A_{inicial\ blanco_{405nm}}$).

5.8 Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado

En colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) del estado de San Luis Potosí, se realizó la identificación taxonómica de la especie seleccionada mediante secuenciación molecular de la región ITS y análisis de homología tipo BLAST utilizando la base de datos del *National Center Biotechnology Information* (NCBI).

5.9 Obtención del perfil cromatográfico del extracto orgánico de *Penicillium sp*.

Los extractos orgánicos (arroz y Cheerios®) se analizaron por CLAE para la obtención del perfil cromatográfico y los tiempos de retención de los compuestos mayoritarios. Las condiciones usadas para el análisis se resumen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Condiciones experimentales para la obtención del perfil cromatográfico

Tipo de análisis	Analítico
Columna	Phenomenex Gemini® NX-C18 250x4.6 mm
Flujo	1 mL/min
Fase móvil	Gradiente lineal MeCN:H_2O 20% a 80%
Tiempo	30 min

5.10 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *Penicillium sp*.

Aproximadamente 230 mg del extracto orgánico del cultivo de arroz se fraccionó por CCA en una columna de vidrio empacada con gel de sílice (120 g) y como fase móvil, mezclas binarias de polaridad creciente de hexano, CH_2Cl_2 y MeOH. Este proceso generó 71 fracciones primarias que se agruparon con base en su perfil cromatográfico en 16 fracciones. A partir de la fracciones 11, 12 y 13 se aislaron 129.7 mg de curvularina (**49**) como sólido cristalino con punto de fusión 204–206 °C. La estructura del producto se elucidó mediante técnicas espectroscópicas (RMN-^{1}H y RMN-^{13}C mono y bidimensional) y espectrométricas (EM-DART).

5.11 Evaluación del efecto de curvularina (49) sobre la actividad de la enzima α-glucosidasa

La actividad biológica de la curvularina (**49**) como inhibidor de la enzima glucosidasa de levadura se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.7. El compuesto se evaluó en un rango de concentración 0.032–0.560 mM, mientras que para el control positivo acarbosa el rango de concentración fue de 0.3–3 mM. Con los resultados obtenidos se calculó la CI_{50}, mediante un análisis de regresión no lineal con ajuste de Hill.

6. Resultados y discusión

6.1 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos

A partir de las muestras recolectadas se aisló un total de 42 microorganismos fúngicos, principalmente de la muestra de tierra del segundo hormiguero que representó el 42.9% de los aislamientos (**Tabla 8**). Se observó una variedad fúngica al aislar microorganismos con características morfológicas distintas (**Figura 7**).

Tabla 8. Número de microorganismos aislados y clave asignada

Procedencia del microorganismo fúngico	No. de microorganismos aislados	Clave
Hormiguero No. 1	9	IQ-155 a IQ-163
Hormiguero No. 2	18	IQ-164 a IQ-181
Liquen No. 1	1	IQ-183
Liquen No. 2	2	IQ-184, IQ-185
Liquen No. 3	3	IQ-186 a IQ-188
Liquen No. 4	3	IQ- 189 a IQ-191
Liquen No. 5	6	IQ-192 a IQ-197

Figura 7. Microorganismos fúngicos aislados

Dichos aislamientos evidencian la presencia de una extensa diversidad fúngica en zonas poco exploradas del territorio nacional. Los hormigueros y líquenes son una fuente rica de microorganismos fúngicos debido a su asociación simbiótica (Fazio *et al*., 2009; Chomicki y Renner, 2017). Estos hallazgos permitieron contribuir a la generación de conocimiento sobre la diversidad fúngica del estado de Hidalgo y de ambos nichos ecológicos en particular (Sharma y Sumbali, 2013).

6.2 Obtención de los extractos orgánicos

Se seleccionaron de forma aleatoria 20 microorganismos fúngicos, de los cuales 10 fueron de hormiguero y 10 de liquen, para la obtención y posterior análisis de los extractos orgánicos. Dichos extractos tuvieron rendimientos entre 100 a 200 mg aproximadamente (**Tabla 9**). En el análisis por CCD se observaron diferencias en los perfiles químicos de los extractos (**Figura 8**) mostrando la diversidad metabólica entre los microorganismos estudiados.

Cabe destacar que a pesar de que cada microorganismo se cultivó en dos medios diferentes, el perfil metabólico no presentó diferencias significativas. Sin embargo, se evidenció el aumento de la producción de uno de los metabolitos al encontrar un área bajo la curva más grande en un medio y otro. Lo cual sugiere que bajo las condiciones empleadas y el medio de cultivo seleccionado, algunos metabolitos se ven expresados en mayor proporción (VanderMolen *et al.*, 2013).

Tabla 9. Microorganismos seleccionados y rendimientos de los extractos orgánicos

	Cheerios®	Arroz		Cheerios®	Arroz
Clave	**Rendimiento (mg)**		**Clave**	**Rendimiento (mg)**	
IQ-155	261.0	237.3	IQ-183	126.9	159.3
IQ-158	86.6	110.3	IQ-184	110.9	64.2
IQ-164	148.2	140.3	IQ-185	54.1	25.0
IQ-165	156.5	87.2	IQ-188	99.8	77.9
IQ-168	212.2	231.8	IQ-189	83.5	54.7
IQ-170	81.4	67.1	IQ-191	166.5	121.0
IQ-175	61.8	73.2	IQ-193	168.1	20.1
IQ-176	33.6	45.3	IQ-194	88.3	94.2
IQ-177	82.0	36.9	IQ-195	95.1	181.8
IQ-180	185.0	155.2	IQ-197	72.3	74.4

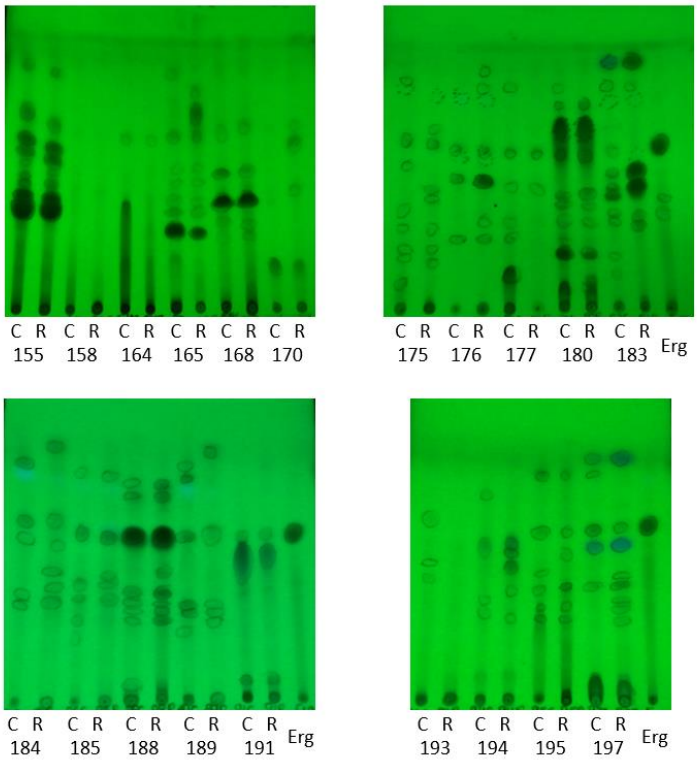


Figura 8. Cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos orgánicos con sistema de elución CH_2Cl_2:MeOH 95:5. C, Cheerios®; R, Arroz y Erg, Ergosterol.

6.3 Estandarización del ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata

6.3.1 Curva patrón de *p*-NP

La curva patrón (**Figura 9**) sirvió para calcular la velocidad de reacción en los siguientes ensayos, y permitió establecer una concentración entre 0.4–0.6 para el ensayo de evaluación de la concentración de sustrato p-NPG y volumen de enzima.

