



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

“ESTUDIO QUÍMICO-BIOLÓGICO DE ASCOMICETOS PARA EL DESCUBRIMIENTO  
DE MODULADORES ALOSTÉRICOS DE LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA IB  
(hPTPIB<sub>1-400</sub>) E INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE CEPAS  
INTRAHOSPITALARIAS”

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. en C. INGRID YADIRA MARTÍNEZ ALDINO**

TUTOR

**Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ**

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM, CIUDAD DE MÉXICO, JULIO DE 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

### TEMA DE TESIS

“ESTUDIO QUÍMICO-BIOLÓGICO DE ASCOMICETOS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE MODULADORES ALOSTÉRICOS DE LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B (hPTPIB<sub>1-400</sub>) E INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE CEPAS INTRAHOSPITALARIAS”

**T E S I S**  
**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

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

**M. en C. INGRID YADIRA MARTÍNEZ ALDINO**

TUTOR  
**Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ**



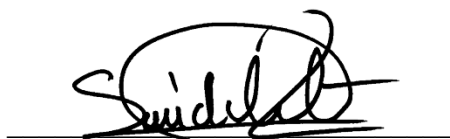
Ciudad de México, julio de 2023.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava  
Vocal: Dr. Ludger Wessjohann  
Vocal: Dr. José Luis Medina Franco  
Vocal: Dra. Carol Siseth Martínez Caballero  
Secretario: Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez

**Lugar donde se realizó la tesis:**

**Laboratorio 2-6, Departamento de Productos Naturales,  
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Suidel", is written over a horizontal line.

**Dr. José Alberto Rivera Chávez**  
**Tutor**

## ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas (IPB) en Halle, Alemania en el laboratorio del Dr. Ludger Wessjohann. Estancia realizada bajo el marco de los objetivos del German-Latin American Center of Infection & Epidemiology Research & Training (GLACIER). Proyecto: Exploring anthill soil fungi for antibiotics discovery. Duración: Junio-diciembre 2022.

## CONGRESOS

*Modalidad cartel.* **Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429.** Ingrid Y. Martínez-Aldino, Martha Villaseca-Murillo, Jesús Morales-Jiménez, José Rivera-Chávez. Natural Products in Drug Discovery and Development-Advances and Perspectives organized by Phytochemical Society of Europe. Iasi, Romania, on September 19-22, 2022. **Best e-Poster of PSE Meeting awarded by MDPI Journals-Marine Drugs.**

*Modalidad cartel.* **Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429.** Ingrid Y. Martínez-Aldino, Martha Villaseca-Murillo, Jesús Morales-Jiménez, José Rivera-Chávez. Vanguard of Natural Product Research organized by American Society of Pharmacognosy. Virtual Meeting on 16, 23 and 30 of July, 2021.

## SIMPOSIOS

*Modalidad cartel.* **Biodiversity and chemistry of mangrove-associated fungi for bioactive metabolites discovery.** Ingrid Y. Martínez-Aldino, Jesús Morales-Jiménez, José Rivera-Chávez. Simposio Interno del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México a 9 de diciembre de 2021.

*Modalidad cartel.* **Chemotaxonomic and metabolomic analysis of ascomycetes for natural products discovery.** Ingrid Martínez-Aldino, Jesús Morales-Jiménez, José Rivera-Chávez. Simposio Interno del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Modalidad virtual. 02 de diciembre de 2020. **Primer lugar.**

*Modalidad cartel.* **Chemistry and biodiversity of fungi from Mexico.** Ingrid Y. Martínez-Aldino and José Rivera-Chávez. Simposio Interno del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México a 21 de junio de 2019.

## **PUBLICACIÓN**

Ingrid Y. Martínez-Aldino, Martha Villaseca-Murillo, Jesús Morales-Jiménez, José Rivera-Chávez. Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429. *Bioorg. Chem.* 2021, 115. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105166

- **En revisión**

Ingrid Y. Martínez-Aldino, José Rivera-Chávez, and Jesús Morales-Jiménez. Taxonomic and chemical diversity of Mexican mangrove-associated ascomycetes to discover new or repositioning bioactive natural products. Enviada a la revista *Journal of Natural Products*. Fecha: 07 de junio de 2023.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas me proporcionó las herramientas necesarias para realizar y enriquecer mis estudios de posgrado.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez por crear las condiciones necesarias para realizar esta investigación y la estancia académica que realicé en el Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas (IPB) en Halle, Alemania. Por sus valiosas enseñanzas y consejos que ayudaron a solidificar y enriquecer mi formación académica. ¡Muchas gracias!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado (No. de CVU 818044) y por el financiamiento autorizado a través del proyecto Ciencia de Frontera: CF-2019-263977.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422) por el financiamiento otorgado.

Al personal técnico del Instituto de Química: Dra. Beatriz Quiroz-García, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Quím. María de los Ángeles Peña González, Dra. Adriana Romo Pérez y Dra. Celia Bustos Brito por la obtención de los datos espectroscópicos; M. en C. Everardo Tapia Mendoza por realizar el análisis de espectrometría de masas en tándem; Dra. María del Carmen García-González por la obtención de datos espectrométricos; M. en I. Maricruz López López por su labor en el manejo de los residuos químicos y biológicos generados en esta investigación; M. A. José David Vázquez Cuevas, Mtra. María Magdalena Aguilar Araiza e Ing. Yan Alejandro García Hernández por su apoyo en los servicios de cómputo.

Al consorcio German-Latin American Center of Infection & Epidemiology Research & Training (GLACIER) por el financiamiento otorgado para realizar una estancia de investigación en el Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas (IPB) en Halle, Alemania.

A las Dras. Rachel Mata Essayag y Martha Lydia Macías Rubalcava por sus valiosos comentarios en cada evaluación tutorial, los cuales ayudaron a enriquecer este trabajo.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Ludger Wessjohann por brindarme la oportunidad de realizar una estancia académica en el Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas (IPB) y por su amable recibimiento en el mismo.

Al Dr. Norbert Arnold por su generosa hospitalidad y orientación durante mi estancia en el departamento en el departamento de Productos Naturales & Metabolómica del IPB. Gracias a su apoyo, tuve la oportunidad de sumergirme en el maravilloso mundo de los Basidiomicetos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) por proporcionar la instrumentación necesaria para la adquisición de los datos espectroscópicos.

Al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) por proporcionar el equipo necesaria para la adquisición de los datos espectrométricos.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC, LANCAD-UNAM-DGTIC-374) de la UNAM por la asignación de recursos de cómputo para la realización de los cálculos computaciones realizados en esta investigación.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez, por la expresión y purificación de la proteína *hPTPIB<sub>1-400</sub>*.

Al Dr. Alejandro Dorazco González, por facilitar los equipos para la obtención de espectros de UV y fluorescencia.

A mis compañeros del laboratorio 2-6. Por su apoyo, colaboración y por hacer amenos los días de trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis amados padres, Yadira Aldino y Víctor Martínez. Les agradezco profundamente por haberme inyectado valentía en los momentos en que más lo necesité. Su amor y apoyo incondicional han sido fundamentales en este camino. Este logro también les pertenece.

A mi amada hermana, Isidra Martínez. Por todas alegrías y momentos difíciles compartidos. Por ser un rayito de luz en mi vida.

Al amor de mis días, Sergio López. Por tu amor, confianza y apoyo constante. El recorrido de este viaje científico no habría sido lo mismo sin ti a mi lado.

A mis amados abuelos Víctor Martínez, Guadalupe Orozco<sup>†</sup>, Sergio Aldino<sup>†</sup> e Isidra Yen<sup>†</sup>. Su amor y sabiduría han dejado una huella imborrable en mi ser.

A mis amigos, Karen Carrera, Lina Bolívar, Miriam Díaz, Alex Gil, Óscar Jiménez, Roberto Bahena, Enrique Aguilar, Adriana Romo. Gracias por abrazarme en los momentos difíciles y por celebrar conmigo los instantes felices. Los quiero.

A las personas maravillosas que tuve a bien conocer en mi estancia en Alemania, Hannes B., Javiel Fernández, Yadiel Vázquez, Ghislain Fotso, Dayana Alonso, Alejandro Inostroza, Katherine Muñoz, Miguel Fernández, Karen Rojas, Mthandazo Dube, Yen Lam, Josefina Lange, Lea Schmitz, Jonas Kappen, Carlos Correa, Lesli Valdes y Rocmira Pérez. Su alegría y entusiasmo contagiosos hicieron que cada experiencia fuera aún más especial.