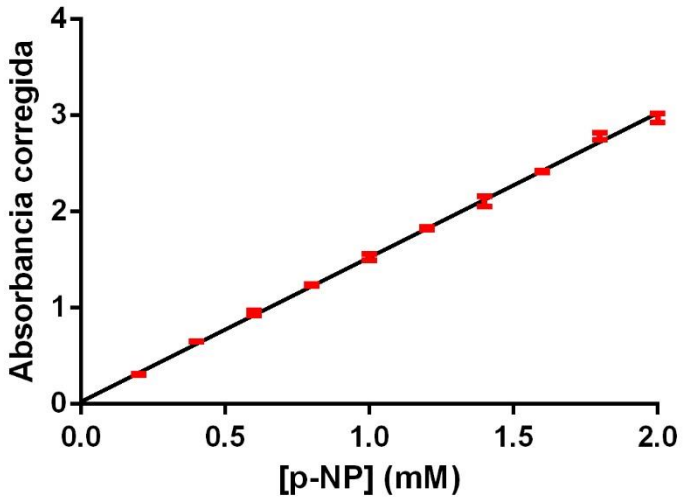


Figura 9. Curva patrón de *p*-NP

6.3.2 Efecto de la concentración de sustrato *p*-NPG y volumen de enzima

El efecto de la concentración de sustrato y volumen de enzima, se evaluó en un mismo ensayo. El rango de concentración de sustrato se amplió a 0.5–2.0 mM y el volumen de enzima de 5–20 µL de una disolución de 50 mg/mL.

Los resultados obtenidos indicaron que a un volumen de enzima de 20 µL se alcanza la absorbancia de 0.6–0.8, ya que en dicho rango de absorbancia se tiene un 10% de hidrólisis de la cantidad total de sustrato empleada (Brooks *et al*., 2012). Sin embargo, no se observó el efecto de la concentración de sustrato al no alcanzar el estado de saturación de la enzima (**Figura 10**). No obstante, el ensayo cumple con las condiciones de linealidad reportadas para el desarrollo e implementación de métodos enzimáticos para ensayos de *High Throughput Screening* (HTS, por sus siglas en inglés).

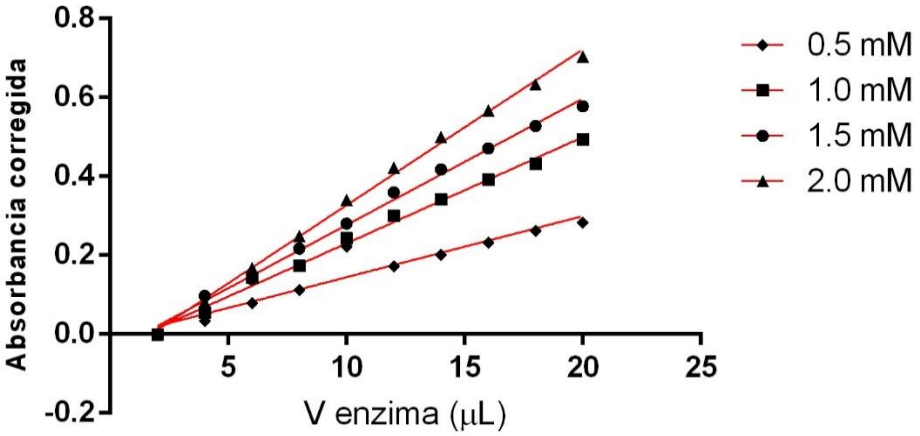


Figura 10. Efecto de la concentración de sustrato *p*-NPG y volumen de enzima

6.3.3 Curva de saturación por sustrato *p*-NPG

El estado de saturación de la enzima α-glucosidasa de intestino de rata se logró utilizando un rango de concentración de 0.5-5 mM (**Figura 11**). Con los datos obtenidos se calculó la velocidad máxima y la constante de Michaelis (K_m), 0.04 mM/min y 2.08 mM respectivamente, mediante un análisis de regresión no lineal. Con este ensayo se estableció la concentración de sustrato para los ensayos de inhibición. Dicha concentración fue el valor de la K_m.

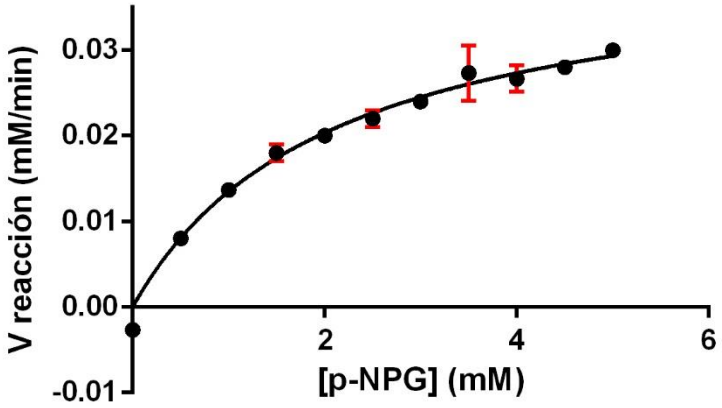


Figura 11. Curva de saturación por sustrato *p*-NPG

6.3.4 Curva de inhibición con acarbosa (1)

La curva de inhibición con acarbosa (**1**) se realizó para conocer la concentración a emplear como control positivo. Se evaluó en un rango de concentración de $1x10^{-5}$ - 1.0 mM. El porcentaje de inhibición alcanzado fue de 80% a la concentración más alta (**Figura 12**) y la CI_{50} fue de 6.2 µM, calculada mediante un análisis de regresión no lineal con ajuste de Hill. Dicha concentración se utilizó para el ensayo de inhibición de los extractos y compuesto aislado.

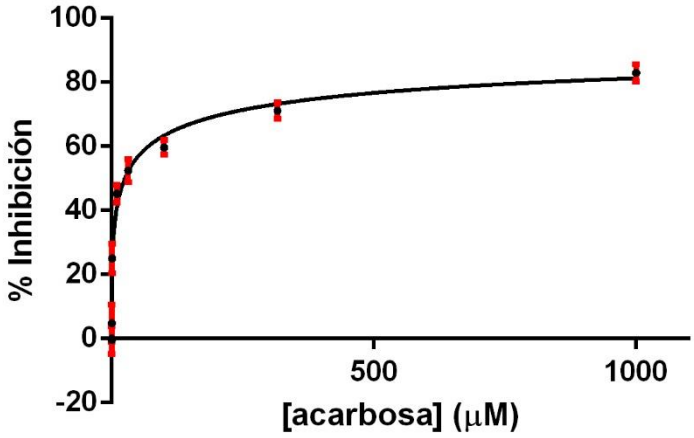


Figura 12. Curva de inhibición con acarbosa

En la **Tabla 10**, se resumen las condiciones establecidas a partir de la cinética para el ensayo de inhibición.

Tabla 10. Concentración y volumen estandarizados para el ensayo de inhibición de la enzima *α*-glucosidasa de intestino de rata

Disolución	Disolución	[Pozo]	Volumen (µL)
Enzima	50 mg/mL	-	20
Sustrato *p*-NPG	20.8 mM	2.08 mM	10
Acarbosa	1.26 mM	6.2 µM	2

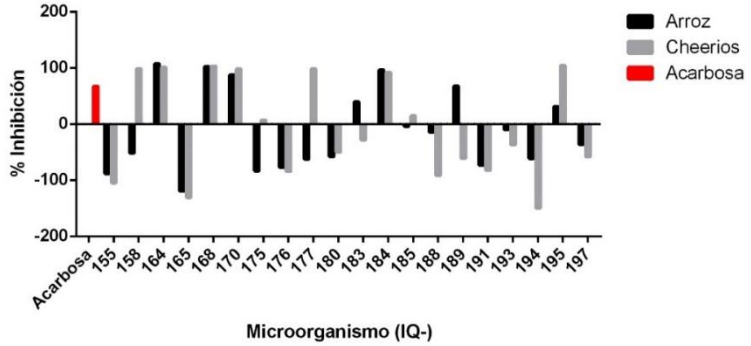
6.4 Ensayo de inhibición de α-glucosidasas

El objetivo de la obtención de los extractos orgánicos y de su estudio, fue la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para enfermedades de alta incidencia poblacional como la diabetes mellitus que, a pesar de las medidas que se han tomado para comprender y controlarla, su incidencia sigue en aumento (Malathi *et al.*, 2010). Por tal caso, los extractos orgánicos se evaluaron como inhibidores de las enzimas α-glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* y de intestino de rata utilizando el protocolo desarrollado.

Diesciseis extractos de 40 evaluados presentaron actividad inhibitoria contra la enzima de levadura, de los cuales 10 inhibieron en un porcentaje mayor al 90% (F**igura 13**), superando la del control positivo. Mientras que 19 extractos inhibieron a la enzima de mamífero con un porcentaje de inhibibición inferior (entre 1-5%) al obtenido con el control positivo (48.3%). Esto se atribuye a que el homogeneizado enzimático de intestino de rata es un mezcla compleja de enzimas glucosidasas (Everette *et al.*, 2013), haciendo más compleja la inhibición.

Estudios previos han demostrado que la inhibición de la enzima de levadura no necesariamente correlaciona con la inhibición de las enzimas α-glucosidasas de intestino de mamífero (Adisakwattana *et al.*, 2009). Sin embargo, en muchas ocasiones, los inhibidores de la enzima α-glucosidasa de levadura presentan efectos antihiperglucémicos importantes al ser evaluados en modelos *in vivo* (Rivera *et al.*, 2013). De tal forma, el ensayo permitió priorizar los extractos con actividad inhibitoria para el aislamiento de metabolitos bioactivos a través de su estudio químico.

(a)



(b)

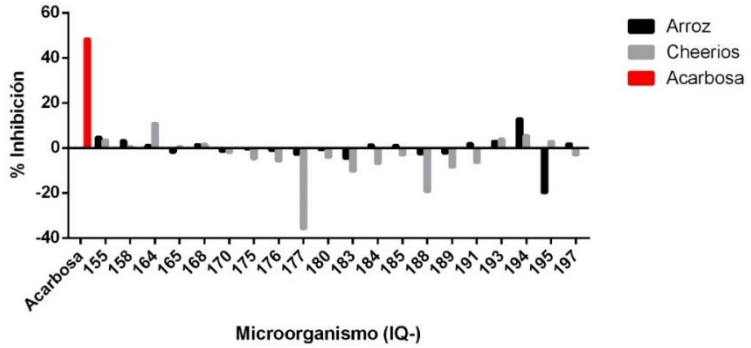


Figura 13. Porcentaje de inhibición de las enzimas α-glucosidasas, (a) enzima de *Saccharomyces cerevisiae*, (b) enzima de intestino de rata

Considerando los resultados de rendimiento, actividad inhibitoria y perfil cromatográfico por CCD del aislamiento IQ-168 (**Figura 14**), se seleccionó el extracto orgánico del medio de cultivo de arroz para realizar su estudio químico e identificación taxonómica.

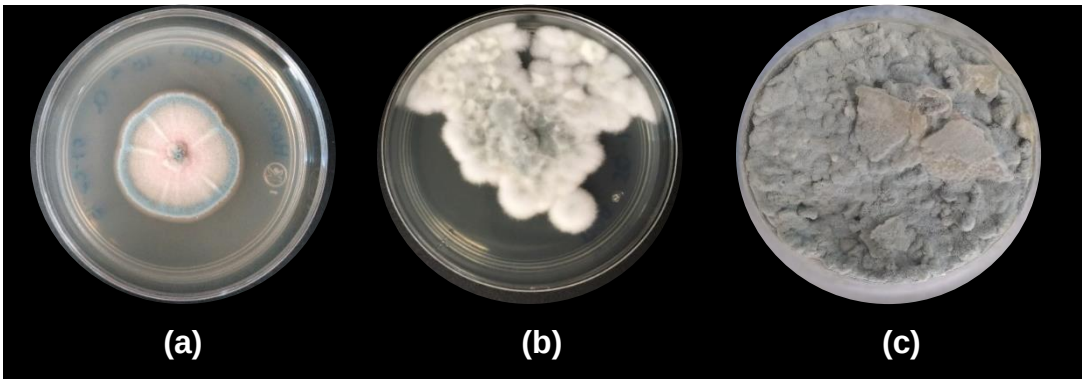


Figura 14. Microorganismo fúngico seleccionado IQ-168, (a) crecimiento en caja de Petri con APD (aislamiento), (b) crecimiento en caja de Petri con APD (resiembra), (c) crecimiento de aproximadamente 30 días en arroz.

6.5 Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado

El microorganismo IQ-168 se identificó como *Penicillium* sp. (**Figura 15**). Sin embargo, la cepa no se identificó a nivel de especie debido a que se necesita otros marcadores moleculares específicos para el género.

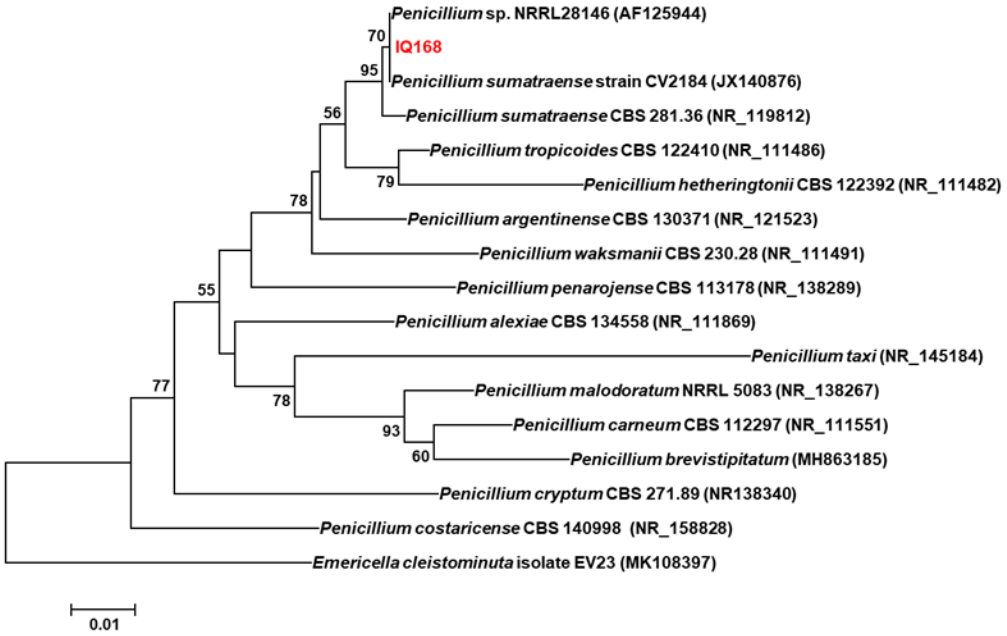


Figura 15. Árbol filogenético del microorganismo fúngico IQ-168

6.6 Estudio químico del extracto activo de la especie *Penicillium* sp.

El extracto orgánico del medio de cultivo de arroz (aproximadamente 231.8 mg) se sometió a un fraccionamiento primario mediante CCA sobre gel de sílice. Este procedimiento permitió el aislamiento de curvularina (**49**), un compuesto de tipo lactona macrocíclica. La elucidación estructural de este compuesto se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

6.7 Obtención y elucidación estructural de curvularina (49)

La curvularina (**49**) se obtuvo como un sólido cristalino soluble en MeOH con punto de fusión entre 204–206 °C y ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25}$) con una rotación de -61.18° (*c* 1.7×10^{-3} g/mL, MeOH). Su fórmula y peso molecular se estableció como $C_{16}H_{20}O_5$ y 292 g/mol respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización química utilizando la técnica de análisis directo en tiempo real (EM-DART) (**Figura 16**). Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C se muestran en la **Tabla 11**, y son congruentes con los reportados por Ataides *et al.* y Ghisalberti *et al*.

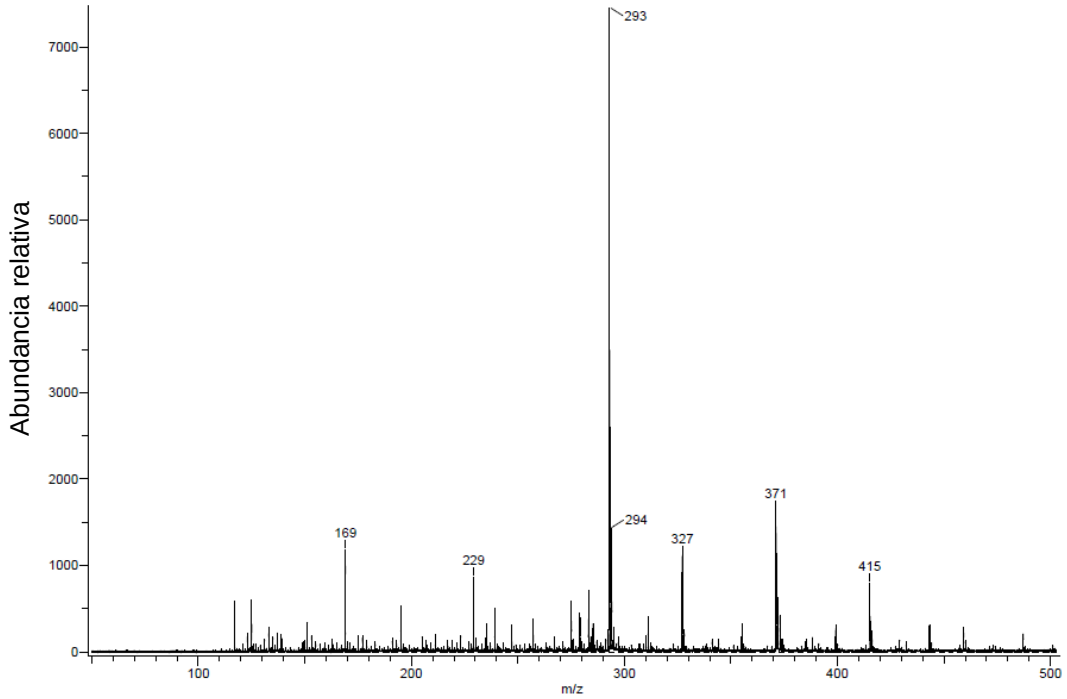


Figura 16. Espectro de masas por DART de la curvularina (**49**)