## DEDICATORIAS

*A mi amada familia, los Martínez y los Aldino.*

*Al amor de mi vida, Sergio.*

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido.  
Ahora es el momento de entender más,  
para que podamos temer menos.”  
-Marie Curie.*

## CONTENIDO

CAPÍTULO I .....	VI
Configuración absoluta de xantopocina, una naftopirona dimérica de <i>Penicillium</i> sp. IQ-429 y su actividad inhibitoria sobre la proteína tirosina fosfatasa IB .....	VI
CAPÍTULO II .....	VIII
Diversidad química y taxonómica de ascomicetos de manglares para el descubrimiento de inhibidores de la hPTPIB <sub>1-400</sub> o del crecimiento de bacterias intrahospitalarias.....	VIII
RESUMEN.....	X
CONCLUSIONES GENERALES .....	XIV
ABSTRACT .....	XV

## CAPÍTULO I

### **Configuración absoluta de xantopocina, una naftopirona dimérica de *Penicillium* sp. IQ-429 y su actividad inhibitoria sobre la proteína tirosina fosfatasa IB**

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	5
I ANTECEDENTES .....	8
I.1 Generalidades sobre las proteínas tirosina fosfatasa .....	8
I.2 Estructura de la PTPIB.....	8
I.3 PTPIB y su participación en desordenes metabólicos .....	10
I.4 Inhibidores de PTPIB.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.1.1 Objetivos específicos.....	16
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	17
3.1 Aislamiento de los microorganismos fúngicos .....	17
3.2 Obtención de extractos fúngicos .....	17
3.3 Identificación taxonómica de la cepa IQ-429.....	18
3.4 Procedimientos experimentales generales.....	19

3.4.1	Análisis cromatográficos .....	19
3.4.2	Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas .....	19
3.5	Estudio químico del microorganismo IQ-429.....	20
3.6	Ensayos de inhibición enzimática.....	22
3.7	Estudios de cinética enzimática.....	23
3.8	Estudios <i>in silico</i> .....	24
3.8.1	Cálculos de dicroísmo circular electrónico (ECD) y de desplazamientos.....	24
3.8.2	Predicción de la estructura tridimensional de la <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> .....	25
3.8.3	Proteína y ligando.....	25
3.8.4	Acoplamiento molecular.....	25
3.8.5	Simulaciones de dinámica molecular (DM).....	26
3.8.6	Cálculo de descriptores ADME .....	26
3.9	Experimentos de apagamiento de la fluorescencia.....	27
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
4.1	Estudio químico de <i>Penicillium</i> sp. (IQ-429).....	29
4.2	Determinación de la configuración absoluta de xantoeopocina (I) .....	30
4.3	Determinación de las propiedades inhibitorias de xantoeopocina (I) sobre <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> .....	31
4.4	Estudios de acoplamiento molecular .....	33
4.5	Simulaciones de dinámica molecular (DM) .....	34
4.6	Experimentos de apagamiento de la fluorescencia de <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> con xantoeopocina (I) .....	36
4.7	Predicciones <i>in silico</i> de las propiedades ADME de xantoeopocina (I) .....	38
5	CONCLUSIONES.....	42
6	REFERENCIAS .....	43
7	PUBLICACIÓN .....	56

## CAPÍTULO II

### Diversidad química y taxonómica de ascomicetos de manglares para el descubrimiento de inhibidores de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> o del crecimiento de bacterias intrahospitalarias.

LISTA DE FIGURAS .....	67
LISTA DE TABLAS .....	71
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	72
I. ANTECEDENTES .....	75
I.1 Distribución taxonómica de PNs (productos naturales) de origen fúngico .....	75
I.2 Metabolitos fúngicos de importancia médica.....	76
I.3 Nuevas estrategias para el descubrimiento de PNs (productos naturales).....	80
I.4 Hongos de manglares.....	85
I.4.1 Productos naturales (PNs) de hongos de manglares .....	87
I.5 Problemas de salud pública.....	90
I.5.1 Generalidades de la <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> .....	91
I.5.2 Resistencia a los antimicrobianos (RAM)-ESKAPE .....	91
2. HIPÓTESIS.....	94
3 OBJETIVOS.....	94
3.1 Objetivo general.....	94
3.1.2 Objetivos específicos .....	94
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	95
4.1 Aislamiento de las cepas fúngicas de estudio.....	95
4.1.2 Caracterización taxonómica de las cepas fúngicas .....	96
4.2 Extractos fúngicos.....	96
4.3 Procedimientos generales .....	96
4.3.1 Análisis cromatográficos .....	96
4.3.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas .....	97
4.4 Estudio químico del microorganismo <i>Scytalidium</i> sp. (IQ-074).....	98
4.4.1 Fraccionamiento primario .....	98
4.4.1.1 Aislamiento del ácido 7-desoxipapiracílico A ( <b>21</b> ) .....	99
4.4.1.2 Aislamiento del ácido papiracílico A ( <b>20a-20d</b> ). .....	101
4.4.1.3 Aislamiento de los scytalpolioles A al D ( <b>22-25</b> ) .....	101

4.4.1.4 Aislamiento del scytalminol A (26).....	103
4.5 Estudio químico del microorganismo <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053).....	104
4.5.1 Fraccionamiento primario .....	105
4.5.1.2 Aislamiento de los metabolitos secundarios del extracto orgánico de <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053).....	106
4.6 Análisis de redes moleculares utilizando la herramienta web GNPS.....	110
4.7 Evaluaciones biológicas .....	112
4.7.1 Ensayos de inhibición enzimática frente <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> .....	112
4.7.2 Ensayos antibacterianos .....	112
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	114
5.1 Microorganismos fúngicos aislados y su análisis taxonómico .....	114
5.2 Exploración de la diversidad química de los ascomicetos aislados.....	119
5.3 Cribado de actividad biológica.....	128
5.3.1 Inhibición de la <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> .....	129
5.3.2 Inhibición del crecimiento bacteriano .....	130
5.4 Selección de las cepas fúngicas para su estudio químico.....	131
5.4.1 Estudio químico de <i>Scytalidium</i> sp. (IQ-074).....	134
5.4.2 Estudio químico de <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053).....	144
5.5 Evaluación biológica de los compuestos aislados.....	146
5.5.1 Inhibición de la actividad inhibitoria de la enzima <i>hPTPIB</i> <sub>1-400</sub> por los compuestos aislados de <i>Scytalidium</i> sp. (IQ-074).....	146
5.5.2 Actividad antibacteriana de los compuestos aislados de <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053) .....	147
6 CONCLUSIONES.....	151
7 PERSPECTIVAS.....	151
9 ANEXOS II .....	165
10 PUBLICACIÓN EN REVISIÓN .....	224

## RESUMEN

El presente trabajo de tesis forma parte de un proyecto multidisciplinario cuyo objetivo principal es la búsqueda de moléculas inhibitoras de la enzima *hPTPIB<sub>1-400</sub>* y de bacterias de aislamiento intrahospitalario a partir de ascomicetos. Las cepas fúngicas estudiadas fueron aisladas en sustratos colectados en dos nichos ecológicos diferentes: suelo de una zona semidesértica de San Luis Potosí, México y en el manglar de la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz, México.

Mediante un estudio biodirigido de cepas fúngicas de suelo semidesértico de San Luis Potosí, México, se logró el aislamiento e identificación de xantoepecina (**1**). Un producto natural (PN) reportado previamente por Igarasi, *et al.* De acuerdo con estudios enzimáticos *in vitro* de la *hPTPIB<sub>1-400</sub>* con **1**, se determinó que este compuesto inhibe a la enzima mediante un mecanismo de inhibición de tipo mixto, con un valor de  $CI_{50}$  de  $8.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$ . Empleando estudios de apagamiento de la fluorescencia de *hPTPIB<sub>1-400</sub>* frente a **1**, se determinó que este PN se une a la enzima con una constante de afinidad ( $k_d$ ) de  $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Por otro lado, un estudio multi-informativo que involucró tres niveles de información: taxonomía, metabolómica no dirigida y el cribado biológico del extracto orgánico obtenido de ascomicetos de la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz, México, dirigió al aislamiento de seis PNs nuevos; el ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**), los scytopolioles A-D (**22-25**) y el scytalminol A (**26**). Entre ellos, **23** y **26** inhiben la actividad fosfatasa de *hPTPIB<sub>1-400</sub>* con valores de  $CI_{50}$  de  $27.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$  y  $44.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$ , respectivamente. Asimismo, se realizó el reposicionamiento de citosporona B (**29**), que a una concentración de  $50 \mu\text{g/mL}$  inhibe el crecimiento bacteriano de las cepas patógenas *Staphylococcus aureus* ( $\text{CMI} = 21 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ ), *Staphylococcus epidermidis* 42R ( $\text{CMI} = 18 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ ). Adicionalmente, a la misma concentración, **29** inhibe moderadamente el crecimiento de la bacteria panresistente *Acinetobacter baumannii* A564 ( $51.0 \pm 1.3 \%$ ). Diaportalasina (**32**) inhibió el crecimiento de las bacterias mencionadas, con los siguientes porcentajes de inhibición;  $94.4 \pm 0.7\%$  (*S. aureus*),  $99.3 \pm 0.3\%$  (*S. epidermidis* 42R) y  $30.2 \pm 3.4\%$  (*A. baumannii* A564).