El espectro de RMN-^{1}H (500 MHz, MeOD) mostró señales para 18 hidrógenos. Se observaron dos dobletes en δ_H 6.22 y 6.26 (*J* 2.2 Hz) correspondientes a dos hidrógenos aromáticos (H-4 y H-6, respectivamente), con un acoplamiento meta y una señal múltiple en δ_H 4.92 del H-15 que se encuentra acoplada con los hidrógenos del metilo en δ_H 1.13. Además, el espectro presenta dos señales dobles en δ_H 3.87 y 3.62 que fueron asignadas a los hidrógenos H-2 que se encuentran

acoplados entre sí; dos señales *ddd* que corresponden a los hidrógenos del carbono 10 en δ_H 3.22 y 2.74 (*J* 15.5, 9.5, 2.7 Hz y 14.7, 9.5 y 2.8 Hz, respectivamente). Por último, el espectro muestra 4 señales múltiples en la región de δ_H 1.8–1.3 que integran para 8 hidrógenos y corresponden a los hidrógenos de las posiciones 11, 12, 13 y 14 (**Figura 17**).

El espectro de RMN-^{13}C (125 MHz, MeOD, **Figura 18**) presenta señales para 16 carbonos, siendo congruente con la fórmula molecular establecida. Las señales observadas en el espectro corresponden a dos grupos carbonilos, uno de un grupo lactona (δ_C 171.8, C-1) y otro a un grupo cetona (δ_C 209.8, C-9); además se observan seis carbonos aromáticos, 4 de ellos no protonados [δ_C 161.3 (C-5), 159.5 (C-7), 137.2 (C-3) y 120.9 (C-8)]; tres metinos de los cuales 2 son aromáticos [δ_C 112.3 (C-4) y 102.7 (C-6)], seis metilenos que mostraron correlación en el espectro bidimensional HSQC con los hidrógenos localizados entre δ_H 3.87 y 1.27 (**Figura 22**); y por último, un grupo metilo (δ_C 20.5).

El análisis anterior permitió establecer algunos fragmentos estructurales de la molécula (**Figura 19**), y en conjunto con los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (**Figura 21-23**), la estructura del producto natural se elucidó como la de curvularina (**49**). La configuración absoluta del centro estereogénico en la posición 15 se determinó como *S* tomando en cuenta el valor de rotación específica (-61.18°) (Ha *et al*., 2017).

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C de la curvularina (**49**) en MeOD (^{1}H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz)

Posición	**δ_C (ppm)**	**δ_H en ppm (mult.; *J* en Hz)**	**COSY**	**HMBC (^{1}H→^{13}C)**
1	172.8	-	-	-
2	40.5	3.87 (d; 16.0) 3.62 (d; 16.0)	-	1, 3, 4, 8
3	137.2	-	-	-
4	112.3	6.22 (d; 2.2)		2, 5, 6, 8
5	161.3	-	-	-
6	102.7	6.26 (d; 2.2)		-
7	159.5	-	-	-
8	120.9	-	-	-
9	209.8	-	-	-
10	44.66	3.22 (ddd; 2.7, 9.5, 15.5) 2.74 (ddd; 2.8, 9.5, 14.7)	11	9, 12
11	23.8	1.74 (m) 1.58 (m)	12	9, 10, 12
12	27.8	1.40 (m) 1.27 (m)	-	10, 13, 14
13	24.9	1.44 (m) 1.30 (m)	-	-
14	33.0	1.58 (m) 1.49 (m)	-	15, 16
15	73.8	4.92 (m)	14, 16	-
CH_3-16	20.5	1.13 (d, 6.5)		14, 15

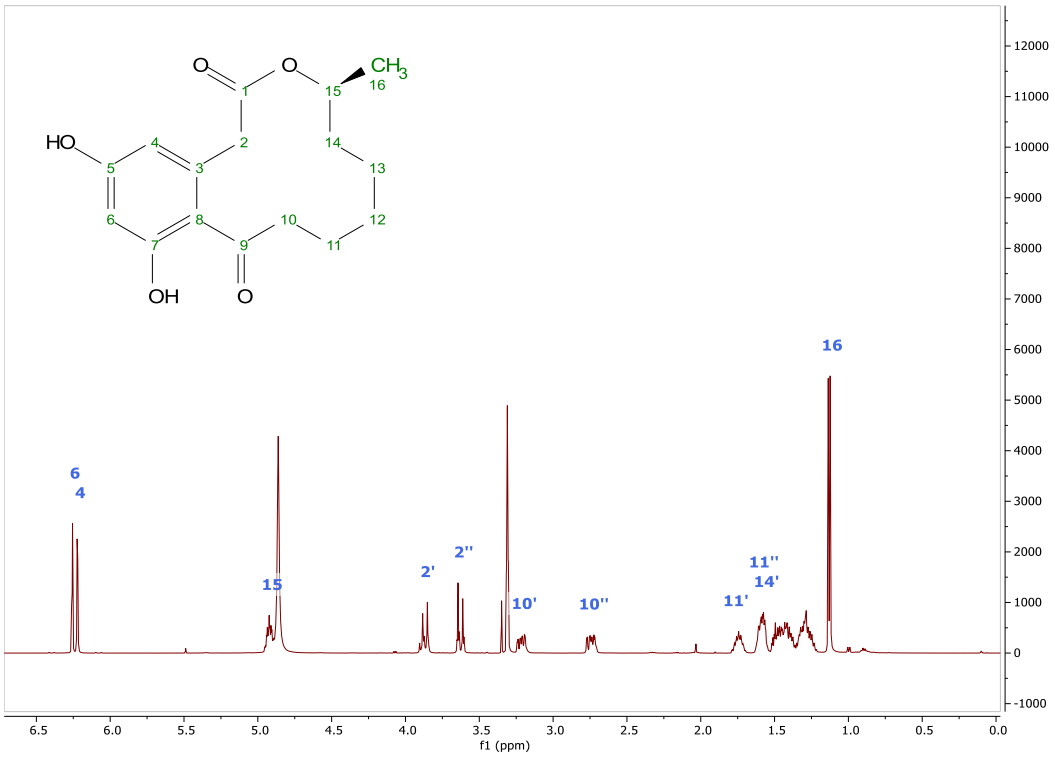


Figura 17. Espectro de RMN-^{1}H (500 MHz, MeOD) de la curvularina (49)