A continuación, se presenta de manera puntual el resumen para cada capítulo.

## CAPÍTULO I

La proteína tirosina fosfatasa IB (PTPIB) es una diana terapéutica importante para el desarrollo de fármacos contra la DMT2, la obesidad y el cáncer. Sin embargo, en el pasado, los programas de investigación dirigidos a esta enzima se centraban en descubrir inhibidores de modelos truncos ( $hPTPIB_{1-282}$ ,  $hPTPIB_{1-298}$  o  $hPTPIB_{1-321}$ ), perdiendo información valiosa sobre el mecanismo de inhibición y la selectividad de los ligandos. No obstante, el hallazgo de un sitio alostérico en  $hPTPIB_{1-321}$  y la expresión de la proteína de longitud completa ( $hPTPIB_{1-400}$ ), han cambiado las estrategias para descubrir nuevos inhibidores de este blanco terapéutico. En consecuencia, como parte de un proyecto dirigido a encontrar inhibidores no competitivos de  $hPTPIB_{1-400}$  a partir de ascomicetos, se investigó químicamente el extracto de *Penicillium* sp. (IQ-429), un microorganismo aislado en suelo de una zona semidesértica de San Luis Potosí, México.

El estudio químico de *Penicillium* sp. (IQ-429) condujo al aislamiento de xantoe pocina (I), un producto natural (PN) previamente aislado por Igarashi y colaboradores a partir del hongo *Penicillium simplicissimum* IFO5762. Sin embargo, hasta ahora no se había determinado su configuración absoluta. En este trabajo, se analizaron tanto los espectros de dicroísmo circular electrónico (DCE) experimentales y calculados. Asimismo, se realizó el análisis estadístico DP4+ para determinar la configuración absoluta de I como 7R8S9R7'R8'S9'R. El compuesto I inhibió la actividad de  $hPTPIB_{1-400}$  con un valor de  $CI_{50}$  de  $8.8 \pm 1.0 \mu M$ , mediante un mecanismo de inhibición de tipo mixto, con valores de  $k_i$  y  $ak_i$  de 5.5 y 6.6  $\mu M$ , respectivamente. El acoplamiento molecular ciego (*docking*) de xantoe pocina (I) con un modelo generado por homología para la proteína  $hPTPIB_{1-400}$  predijo que I se une en un sitio diferente de la tríada catalítica, en la interfaz de los dominios N y C-terminal. Las simulaciones de dinámica molecular (DM) predijeron que I bloquea el asa WPD de  $hPTPIB_{1-400}$  en una conformación cerrada, impidiendo la unión al sustrato y con ello la catálisis, sugiriendo una modulación alostérica desencadenada por cambios conformacionales y dinámicos a gran escala. Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de  $hPTPIB_{1-400}$  frente a I indicaron que el compuesto apaga la fluorescencia de la enzima y actúa como un apagador estático ( $K_{SV} = 1.1 \times 10^5 M^{-1}$ ). Estos resultados también revelaron que I se une a la proteína con una constante de afinidad ( $k_a$ ) de  $3.7 \times 10^5 M^{-1}$ . Finalmente, utilizando

la herramienta web SwissADME, se realizaron predicciones sobre las propiedades ADME, la similitud a fármacos (*drug-like*) y el posible comportamiento como un compuesto de interferencia en múltiples ensayos (PAIN, *pan-assay interference compound*) de **1**.

## CAPÍTULO II

Se realizó el primer estudio de bioprospección de hongos de manglar de la Laguna de la Tamiahua, El Ídolo, Veracruz, México. Se obtuvo una colección de 43 cepas fúngicas, las cuales se clasificaron mediante el análisis de la región ITS en 14 géneros: *Geosmithia*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Gelasinospora*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Diaporthe*, *Scytalidium*, *Curvularia*, *Westerdykella*, *Scolecobasidium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. El estudio de metabólica no dirigida (utilizando la plataforma web GNPS) de la colección de extractos derivados del cultivo de estos microorganismos en dos medios sólidos (cereal Cheerios® y arroz), resultó en la desreplicación de 19 productos naturales (PNs) identificados previamente en ascomicetos: oxalicina B (**1**), esclerotioramina (**2**), zearalenona (**3**), ocrefilona (**4**), ácido secalónico B (**5**), 7-butil-6,8-dihidroxi-3(R)-pent-11-enilisocroman-1-one (**6**), lovastatina (**7**), butirolactona I (**8**), pirofeno (**9**), fonsecina (**10**), butirolactona III (**11**), malformina B4 (**12**), esterigmatocistina (**13**), beauvericina (**14**), 7-hidroxi-3-(2-hidroxipropil)-5-metilisocromen-1-ona (**15**), hipomurocina A (**16**), tricorzina IV (**17**), auranticina A (**18**) y pilobolusona C (**19**). Asimismo, el análisis de redes moleculares (RMs) generado tras la aplicación del algoritmo MolNetEnhancer iluminó detalles sobre la diversidad estructural contenida en la colección de extractos; se encontraron 24 clases químicas de PNs, demostrando el potencial que tienen los hongos de manglares de la zona del golfo de México en el descubrimiento de PNs estructuralmente diversos.

Se realizó un cribado de actividad biológica de los extractos frente a la enzima *hPTPIB<sub>1-400</sub>* y a ciertas bacterias del grupo ESKAPE, acrónimo establecido para destacar los patógenos que causan la mayoría de las infecciones hospitalarias y "escapan" eficazmente a los efectos de los fármacos antibacterianos. Este conjunto de bacterias está compuesto por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*. También se incluyó una cepa de *S.*



*epidermidis*. El estudio reveló que las cepas fúngicas aisladas representan una fuente prometedora de compuestos inhibidores de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> y del crecimiento de la bacteria grampositiva *S. aureus*.

La integración de la información descrita anteriormente (taxonómica, metabolómica no dirigida y cribado biológico) de este conjunto de microorganismos condujo a la selección de los dos ascomicetos más adecuados para el descubrimiento de nuevos PNs y para realizar el reposicionamiento de PNs útiles en el desarrollo de nuevos antibióticos. El primer microorganismo estudiado fue *Scytalidium* sp. (IQ-074), su selección se realizó primordialmente bajo la hipótesis de que taxones fúngicos poco estudiados puede conducir al aislamiento de PNs nuevos. Como resultado de su análisis químico, se logró el aislamiento de cuatro diastereoisómeros del ácido papiracílico A (**20a** - **20d**) y seis PNs nuevos; el ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**) aislado como una mezcla de dos diastereoisómeros que se encuentran en una relación 1:1 y cinco policétidos lineales nombrados como scytapolioles A-D (**22-25**) y el scytalminol A (**26**). Es la primera vez que esta clase estructural de compuestos se identifican en el género *Scytalidium*. Entre ellos, **23** y **26** inhiben la actividad fosfatasa de *hPTPIB*<sub>1-400</sub> con valores de  $CI_{50}$  de  $27.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$  y  $44.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$ , respectivamente. Siendo tan activos como el control positivo (ácido ursólico).

El segundo taxón estudiado químicamente, *Diaporthe* sp. (IQ-053), seleccionado por su importante actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de cepas intrahospitalarias, condujo al aislamiento de seis PNs conocidos: dotiorelona A (**27**) e I (**28**), las citosporonas B (**29**) y C (**30**), pestalotiopsona B (**31**) y la diaportalasina (**32**). Entre ellos, el compuesto **29** ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) mostró una destacada actividad inhibitoria del crecimiento de *S. aureus* (CMI =  $21 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ ) y *S. epidermidis* 42R (CMI =  $18 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ ) Estos resultados pueden posicionar a la citosporona B (**29**) como una molécula líder en la búsqueda de un nuevo antibiótico de amplio espectro, ya que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y presenta moderada actividad inhibitoria frente a la bacteria panresistente gramnegativa *Acinetobacter baumannii* A564 ( $51.0 \pm 1.3 \%$ ). Asimismo, la diaportalasina (**32**) inhibió el crecimiento de las bacterias mencionadas, con los siguientes porcentajes de inhibición  $94.4 \pm 0.7\%$  (*S. aureus*),  $99.3 \pm 0.3\%$  (*S. epidermidis* 42R) y  $30.2 \pm 3.4\%$  (*A. baumannii* A564).

## CONCLUSIONES GENERALES

- Esta investigación destaca la importancia del estudio de cepas fúngicas como fuentes de productos naturales (PNs) que inhiben la actividad de la proteína tirosina fosfatasa IB ( $hPTPIB_{1-400}$ ) y el crecimiento bacteriano de cepas intrahospitalarias. Se reportan tres PNs como inhibidores de la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ ; la xantoepecina (**1**) y dos policétidos lineales nuevos, el scytopoliol B (**23**) y el scytopolminol A (**26**). Asimismo, se informa que citosporona B (**29**) y diaportalasina (**32**) inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Staphylococcus epidermidis* 42R. Además, estos PNs inhiben moderadamente el crecimiento de la bacteria panresistente *Acinetobacter baumannii* A564.
- El estudio químico-biológico de ascomicetos aislados de ambientes poco explorados, a través de enfoques interdisciplinarios unificados en plataformas multi-informativas, es una estrategia alternativa para el aislamiento e identificación de nuevas moléculas, uno de los principales desafíos en esta área de investigación. En este trabajo, la integración de diversos niveles de información, por ejemplo, taxonómica, metabolómica y bioactividad de un conjunto de ascomicetos, permitió enfocar los esfuerzos en cepas fúngicas poco estudiadas para el descubrimiento de nuevas entidades bioactivas. En este caso, se reportan varios PNs nuevos, tales como el ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**), los scytopolios A-D (**22-25**) y el scytopolminol A (**26**). Estos hallazgos sientan las bases para futuras investigaciones que tengan como objetivo el aislamiento de nuevos PNs de origen fúngico.

## ABSTRACT

This thesis is part of a multidisciplinary project, the main objective of which is to search for molecules based on ascomycetes as inhibitors of the  $hPTPIB_{1-400}$  enzyme and pathogenic bacteria. The fungal strains studied were isolated from substrates collected from two different ecological niches: semi-desert soil in San Luis Potosí, Mexico, and the mangrove of Tamiahua Lagoon-El Ídolo, Veracruz, Mexico.

Xanthoepocin (**1**) was isolated and identified through a biodirected study of fungal strains isolated from semi-desert soils in San Luis Potosí, Mexico. Compound **1** was first described by Igarasi, *et al.* *In vitro* enzymatic studies of  $hPTPIB_{1-400}$  with **1** determined that this compound inhibits the enzyme through a mixed-type inhibition mechanism, with a  $IC_{50}$  value of  $8.8 \pm 1.0 \mu M$ . Fluorescence quenching studies of  $hPTPIB_{1-400}$  in the presence of **1** determined that this NP binds to the enzyme with an affinity constant ( $k_d$ ) of  $3.7 \times 10^5 M^{-1}$ .

A multi-informative study involving three levels of information: taxonomy, untargeted metabolomics, and biological screening of organic extracts obtained from ascomycetes from Tamiahua Lagoon, El Ídolo, Veracruz, Mexico, led to the isolation of six new NPs: 7-desoxypapiracylic acid A (**21a** and **21b**), scytopolioles A-D (**22-25**), and scytalminol A (**26**). Among them, **23** and **26** inhibit the phosphatase activity of  $hPTPIB_{1-400}$  with  $IC_{50}$  values of  $27.0 \pm 1.7 \mu M$  and  $44.1 \pm 1.9 \mu M$ , respectively. Additionally, the repositioning of cytosporone B (**29**) was carried out, which at a concentration of  $50 \mu g/mL$  inhibited the bacterial growth of pathogenic strains, *Staphylococcus aureus* (MIC =  $21 \pm 2.6 \mu g/mL$ ), and *Staphylococcus epidermidis* 42R (MIC =  $18 \pm 2.9 \mu g/mL$ ). Furthermore, at the same concentration, **29** moderately inhibited the growth of the pan-resistant bacterium *Acinetobacter baumannii* A564 ( $51.0 \pm 1.3 \%$ ). Diaporthalasin (**32**) is another NP that inhibited the growth of the mentioned bacteria, with the following inhibition percentages:  $94.4 \pm 0.7\%$  (*S. aureus*),  $99.3 \pm 0.3\%$  (*S. epidermidis* 42R), and  $30.2 \pm 3.4\%$  (*A. baumannii* A564).

A concise summary of each chapter is provided below.

## CHAPTER I

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is an active target for developing drugs to treat type II diabetes, obesity, and cancer. However, in the past, research programs targeting this enzyme focused on discovering inhibitors of truncated models (*hPTP1B*<sub>1-282</sub>, *hPTP1B*<sub>1-298</sub>, or *hPTP1B*<sub>1-321</sub>), missing valuable information about the ligands' mechanism of inhibition and selectivity. Nevertheless, finding an allosteric site in *hPTP1B*<sub>1-321</sub>, and the full-length (*hPTP1B*<sub>1-400</sub>) protein expression, has shifted the strategies to discover new PTP1B inhibitors. Accordingly, as part of a research program directed at finding non-competitive inhibitors of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> from Ascomycetes, the extract of *Penicillium* sp. (IQ-429) was chemically investigated. This fungus was isolated from a semi-desert area of San Luis Potosí, Mexico.

Chemical study of *Penicillium* sp. (IQ-429) led to the isolation of xanthoepocin (**I**), a natural product (NP) previously isolated by Igarashi, *et al.* from the fungus *Penicillium simplicissimum* IFO5762. However, its absolute configuration has not been determined. In this work, experimental and calculated electronic circular dichroism (ECD) spectra together with GIAO-NMR DP4+ statistical analysis was performed to determine the absolute configuration of **I** as 7R8S9R7'R8'S9'R. Xanthoepocin (**I**) inhibited the phosphatase activity of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> (IC<sub>50</sub> value of 8.8 ± 1.0 μM) in a mixed-type fashion, with  $k_i$  and  $\alpha k_i$  values of 5.5 and 6.6 μM, respectively. Docking Xanthoepocin (**I**) with a homologated model of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> indicated that it binds in a pocket different from the catalytic triad at the interface of the N and C-terminal domains. Molecular dynamics (MD) simulations showed that **I** locks the WPD loop of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> in a closed conformation, avoiding substrate binding, product release, and catalysis. These results suggest an allosteric modulation triggered by large-scale conformational and dynamic changes. Intrinsic quenching fluorescence experiments indicated that **I** behaves like a static quencher of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> ( $K_{SV} = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), corroborating that it binds to the enzyme with an affinity constant ( $k_a$ ) of  $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Finally, using the SwissADME web tool, predictions were made regarding ADME properties, *drug-likeness*, and potential behavior as a pan-assay interference compound (PAIN) of **I**.

## CHAPTER II

The first bioprospecting study of mangrove fungi from the Tamiahua Lagoon, El Ídolo, Veracruz, Mexico, was conducted. A collection of 43 fungal strains were obtained and classified through ITS region analysis, resulting in 14 genera: *Geosmithia*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Gelasinospora*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Diaporthe*, *Scytalidium*, *Curvularia*, *Westerdykella*, *Scolecobasidium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Untargeted metabolomic analysis (using the GNPS web platform) of the extracts derived from culturing these microorganisms on two solid media (Cheerios® cereal and rice) resulted in the dereplication of 19 previously identified natural products (NPs) in ascomycetes: oxalicine B (1), sclerotioramine (2), zearalenone (3), ocrephilone (4), secalonic acid B (5), 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one (6), lovastatin (7), butyrolactone I (8), pyrophen (9), fonsecin (10), butyrolactone III (11), malformin B4 (12), sterigmatocystin (13), beauvericin (14), 7-hydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-5-methylisochromen-1-one (15), hypomurocin A (16), trichorzine IV (17), auranticin A (18), and pilobolusone C (19). Additionally, the analysis of molecular networks (MN) generated by applying the MolNetEnhancer algorithm illuminated details about the structural diversity contained in the extract collection; 24 chemical classes of NPs were found, demonstrating the potential of mangrove fungi from the Gulf of Mexico region to discover structurally diverse NPs.

Moreover, biological activity screening of the extracts against the enzyme *hPTPIB<sub>1</sub>*<sub>400</sub> and certain ESKAPE group bacteria was conducted. The ESKAPE group is an acronym established to highlight pathogens that cause the majority of hospital-acquired infections and effectively "escape" the effects of antibacterial drugs. This group of bacteria includes *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter species*. We also include *Staphylococcus epidermidis*. The study revealed that the isolated fungal strains represent a promising source of *hPTPIB<sub>1</sub>*<sub>400</sub> inhibitory compounds and inhibit the growth of the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*.