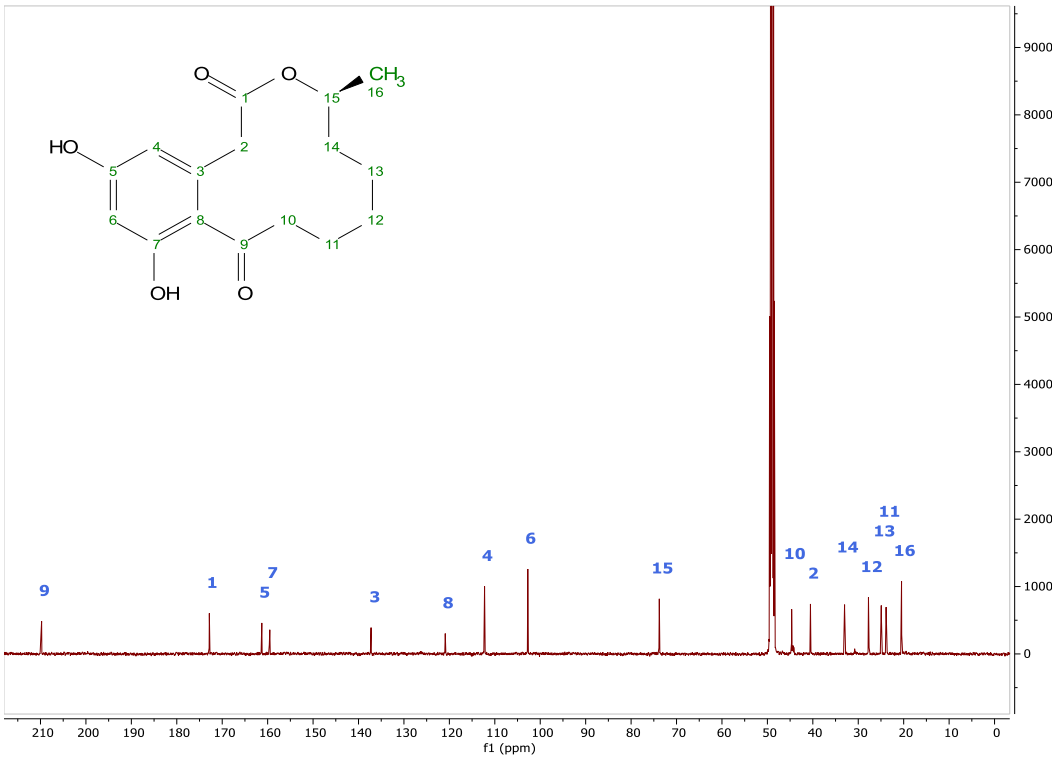


Figura 18. Espectro de RMN-^{13}C (125 MHz, MeOD) de la curvularina (**49**)

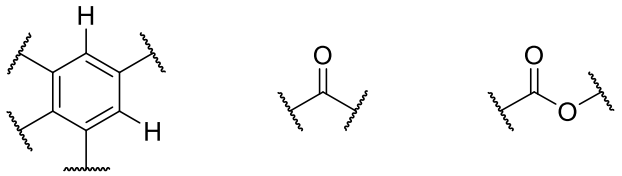


Figura 19. Unidades estructurales parciales del compuesto (**49**)

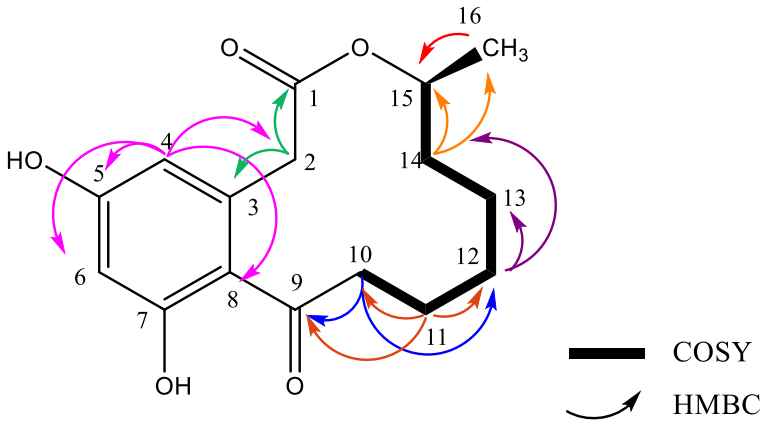


Figura 20. Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC y COSY

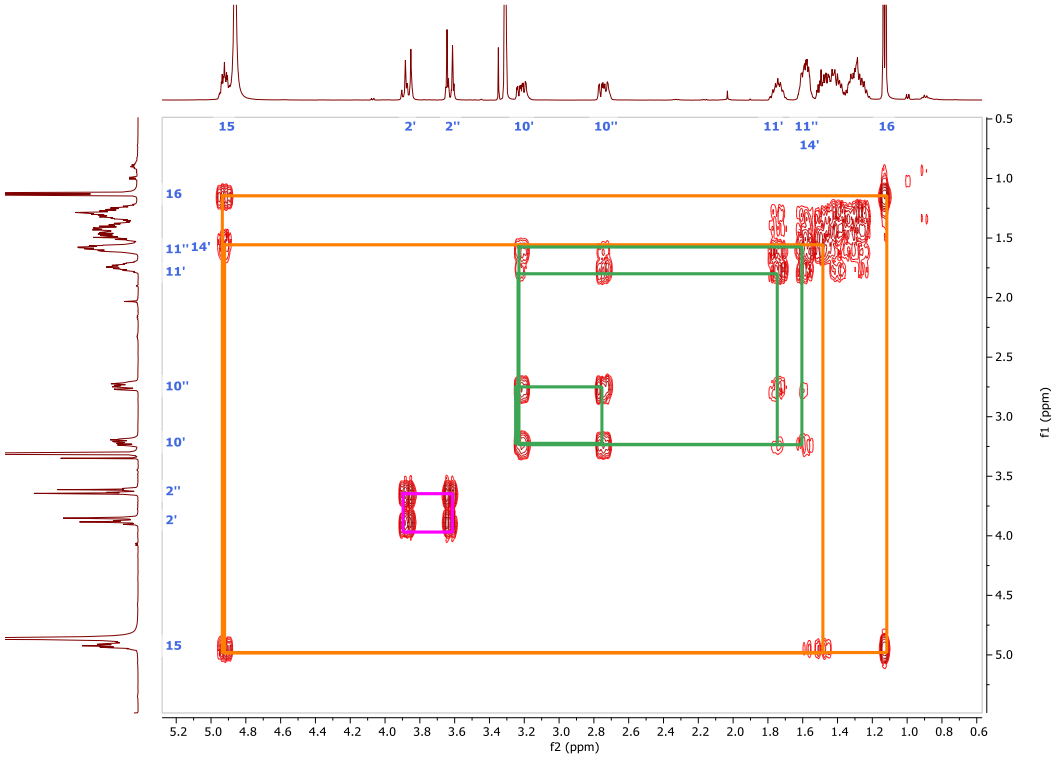


Figura 21. Espectro bidimensional COSY de la curvularina (**49**)

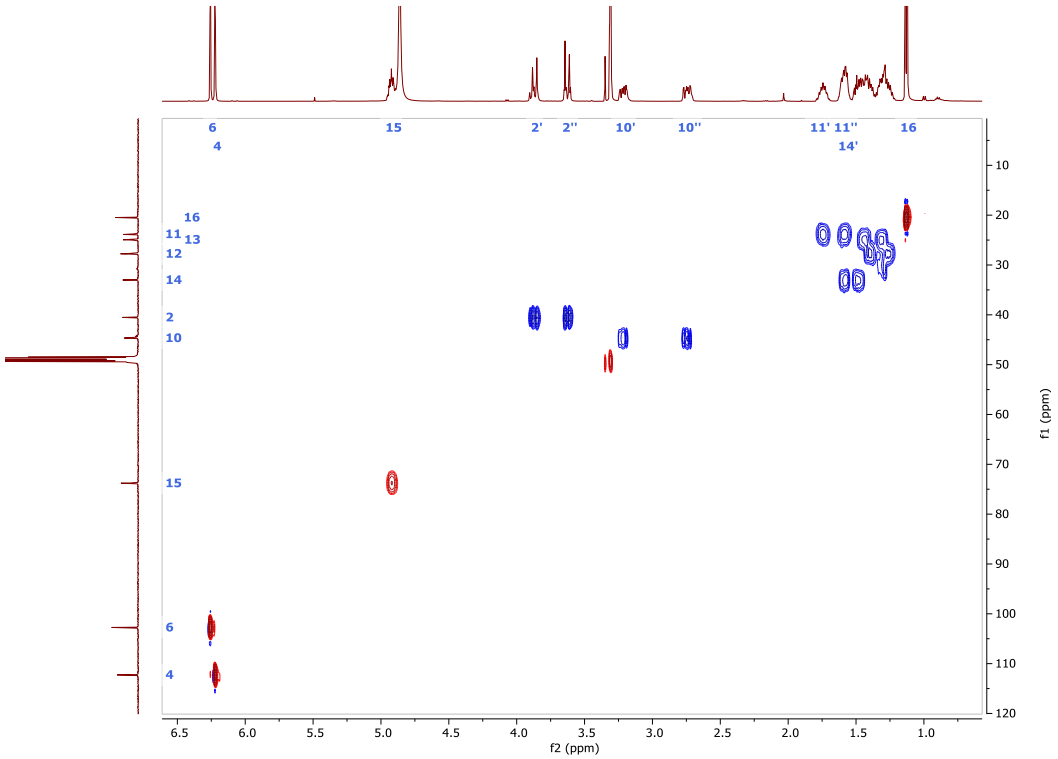


Figura 22. Espectro bidimensional HSQC de la curvularina (**49**)