Integrating the information described above (taxonomy, untargeted metabolomics, and biological screening) of this group of microorganisms led to the selection of the two most suitable ascomycetes for the discovery of new NPs and the repurposing of useful NPs

in the development of new antibiotics. The first microorganism studied was *Scytalidium* sp. (IQ-074), selected primarily under the hypothesis that less-studied fungal taxa may lead to the isolation of new NPs. As a result of its chemical analysis, four diastereoisomers of papiracilic acid A (**20a** - **20d**) and six new NPs were isolated: 7-desoxipapiracilic acid A (**21a** and **21b**) isolated as a mixture of two diastereoisomers in a 1:1 ratio, and five linear polyketides named scytapolioles A-D (**22** - **25**) and scytalminol A (**26**). This is the first time that this structural class of compounds has been identified in the genus *Scytalidium*. Among the NPs isolated from *Scytalidium* sp. (IQ-074), **23** and **26** inhibit the phosphatase activity of *hPTPIB*<sub>1-400</sub> with IC<sub>50</sub> values of  $27.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$  and  $44.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$ , respectively. They are as active as the positive control (ursolic acid).

The second taxon, *Diaporthe* sp., was chemically studied. (IQ-053), which was selected for its significant inhibitory activity against the bacterial growth of intrahospital strains, led to the isolation of six known NPs: dotiorelone A (**27**) and I (**28**), cytosporones B (**29**) and C (**30**), pestalotiopsone B (**31**), and diaportalasin (**32**). Among them, compound **29** (50  $\mu\text{g/mL}$ ) exhibited remarkable inhibitory activity against the growth of *S. aureus* (MIC =  $21 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ ) and *S. epidermidis* 42R (MIC =  $18 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ ). These results suggest that cytosporone B (**29**) is a hit molecule in the search for a new broad-spectrum antibiotic, as it inhibits the growth of gram-positive bacteria and shows moderate inhibitory activity against the pan-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* A564 ( $51.0 \pm 1.3 \%$ ). Additionally, diaportalasin (**32**) inhibited the growth of the mentioned bacteria, with the following inhibition percentages:  $94.4 \pm 0.7\%$  (*S. aureus*),  $99.3 \pm 0.3\%$  (*S. epidermidis* 42R), and  $30.2 \pm 3.4\%$  (*A. baumannii* A564).

## **CAPÍTULO I**

**Configuración absoluta de xantoepecina, una naftopirona dimérica de  
*Penicillium* sp. IQ-429 y su actividad inhibitoria sobre la proteína tirosina  
fosfatasa IB**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Representación en 3D de la $hPTPIB_{1-400}$ . Los dominios estructurales están coloreados de acuerdo a B). C) Dominio PTP. Modificado y editado de Jiménez-Arreola, et al. <sup>17</sup> .....	9
<b>Figura 2.</b> Mecanismo catalítico de PTPIB. Modificado y editado de Crean, et al. <sup>13</sup> .....	10
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la participación de PTPIB en las vías de señalización de la insulina y leptina. Tomado y editado de Rocha, et al. <sup>19</sup> .....	12
<b>Figura 4.</b> Inhibidores de $hPTPIB_{1-400}$ de origen fúngico.....	13
<b>Figura 5.</b> Inhibidores de PTPIB evaluados en ensayos clínicos. En rojo se muestran las moléculas que fueron descontinuadas de ensayos clínicos y en azul las que continúan en investigación.....	15
<b>Figura 6.</b> A) <i>Penicillium</i> sp. (IQ-429) cultivado en ADP y B) en cereal Cheerios®.....	20
<b>Figura 7.</b> Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CLAE en modo semipreparativo de la fracción F <sub>7</sub> .....	21
<b>Figura 8.</b> Hidrólisis del fosfato de <i>p</i> -nitrofenilo ( <i>p</i> NPP) por la enzima $hPTPIB_{1-400}$ . El <i>p</i> NPP es un sustrato genérico utilizado en ensayos <i>in vitro</i> de enzimas fosfatasas cuyo producto desfosforilado en su forma aniónica ( <i>p</i> -nitrofenolato) produce un color amarillo intenso medible en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.....	22
<b>Figura 9.</b> Estructura química de xantoepocina (I).....	30
<b>Figura 10.</b> A) Espectro de DCE experimental para xantoepocina (I, línea negra), espectros de DCE calculados para los enantiómeros 7R8S9R7'R8'S9'R (línea discontinua azul) y 7S8R9S7'S8'R9'S (línea discontinua roja). B) Gráfico de probabilidades DP4+ generadas al correlacionar los datos experimentales RMN-ID para I con los desplazamientos químicos calculados para los diastereoisómeros 7R8S9S7'R8'S9'S (azul) y 7R8S9R7'R8'S9'R (blanco). .....	31
<b>Figura 11.</b> A) Curva concentración-respuesta de xantoepocina (I) frente a $hPTPIB_{1-400}$ . B) Gráfico de velocidad de reacción frente a un rango de concentraciones de sustrato que muestra la velocidad relativa de $hPTPIB_{1-400}$ en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de I. C) Gráfico de Lineweaver-Burk de xantoepocina (I) sobre la actividad de $hPTPIB_{1-400}$ describiendo líneas que se interceptan en un solo punto a la izquierda del eje vertical, el patrón típico observado en una inhibición de tipo mixta, validado por el incremento de los valores de la $K_M$ y la disminución de $V_{max}$ D). Los datos corresponden a tres experimentos independientes. ....	33
<b>Figura 12.</b> A) Modelo estructural del complejo xantoepocina (I)- $hPTPIB_{1-400}$ (barras amarillas). B) Representación en 3D de la interacción del complejo xantoepocina (I)- $hPTPIB_{1-400}$ . Los gráficos fueron generados con PyMol.....	34
<b>Figura 13.</b> A) Perfil energético del complejo I- $hPTPIB_{1-400}$ sobre la simulación de 50 ns. B) RMSD de los complejos I- $hPTPIB_{1-400}$ (azul marino), I- $hPTPIB_{1-300}$ (negro) y I- $hPTPIB_{301-400}$	



(rojo). C) Los valores de RMSF de los átomos se muestran en función del número de residuos. Los valores de RMSF para  $hPTPIB_{1-400}$ ,  $I-hPTPIB_{1-400}$  y  $AU-hPTPIB_{1-400}$  se muestran en azul marino, verde y rojo. E y F) En estos paneles se muestran las asas PTP y WPD del complejo  $I-hPTPIB_{1-400}$  a lo largo de una trayectoria de 50 ns. La figura muestra los enlaces de hidrógeno establecidas entre Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub> a lo largo de la trayectoria. D) Mecanismo de inhibición alostérico propuesto de la  $hPTPIB_{1-400}$  por **I**. Se propone que xantoepocina (**I**) induce cambios conformacionales dinámicos y a gran escala al bloquear el asa WPD en una conformación cerrada, evitando el reconocimiento del sustrato, unión, catálisis y liberación del sustrato. E) Distancia promedio entre Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub> a 0, 20, 30, 40 y 50 ns (gris, rosa, violeta, cian y naranja, respectivamente). F) Distancia promedio entre Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub> en la conformación *apo*-cerrada de un modelo trunco de PTPIB (PDB ISUG). Todos los modelos se generaron con PyMol..... 36

**Figura 14.** A) Gráfico de Stern–Volmer para  $hPTPIB_{1-400}$  vs. concentraciones crecientes de **I** y de B) ácido ursólico (lo datos para realizar este gráfico fueron tomados del trabajo previo de Jiménez-Arreola y colaboradores).<sup>17</sup> ..... 37

**Figura 15.** A) Espectros de fluorescencia de  $hPTPIB_{1-400}$  (0.5  $\mu$ M) con concentraciones crecientes de xantoepocina (**I**) (0–10  $\mu$ M) antes de la corrección del efecto de filtro interno. B) Espectros de fluorescencia de  $hPTPIB_{1-400}$  (0.5  $\mu$ M) con concentraciones crecientes de xantoepocina (**I**) (0–10  $\mu$ M) tras la corrección del efecto de filtro interno. C) Curva de titulación de  $hPTPIB_{1-400}$  (0.5  $\mu$ M) con concentraciones crecientes de xantoepocina (**I**) (0–10  $\mu$ M) después de la corrección del efecto de filtro interno. Las muestras se excitaron a 280 nm y los espectros de emisión se registraron de 300 a 500 nm. Los cambios máximos de emisión de fluorescencia se corrigieron para tener en cuenta la dispersión de la luz y se representaron gráficamente frente a la concentración total de proteína. La línea roja procede del ajuste de los datos al modelo de unión (Ecuación 6) para obtener la  $k_a$  ( $I/k_d$ ). Los experimentos se realizaron en solución amortiguadora conteniendo HEPES 50 mM, NaCl 100 mM y DTT 1.5 mM a pH 6.8..... 38

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Actividad de los extractos fúngicos evaluados a 20 µg/mL frente a la enzima *hPTPIB*<sub>1-400</sub>..... 29

**Tabla 2.** Descriptores para estimar el perfil farmacocinético, la similitud a fármacos y las alertas PAIN para xantoepocina (**I**), usando la herramienta de libre acceso SwissADME. 40

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN <sub>r</sub>	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
APD	Agar papa dextrosa
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
AU	Ácido ursólico
C	Carbono
CCD	Cromatografía en capa delgada
CF	Cromatografía tipo FLASH
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
°C	Grado Celsius
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CPD	Caldo papa dextrosa
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cloruro de metileno
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria cincuenta
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cys	Cisteína
DAD	Detector de arreglo de diodos
DCE	Dicroísmo circular electrónico
DM	Dinámica molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DTT	Ditiotreitol
EM	Espectrometría de masas
EM-AR	Espectrometría de masas de alta resolución
EM-AR-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución ionización por electroespray
EtOH	Etanol
hPTPIB <sub>1-400</sub>	Proteína tirosina fosfatasa IB de cadena completa de humano
h	Hora
H	Hidrógeno
Hex	Hexanos
HRMS	Espectros de masas de alta resolución

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
Hz	Hertz
H <sub>2</sub> O	Agua
ITS	Región espaciadora interna transcrita
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	Kilodalton
<i>K<sub>SV</sub></i>	Constante Stern-Volmer
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
EM <sup>2</sup>	Espectrometría de masas en tándem
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
Phe	Fenilalanina
<i>p</i> NPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenilo
ppm	Partes por millón
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTK	Proteínas tirosina cinasa
Pro	Prolina
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación media cuadrática
RMSF	Raíz-media cuadrática
rpm	Revolución por minuto
s	Señal simple
Ser	Serina
TD-DFT	Teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo
Thr	Treonina

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
Tyr	Tirosina
Å	Ángstrom
$\delta$	Desplazamiento químico
$\delta_C$	Desplazamiento químico de carbono
$\delta_H$	Desplazamiento químico de hidrógeno
$\lambda_{max}$	Longitud de onda máxima
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microlitro

## **I ANTECEDENTES**

### **I.1 Generalidades sobre las proteínas tirosina fosfatasa**

La fosforilación reversible de residuos de tirosina es un mecanismo postraduccional clave que regula un amplio espectro de procesos celulares.<sup>1</sup> La adición o eliminación de un grupo fosfato de un residuo de tirosina desempeña un papel fundamental en las vías de señalización que regulan diversas respuestas celulares, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y el metabolismo celular. Para llevar a cabo este proceso de manera precisa y coordinada, intervienen dos enzimas fundamentales: las proteínas tirosina cinasas (PTK) y las proteínas tirosina fosfatasas (PTP).<sup>2,3</sup>

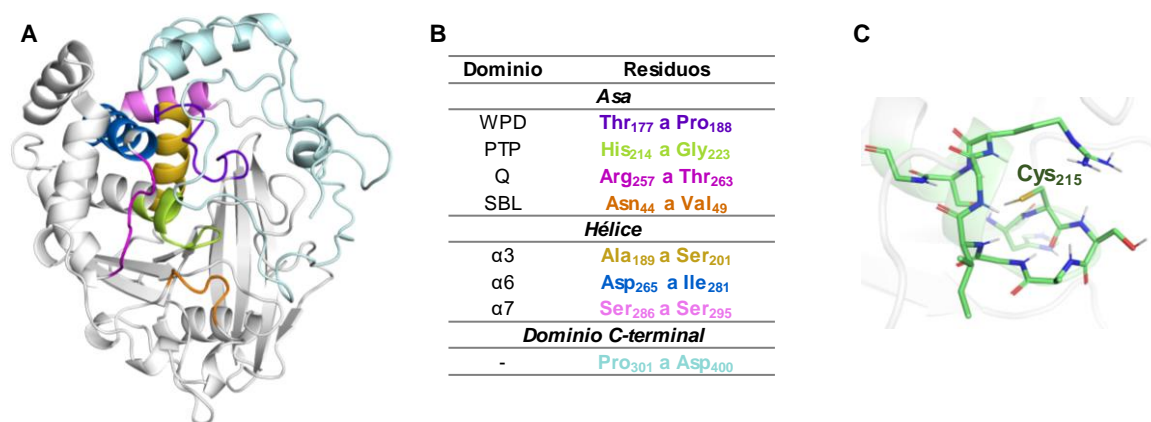
En los seres humanos, existe una superfamilia de más de cien PTPs desempeñando funciones como moduladores negativos o positivos en diversas vías de señalización.<sup>4</sup> Estas enzimas se dividen en cuatro clases (I-IV) según sus diferencias en estructura y especificidad de sustrato. Las clases I a III tienen en su dominio catalítico al aminoácido cisteína (Cys) como nucleófilo. En la clase I se encuentran las fosfatasas clásicas, las cuales desfosforilan residuos de tirosina (pTyr específicas; fosfotirosinas). El miembro prototipo de esta familia es la PTPIB. La clase II incluye las PTPs de especificidad dual, que desfosforilan residuos de serina/treonina (Ser/Thr) y de tirosina (Tyr). Por otro lado, las enzimas de clase III son conocidas como fosfatasas Cdc25. La última clase (IV), son enzimas de bajo peso molecular que tienen al aspartato (Asp) como aminoácido nucleófilo en el dominio catalítico.<sup>3,5</sup> Estas familias de enzimas comparten características estructurales conservadas en el sitio activo y en su mecanismo catalítico.<sup>6</sup>

### **I.2 Estructura de la PTPIB**

La PTPIB fue la primera fosfatasa en ser purificada e identificada. Su estructura cristalina se resolvió en 1994 para la enzima de 37 kDa (residuos 1-321).<sup>7</sup> Esta enzima está codificada en el gen proteína tirosina fosfatasa no-receptor tipo I (*PTPNI*). En humanos, este gen se localiza en el cromosoma 20q13.1, en una región que ha sido asociada con diabetes y obesidad. El gen *PTPNI* se traduce en una proteína de 435 aminoácidos.<sup>8</sup> Canónicamente, la forma soluble de la PTPIB es una proteína intracelular que se expresa de forma ubicua y se localiza en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico (RE).<sup>9</sup>

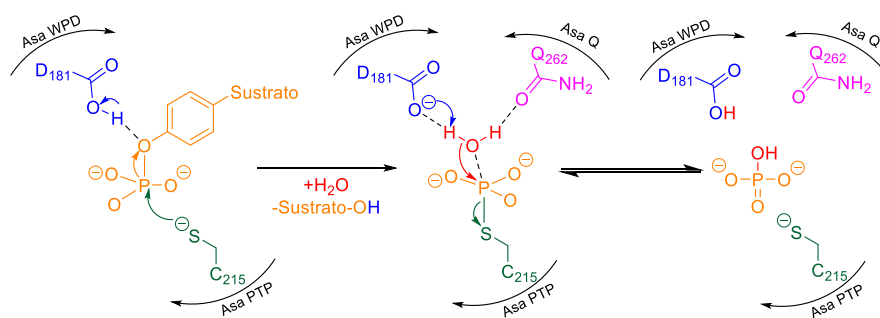
A nivel estructural, la PTPIB está formada por tres dominios: un dominio catalítico N-terminal (residuos 1-300), un dominio regulador intrínsecamente desordenado (residuos 301-400) y un dominio C-terminal (residuos 401-435) responsable de dirigir la enzima a la membrana del RE; todos los dominios tienen un papel importante en la regulación de la PTPIB.<sup>8, 10, 11</sup> La estructura de la proteína completa no ha sido resuelta aún, sin embargo, se ha logrado obtener la estructura cristalográfica de modelos truncos de la enzima (residuos 1-298 o 1-321).<sup>10</sup>