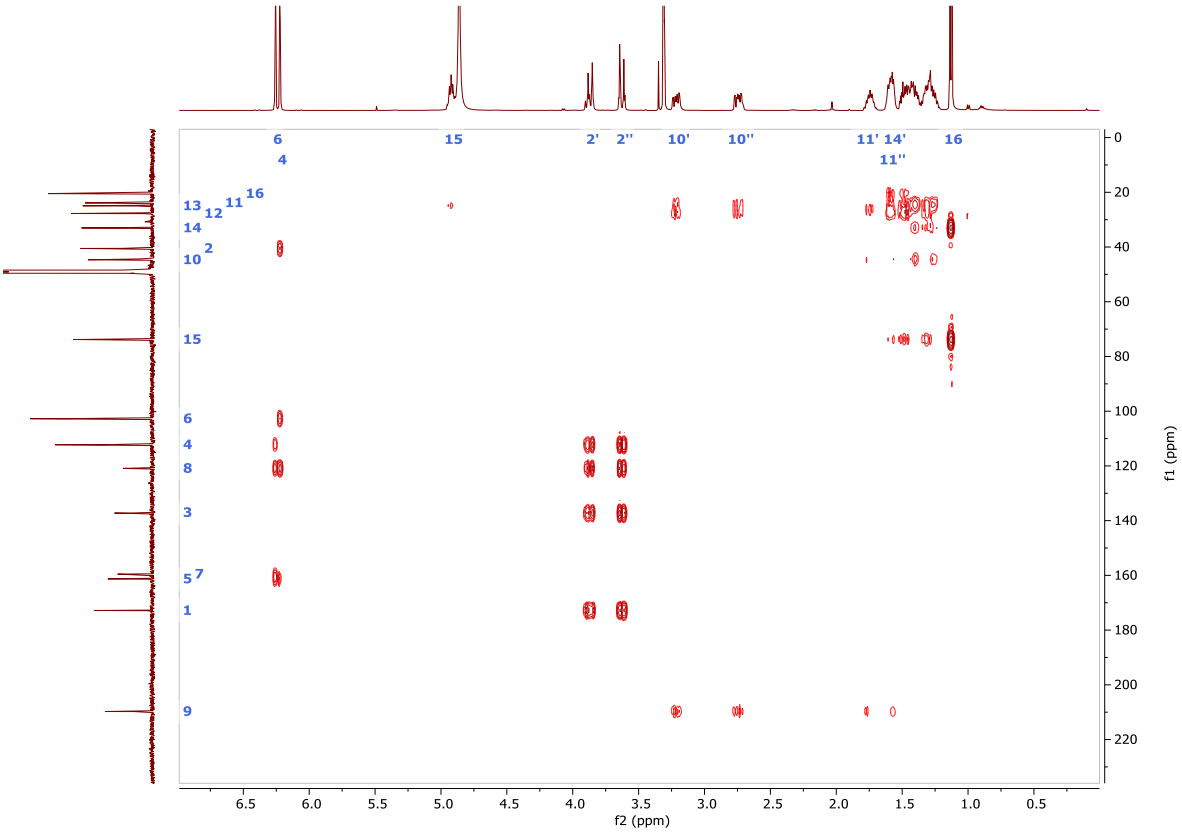


Figura 23. Espectro bidimensional HMBC de la curvularina (**49**)

La curvularina (**49**) es producida por varias especies de hongos, principalmente de los géneros *Aspergillius*, *Alternaria*, *Astragalus*, *Curvularia*, *Cochliobolus* y *Penicillium* (Wu *et al*., 2017). Este metabolito ha sido estudiado por sus propiedades biológicas, entre las que destacan su potencial como:

- Antiinflamatorio al inhibir la producción de óxido nítrico (NO) inducido por LPS en macrófagos 264.7 (Wu *et al*., 2017) y prostaglandina E_2 (PGE_2) (Ha *et al*., 2017)
- Antifúngico contra *Moniliophthora perniciosa, Digymella bryoniae y Fusarium solani glycines* (Ataides *et al*., 2018)
- Antimicrobiano contra *M. luteus, X. axanopodis pv. phaseali, S. aureus, E. coli y E. hirae* (Ataides *et al*., 2018)
- Anticancerígeno al inhibir la proteína 90 (Hsp90) (Aly *et al*., 2010)
- Herbicida contra *Digitaria sanguinalis* (Jiang *et al.*, 2008)

6.8 Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de *Penicillium* sp.

El perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de la especie fúngica seleccionada (**Figura 24**), cultivada en dos diferentes medios de cultivo mostró un mismo compuesto mayoritario con un tiempo de retención de 18.67 min, el cual corresponde al compuesto aislado curvularina (**49**).

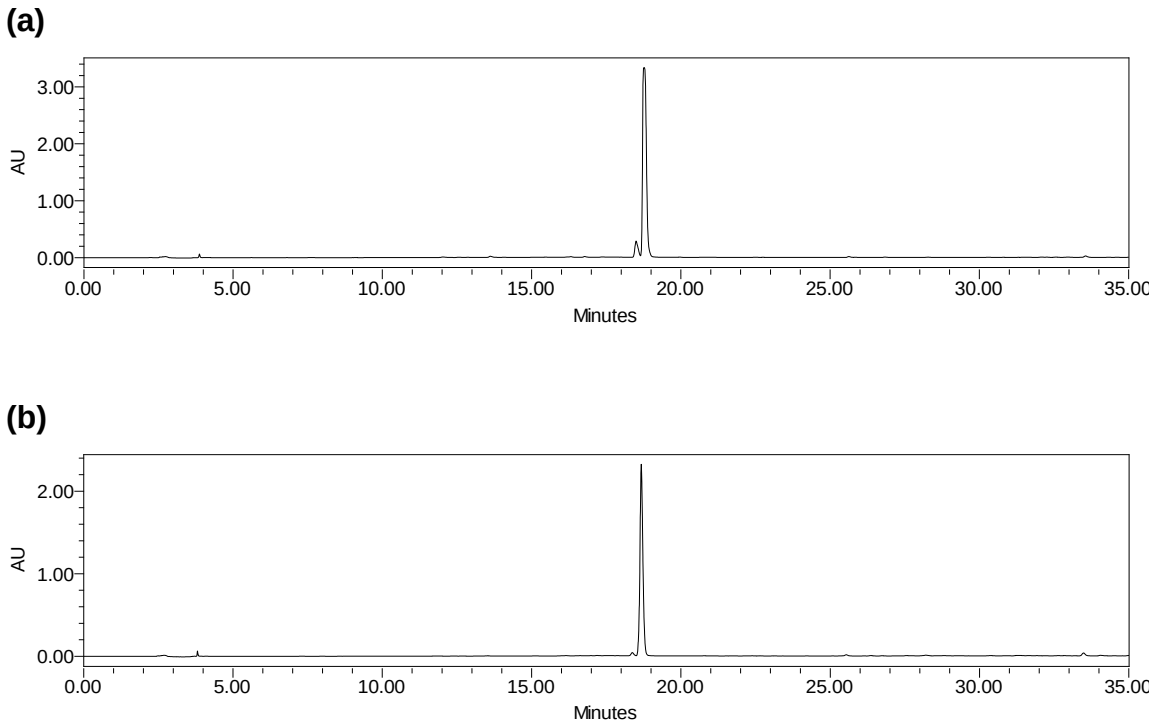
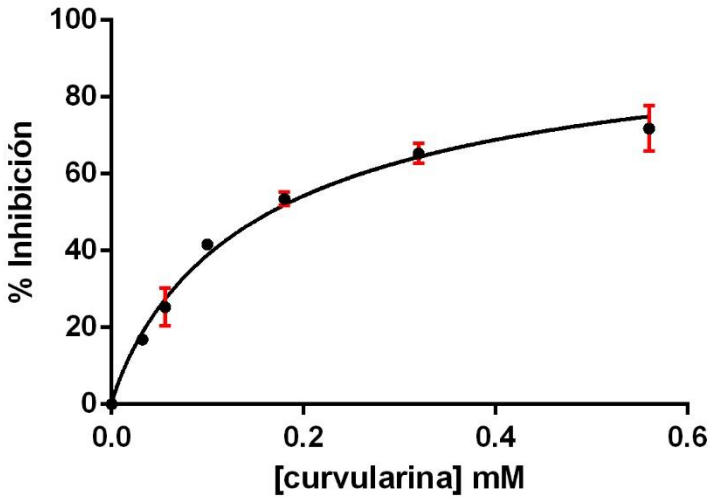


Figura 24. Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de *Penicillium sp*. (a) medio de cultivo de Cheerios®, (b) medio de cultivo de arroz.