El dominio N-terminal de la PTPIB está organizado en ocho  $\alpha$ -hélices y doce hebras  $\beta$ , de las cuales, diez forman una lámina  $\beta$  que adoptan una conformación retorcida que contiene el sitio catalítico y comprende el asa PTP (residuos 214-223, incluido la Cys<sub>215</sub> catalítica); el asa WPD (residuos 177-188, que incluye el Asp<sub>181</sub>, un donador/aceptor de protones durante la catálisis) cuya dinámica (conformación abierta / cerrada) es crucial para la catálisis. Esta asa sufre un cambio conformacional al unirse el sustrato, de una conformación abierta (catalíticamente inactiva) a una conformación cerrada (catalíticamente activa), que ubica al Asp<sub>181</sub> en una posición adecuada para llevar a cabo la catálisis. El asa Q contiene un residuo de glutamina (Gln<sub>262</sub>) que es esencial durante la catálisis; y el asa de unión al sustrato SBL (residuos 44-49) define la selectividad del sitio catalítico.<sup>3, 7, 9, 12, 13</sup> Además, la PTPIB<sub>1-321</sub> posee un sitio alostérico situado a 20 Å de distancia del bolsillo catalítico, en la interfaz conjunta de las hélices  $\alpha$ -3 (residuos 189-201),  $\alpha$ -6 (residuos 265-281) y  $\alpha$ -7 (residuos 286-295) (**Figura 1**).<sup>14-16</sup>



**Figura 1.** A) Representación en 3D de la hPTPIB<sub>1-400</sub>. Los dominios estructurales están coloreados de acuerdo a B). C) Dominio PTP. Modificado y editado de Jiménez-Arreola, et al.<sup>17</sup>

Todas las PTPs comparten el mismo mecanismo catalítico que consta de dos pasos. El caso particular de la PTPIB se muestra en la **Figura 2**. La hidrólisis del grupo fosfato del motivo de tirosina (pTyr) inicia cuando el grupo tiol de la cisteína ( $Cys_{215}$ ) actúa como nucleófilo y ataca la función éster fosfato del sustrato, para formar un tiofosfato como intermediario. El estado de transición de la reacción se estabiliza por la arginina 221 ( $Arg_{221}$ ), mientras que el aspartato 181 ( $Asp_{181}$ ) catalítico del asa WPD actúa como un ácido general, donando un protón al grupo -OH saliente. En el segundo paso, el tiofosfato es hidrolizado, con la ayuda del  $Asp_{181}$  que ahora actúa como una base general para abstraer un protón de una molécula de agua, posicionada por la glutamina 262 ( $Gln_{262}$ ), facilitando la hidrólisis del enlace fósforo-azufre y produciendo fosfato libre.<sup>13, 18</sup>



**Figura 2.** Mecanismo catalítico de PTPIB. Modificado y editado de Crean, et al.<sup>13</sup>

### 1.3 PTPIB y su participación en desordenes metabólicos

La proteína tirosina fosfatasa IB regula negativamente la señalización de la insulina y leptina, por lo que es una de las dianas prometedoras para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (DMT2) y obesidad.<sup>2, 3, 15</sup>

La DMT2 es uno de los mayores problemas sanitarios de la sociedad actual.<sup>19</sup> De los cuatro tipos de diabetes mellitus (DM) clasificados por la Asociación Americana de Diabetes, la DMT2 representa el 90-95% de todos los casos de diabetes.<sup>20</sup> Esta es una enfermedad crónica y multifactorial en la que se produce un estado de hiperglucemia (niveles crónicos de glucosa en sangre) debido a la deficiencia en la producción o acción de la hormona insulina (resistencia a la insulina), desencadenando daños importantes en diversos tejidos.<sup>21</sup>

Actualmente, existen varios tipos de medicamentos aprobados para este padecimiento. El desarrollo de nuevas opciones terapéuticas ha ido en aumento en las



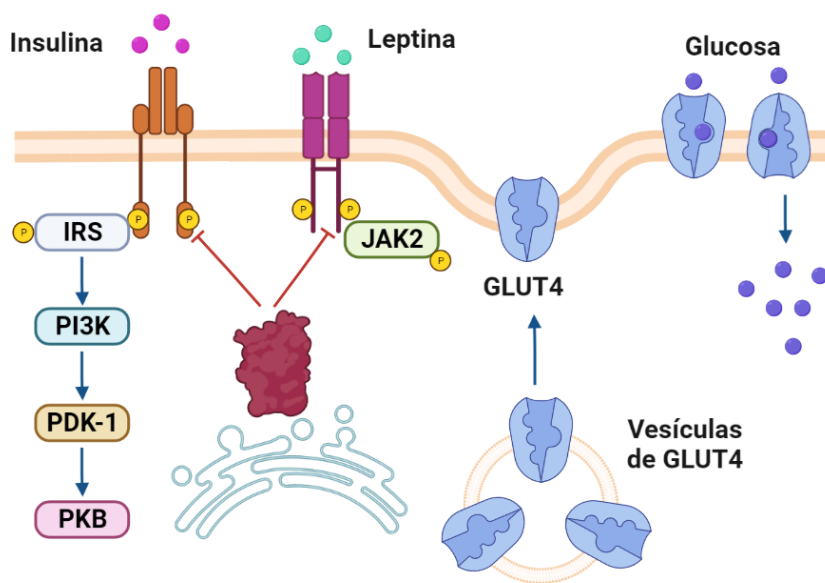
últimas décadas. Sin embargo, las terapias disponibles han demostrado limitaciones e inconvenientes.<sup>19</sup> La metformina es el fármaco más prescrito en pacientes con DMT2, no obstante, su mecanismo de acción sigue siendo poco conocido; aunque se considera segura, su uso se ha asociado con efectos secundarios gastrointestinales, y por lo general, debe utilizarse en combinación con otros fármacos para conseguir un control glucémico a largo plazo.<sup>22</sup> Otras opciones terapéuticas disponibles para tratar este padecimiento también han ocasionado efectos secundarios en los pacientes como hipoglucemia, cambios del peso corporal, riesgo de enfermedades cardiovasculares e infecciones del tracto urinario.<sup>23</sup>

A pesar del abanico de opciones terapéuticas disponibles, de acuerdo con el último informe de la Federación Internacional de la Diabetes, la DM provocó 6.7 millones de fallecimientos en 2021.<sup>21</sup> Además, se estima que actualmente uno de cada diez adultos cursa por esta enfermedad (573 millones de personas con diabetes en el mundo) y de seguir la tendencia de los últimos años, en el 2045 existirán 783 millones de pacientes con DM. De manera particular, en nuestro país existen 14.4 millones de personas que padecen diabetes, lo que coloca a México en el séptimo lugar a nivel mundial con mayor prevalencia de esta enfermedad. De acuerdo con un informe preliminar del INEGI correspondiente al año 2022, la DM fue la segunda causa de muerte, 59,996 personas fallecieron a causa de este padecimiento.<sup>24</sup>

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que sirvan para el tratamiento de la DMT2, se considera que la PTPIB es un blanco terapéutico potencial.<sup>25</sup> Se ha demostrado que la desregulación de esta proteína promueve la resistencia a la insulina y ocasiona la desfosforilación aberrante del receptor de insulina (IR) y de su sustrato (IRS-1), impidiendo que la señalización de insulina se lleve a cabo de manera adecuada (**Figura 3**). Esto inhibe la translocación de vesículas transportadoras de glucosa (GLUT4) a la membrana, desencadenando el aumento de glucosa plasmática en los tejidos donde la PTPIB es expresada.<sup>26, 27</sup> Por otra parte, se ha evidenciado que la inhibición de PTPIB mejora la sensibilidad a la insulina, normaliza los niveles de glucosa en sangre y protege de la obesidad y de la aparición de la DMT2.<sup>26, 28</sup> En general, estos estudios sugieren que la inhibición de PTPIB podría mejorar la respuesta a la insulina en el hígado, tejido adiposo y muscular,

páncreas y en el cerebro, corrigiendo así la mayoría de las anomalías metabólicas observadas en los pacientes diabéticos.<sup>26</sup>

Por otro lado, también se considera que la PTP1B es un blanco terapéutico para controlar la obesidad.<sup>27,29</sup> La obesidad común se caracteriza principalmente por la resistencia a la acción de la leptina.<sup>30</sup> Esta hormona actúa sobre los receptores del hipotálamo para regular el peso corporal y el gasto energético.<sup>29</sup> Se ha demostrado que PTP1B se une y desfosforila la cinasa Jano 2 (JAK2), lo que inhibe la cascada de señalización de leptina (**Figura 3**).<sup>30, 31</sup> De manera interesante, ratones knockout de PTP1B presentan mayor respuesta a la pérdida de peso por leptina y resistencia a la obesidad inducida por dieta.<sup>30</sup> Esto puede ser debido a un mayor gasto energético, producto de la hipersensibilidad del receptor de leptina. Además, estudios de knockout en tejidos específicos sugieren la participación de la PTP1B neuronal en la regulación del peso corporal, adiposidad y acción de la leptina.<sup>32</sup> De acuerdo con estos hallazgos, el pretratamiento de ratas resistentes a la leptina con un inhibidor de la PTP1B mostró una notable mejora en la supresión de la ingesta de alimentos y, por consiguiente, en la regulación del peso corporal.<sup>33</sup> Todos estos estudios evidencian la importancia de la PTP1B en el desarrollo de nuevos fármacos contra la DM2 y la obesidad.