6.9 Evaluación del efecto de curvularina (49) sobre la actividad de la enzima α-glucosidasa

Con la finalidad de comprobar si la curvularina (**49**) era el metabolito responsable de la actividad inhibitoria mostrada por el extracto orgánico, se determinó su potencial inhibitorio contra la enzima α-glucosidasa de levadura. Los resultados indicaron que el compuesto **49** inhibe la enzima con una CI_{50} de 0.15 mM, cuatro veces más potente que el control positivo acarbosa (CI_{50} de 0.6 mM), sin embargo, la curvularina solo inhibió a la enzima en un 70% a la concentración más alta. En la **Figura 25** se observa las curvas de concentración-respuesta. Es importante subrayar que la evaluación de la curvularina (**49**) como inhibidor de la enzima α-glucosidasa de levadura, es el primer reporte y complementa la información de sus propiedades terapéuticas.

(a)



(b)

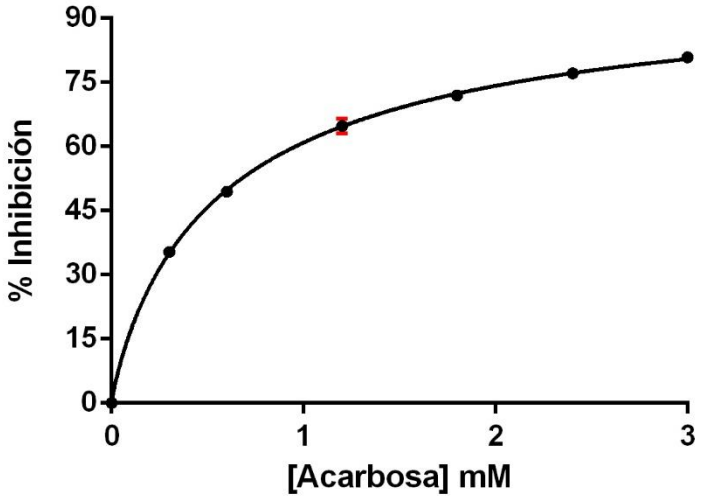


Figura 25. Curva de concentración-respuesta.
(a) curvularina (**49**), (b) acarbosa (**1**)

7. Conclusiones

Este proyecto demostró que nichos ecológicos como hormigueros y líquenes, albergan una gran diversidad de microorganismos fúngicos útiles para la obtención de compuestos bioactivos, algunos de los cuales podrían emplearse en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la diabetes.

A partir de las muestras de hormiguero y de liquen recolectadas en el estado de Hidalgo se aislaron 42 microorganismos fúngicos.

Se obtuvieron los extractos orgánicos de 20 cepas seleccionadas aleatoriamente y cultivadas en dos medios diferentes (arroz y Cheerios®).

Se estandarizaron las concentraciones de sustrato y acarbosa, así como el volumen de enzima a emplear en el ensayo de inhibición de las enzimas α-glucosidasas de intestino de rata.

Se evaluaron 40 extractos orgánicos como inhibidores de las enzimas α-glucosidasas de levadura y mamífero (*Saccharomyces cerevisiae* e intestino de rata), obteniendo 16 extractos que inhiben a la enzima de levadura, 10 de ellos con una actividad superior al 90%. Sin embargo no lograron una completa inhibición de la enzima de mamífero.

El estudio químico de la especie fúngica IQ-168 (*Penicillium* sp.*)*, permitió el aislamiento y la identificación del compuesto curvularina (**49**) mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

La curvularina (**49**) presentó actividad inhibitoria contra la enzima α-glucosidasa de levadura (CI_{50} = 0.15 mM), siendo cuatro veces más potente que el control positivo acarbosa (**1**) (CI_{50} 0.6 mM).

8. Perspectivas

Con base en los resultados de este proyecto, se pretende:

- Aislar e identificar los metabolitos minoritarios presentes en el extracto orgánico del medio de arroz de la especie fúngica IQ-168, perteneciente al género *Penicillium* sp. con el objetivo de completar su estudio químico.
- Evaluar el potencial inhibitorio de los metabolitos minoritarios aislados contra las enzimas α-glucosidasas, con el fin de encontrar posibles compuestos antihiperglucemiantes.
- Identificar taxonómicamente todos los microorganismos aislados de tierra de hormiguero y liquen.
- Analizar los extractos orgánicos obtenidos mediante la generación de redes moleculares con la plataforma GNPS.
- Explorar la actividad de los extractos obtenidos contra otros blancos moleculares útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.
- Realizar los estudios de metabolómica dirigida y no dirigida para identificar el metabolismo secundario de las especies fúngicas aisladas y, de esta manera, aislar productos novedosos con potencial terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.
- Realizar el estudio químico de las especies fúngicas prometedoras de acuerdo a los resultados del estudio de metabolómica y actividad biológica.

9. Bibliografía

Abdel, G. F., y Mohamed, K. Y. (2018). Natural Products for the Management of Diabetes. In *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 59).

Adisakwattana, S., Chantarasinlapin, P., Thammarat, H., y Yibchok-Anun, S. (2009). A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α-glucosidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *24*(5), 1194–1200.

Ali, S., Khan, A. L., Ali, L., Rizvi, T. S., Khan, S. A., Hussain, J., Hamayun, M. y Al-Harrasi, A. (2017). Enzyme inhibitory metabolites from endophytic *Penicillium* citrinum isolated from Boswellia sacra. *Archives of Microbiology*, *199*(5), 691–700.

Aly, A. H., Debbab, A., Edrada-Ebel, R. A., Müller, W. E. G., Kubbutat, M. H. G., Wray, V., Ebel, R. y Proksch, P. (2010). Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte Stemphylium botryosum isolated from Chenopodium album. *Mycosphere*, *1*(2), 153–162.

Ataides, D., Pamphile, J. A., Garcia, A., dos Santos Ribeiro, M. A., Polonio, J. C., Sarragiotto, M. H., y Clemente, E. (2018). Curvularin produced by endophytic Cochliobolus sp. G2-20 isolated from Sapindus saponaria L. and evaluation of biological activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(12), 32–37.

Azzollini, A., Boggia, L., Boccard, J., Sgorbini, B., Lecoultre, N., Allard, P. M., Rubiolo, P., Rudaz, S., Gindro, K., Bicchi, C y Wolfender, J. L. (2018). Dynamics of metabolite induction in fungal co-cultures by metabolomics at both volatile and non-volatile levels. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–12.

Bailey, C. J. (2017). Metformin : historical overview. *Diabetologia*, *60*(9), 1566–1576.

Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., y Carvalho, I. (2006). α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, *62*, 10277–10302.

Brooks, H. B., Geeganage, S., Kahl, S. D., Montrose, C., Sittampalam, S., Smith, M. C., y Weidner, J. R. (2012). Basics of Enzymatic Assays for HTS. In *Assay Guidance Manual* (pp. 46–51).

Centko, R. M., Ratnaweera, P. B., Tysoe, C., Withers, S. G., de Silva, E. D., y 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*, 76–80.

Chomicki, G., y Renner, S. S. (2017). The interactions of ants with their biotic environment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *284*, 1–9.

Daengrot, C., Rukachaisirikul, V., Tansakul, C., Thongpanchang, T., Phongpaichit, S., Bowornwiriyapan, K., y Sakayaroj, J. (2014). Eremophilane sesquiterpenes and diphenyl thioethers from the soil fungus *Penicillium copticola* PSU-RSPG138. *Journal of Natural Products*, *78*(4), 615–622.

Deepak, K., Reddy, N., y Challa, S. (2014). Role of Antidiabetic Compounds on Glucose Metabolism – A Special Focus on Medicinal Plant: Salacia sps. *Medicinal Chemistry*, *04*(03), 373–381.

Del Valle, P., Martínez, A.-L., Figueroa, M., Raja, H., y Mata, R. (2016). Alkaloids from the Fungus *Penicillium spathulatum* as α-Glucosidase Inhibitors. *Planta Medica*, *82*(14), 1286–1294.

Díaz, L., y Delgado, E. (2016). Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes. *Medicine (Spain)*, *12*(17), 935–946.

Everette, J. D., Walker, R. B., y Islam, S. (2013). Inhibitory Activity of Naturally Occurring Compounds Towards Rat Intestinal a-glucosidase using p-nitrophenyl-a-D-glucopyranoside (PNP-G) as a Substrate. *American Journal of Food Technology*, *8*(1), 65–73.

Fazio, A. T., Bertoni, M. D., Adler, M. T., Ruiz, L. B., Rosso, M. L., Muggia, L., Hager, A., Stocker-Wörgötter, E. y Maier, M. S. (2009). Culture studies on the mycobiont isolated from Parmotrema reticulatum (Taylor) Choisy: Metabolite production under different conditions. *Mycological Progress*, *8*, 359–365.

Ghisalberti, E. L., Hockless, D. C., Rowland, C. Y., y White, A. H. (1993). Structural Study of Curvularin, a Cell Division Inhibitor. *Australian Journal of Chemistry*, *46*, 571–575.

Ha, T. M., Ko, W., Lee, S. J., Kim, Y. C., Son, J. Y., Sohn, J. H., Yim, J. H. y Oh, H. (2017). Anti-inflammatory effects of curvularin-type metabolites from a marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5859 in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages. *Marine Drugs*, *15*(9), 1–12.

International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas*. 150.

Israili, Z. H. (2011). Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. American Journal of Therapeutics, 18, 11-152.

Jiang, S. J., Qiang, S., Zhu, Y. Z., y Dong, Y. F. (2008). Isolation and phytotoxicity of a metabolite from Curvularia eragrostidis and characterisation of its modes of action. *Annals of Applied Biology*, *152*(1), 103–111.

Joshi, S. R., Standl, E., Shah, ParagTong, N., Kalra, S., y Rathod, R. (2015). Therapeutic potential of α-glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *16*(13), 1959–1981.

Kellogg, J. J., y Raja, H. A. (2016). Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon. *Phytochemistry Reviews*, *16*(2), 271–293.

Kimura, A., Lee, J. H., Lee, I. S., Lee, H. S., Park, K. H., Chiba, S., y Kim, D. (2004). Two potent competitive inhibitors discriminating α-glucosidase family I from family II. *Carbohydrate Research*, *339*, 1035–1040.

Koul, M., y Singh, S. (2016). Penicillium spp. *Anti-Cancer Drugs*, *28*(1), 11–30.

Kozlovskii, A. G., Zhelifonova, V. P., y Antipova, T. V. (2013). Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *49*(1), 1–10.

Kozlovsky, A. G., Zhelifonova, V. P., y Antipova, T. V. (2013). Biologically active

metabolites of *Penicillium* fungi. *Signpost Open Access Journal of Organic and Biomolecular Chemistry*, *1*, 11–21.

Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., y Mahajan, S. (2018). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites *Penicillium*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*.

Kwon, O. S., Park, S. H., Yun, B.-S., Pyun, Y. R., y Kim, C.-J. (2000). Cyclo(Dehydroala-L-Leu), an a-Glucosidase Inhibitor from *Penicillium* sp. F70614. *The Journal of Antibiotics*, *53*(9), 954–958.

Lee, S., Chung, J. Y., Hong, K. S., Yang, S.-H., Byun, S.-Y., Lim, H.-S., Shin, S-H, Jang, J. y Yu, K.-S. (2012). Pharmacodynamic comparison of two formulations of Acarbose 100-mg tablets. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, *37*(5), 553–557.

Lin, A., Wu, G., Gu, Q., Zhu, T., y Li, D. (2013). New eremophilane-type sesquiterpenes from an Antarctic deep-sea derived fungus, *Penicillium* sp. PR19 N-1. *Archives of Pharmacal Research*, *37*(7), 839–844.

Liu, M., Qi, C., Sun, W., Shen, L., Wang, J., Liu, J., Lai, Y., Xue, Y., Hu, Z. y Zhang, Y. (2018). α-Glucosidase Inhibitors From the Coral-Associated Fungus Aspergillus terreus. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 422.

Liu, Y., Yang, Q., Xia, G., Huang, H., Li, H., Ma, L., Lu, Y., He, L., Xia, X. y She, Z. (2015). Polyketides with α-Glucosidase Inhibitory Activity from a Mangrove Endophytic Fungus, *Penicillium* sp. HN29-3B1. *Journal of Natural Products*, *78*(8), 1816–1822.

Luo, M., Cui, Z., Huang, H., Song, X., Sun, A., Dang, Y., Lu, L. y Ju, J. (2017). Amino Acid Conjugated Anthraquinones from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. SCSIO sof101. *Journal of Natural Products*, *80*(5), 1668–1673.

Malathi, V., Devi, S. S., y Revathi, K. (2010). Anti Diabetic Activity By the in Vitro Alpha Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity of Catharanthus Roseus. *The Biascan: International Journal of Life Sciences*, *5*(4), 655–659.

Munhoz, A. C. M., y Frode, T. S. (2018). Isolated Compounds from Natural Products with Potential Antidiabetic Activity - A Systematic Review. In *Current Diabetes Reviews* (Vol. 14).

Okuyama, M., Saburi, W., Mori, H., y Kimura, A. (2016). α-Glucosidases and α-1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(14), 2727–2751.

Petit, P., Lucas, E. M. F., Abreu, L. M., Pfenning, L. H., y Takahashi, J. A. (2009). Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, *12*(4), 1–9.

Rabha, J., y Jha, D. K. (2018). Metabolic Diversity of *Penicillium*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*.

Ranganathan, N., y Mahalingam, G. (2018). Secondary metabolite as therapeutic agent from endophytic fungi Alternaria longipes strain VITN14G of mangrove plant Avicennia officinalis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1–11.

Rangel, M., Rivero, I., Madariaga, A., Figueroa, M., y Mata, R. (2017). α-Glucosidase Inhibitors from Preussia minimoides. *Journal of Natural Products*, *80*(3), 582–587.

Ríos, J. L., Francini, F., y Schinella, G. R. (2015). Natural products for the treatment of type 2 Diabetes mellitus. *Planta Medica*, *81*, 975–994.

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

Schueffler, A., y Anke, T. (2014). Fungal natural products in research and development. *Natural Product Reports*, *31*(10), 1425–1448.

Sharma, V., y Sumbali, G. (2013). An overview of the symbiotic interaction between ants, fungi and other living organisms in ant-hill soils. *International Journal of Environmental Sciences*, *4*(3), 432–443.

Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K. y Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, *13*, 364–372.

VanderMolen, K. M., Raja, H. A., El-Elimat, T., y Oberlies, N. H. (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*, *3*, 1–10.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T. y Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, *78*, 343–371.

Wu, Y. H., Zhang, Z. H., Zhong, Y., Huang, J. J., Li, X. X., Jiang, J. Y., Deng, Y. Y., Zhang, L. H. y He, F. (2017). Sumalactones A-D, four new curvularin-type macrolides from a marine deep sea fungus: *Penicillium* Sumatrense. *RSC Advances*, *7*(63), 40015–40019.

Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., Gupta, V. K. y Saxena, A. K. (2018). Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*.

Ying, Y. M., Fang, C. A., Yao, F. Q., Yu, Y., Shen, Y., Hou, Z. N., Wang, Z., Zhang, W., Shan, W. G. y Zhan, Z. J. (2016). Bergamotane Sesquiterpenes with Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity from the Plant Pathogenic Fungus *Penicillium* expansum. *Chemistry and Biodiversity*, *14*(1).

Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V., y Kozlovsky, A. G. (2010). Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology*, *79*(3), 277–286.

Zhou, T., Xu, X., Du, M., Zhao, T., y Wang, J. (2018). A preclinical overview of metformin for the treatment of type 2 diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *106*, 1227–1235.