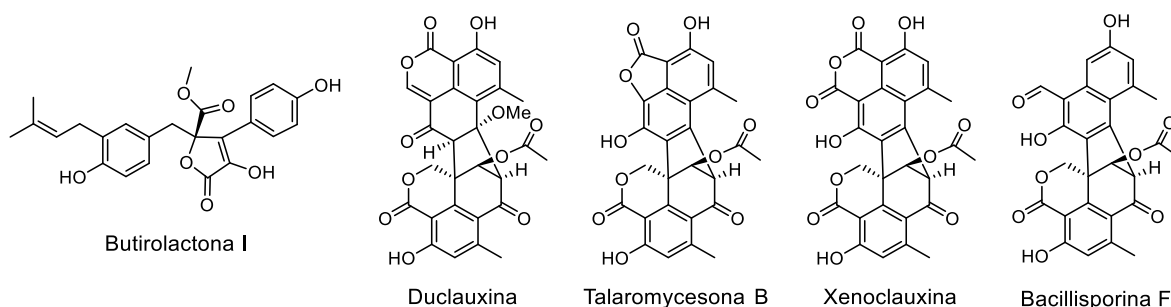


**Figura 3.** Representación esquemática de la participación de PTP1B en las vías de señalización de la insulina y leptina. Tomado y editado de Rocha, et al.<sup>19</sup>

## 1.4 Inhibidores de PTPIB

La enzima PTPIB se considera un objetivo terapéutico prometedor en el desarrollo de fármacos para tratar la DMT2, la obesidad y el cáncer.<sup>16, 34</sup> A la fecha, se han identificado más de 800 productos naturales como inhibidores de modelos truncos de la PTPIB (PTPIB<sub>1-297</sub>, PTPIB<sub>1-300</sub> y PTPIB<sub>1-321</sub>).<sup>35</sup> Estos compuestos se han obtenido de a partir de plantas, hongos, algas y animales y se clasifican en cinco clases estructurales: ácidos grasos, fenoles, terpenoides, esteroides y alcaloides.

La búsqueda de inhibidores de modelos de la proteína completa (*h*PTPIB<sub>1-400</sub>), se ha realizado a partir de la expresión de la PTPIB<sub>1-400</sub> humana de longitud completa por Tonks y colaboradores.<sup>36</sup> Desde entonces, en nuestro grupo de investigación se han descrito inhibidores de la *h*PTPIB<sub>1-400</sub>, aislados de los hongos *Aspergillus terreus* y *Talaromyces* sp. Estos inhibidores incluyen a la butirolactona I (CI<sub>50</sub> 59.9 μM), duclauxina (CI<sub>50</sub> 12.7 μM), talaromycesona B (CI<sub>50</sub> 82.7 μM), xenoclauxina (CI<sub>50</sub> 21.8 μM) y bacillisporina F (CI<sub>50</sub> 13.4 μM) (**Figura 4**).<sup>17, 37</sup>

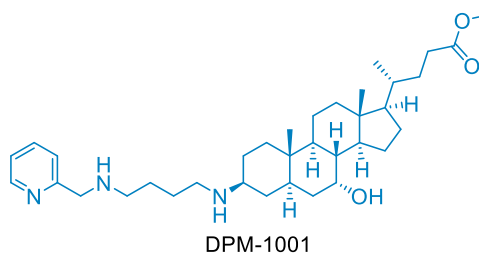
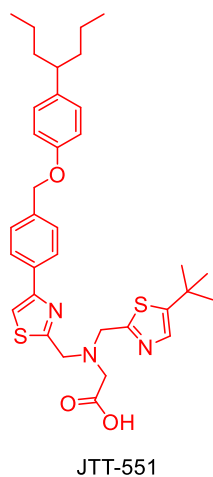
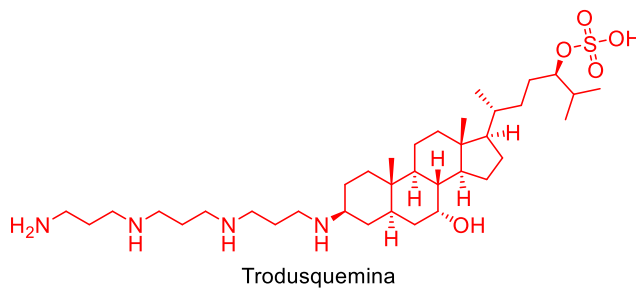
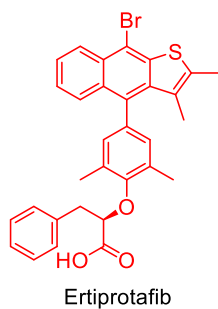


**Figura 4.** Inhibidores de *h*PTPIB<sub>1-400</sub> de origen fúngico.

Interesantemente, los modelos de *h*PTPIB truncos y *h*PTPIB<sub>1-400</sub> se comportan bioquímicamente diferente cuando son evaluados *in vitro*. Por ejemplo, el ácido ursólico (AU) es un inhibidor competitivo bien caracterizado de la *h*PTPIB trunca.<sup>38</sup> Por el contrario, esta molécula se comporta como un inhibidor no competitivo frente a la proteína de longitud completa.<sup>17, 39</sup> Estos hallazgos sugieren que el uso de modelos truncos de la proteína en programas de descubrimiento de fármacos, puede conducir a la pérdida de información valiosa sobre el mecanismo de inhibición de un ligando.

En la actualidad, no existe un inhibidor de la proteína PTP1B que haya sido aprobado por la FDA. El principal obstáculo en el desarrollo de inhibidores de esta proteína se asocia con la alta homología de secuencias con otras PTPs estrechamente relacionadas, principalmente con la PTP de células T (TCPTP); estas dos proteínas comparten un 74% de homología en la secuencia de aminoácidos en el dominio catalítico.<sup>16, 19, 40</sup> La gran mayoría de los inhibidores descritos en la literatura están dirigidos principalmente al sitio activo de la PTP1B, sin embargo, ésta contiene una secuencia de aminoácidos altamente conservada. Por lo tanto, la selectividad de estos inhibidores se ve comprometida. Es por eso, que se ha sugerido la búsqueda de inhibidores alostéricos, lo cual podría conducir al descubrimiento de inhibidores eficaces y selectivos.<sup>17, 41</sup>

Hasta la fecha, sólo un número muy limitado de inhibidores de PTP1B han sido evaluados en ensayos clínicos, incluyendo el ertiprotafib (inicialmente se reportó que era un inhibidor competitivo; sin embargo, recientemente se demostró que induce la agregación de la PTP1B de manera dependiente de la concentración),<sup>42</sup> la trodusquemina (un inhibidor alostérico natural)<sup>43</sup> y el JTT-551 (un inhibidor de tipo mixto)<sup>44</sup> (**Figura 5**). Desafortunadamente, los ensayos en estas moléculas fueron discontinuados debido a que presentaron poca eficacia, falta de especificidad y notables efectos secundarios.<sup>11</sup> No obstante, en la actualidad, dos inhibidores están en ensayos clínicos: el DMP-1001 (fase preclínica),<sup>45</sup> un derivado semisintético de la trodusquemina y el ASO IONIS PTP1BRx (fase II)<sup>46</sup> (**Figura 5**). Un ASO (oligonucleótido anti-sentido) es un ácido nucleico de cadena corta que ha sufrido algunas modificaciones químicas y están diseñados para unirse selectivamente a una secuencia particular del ARNm (en este caso PTP1B) y reducir la expresión de la proteína.<sup>47</sup>



IONIS PTP1BRx  
5'-AATGGTTTATTCCATGGCCA-3'

**Figura 5.** Inhibidores de PTP1B evaluados en ensayos clínicos. En rojo se muestran las moléculas que fueron discontinuadas de ensayos clínicos y en azul las que continúan en investigación.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Descubrir inhibidores de la enzima  $hPTPIB_{1-400}$  a partir de hongos recolectados en zonas semidesérticas de México.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Obtener microorganismos aislables de suelo semidesértico colectado en San Luis Potosí, México.
- Obtener los extractos orgánicos a partir del cultivo de las cepas fúngicas en medios sólidos basados en cereales.
- Cribar los extractos fúngicos según su capacidad de inhibir *in vitro* la actividad de la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ .
- Seleccionar el microorganismo más adecuado para la obtención de inhibidores de la  $hPTPIB_{1-400}$ .
- Caracterizar estructuralmente los productos naturales presentes en la especie fúngica seleccionada.
- Realizar estudios de cinética enzimática para conocer el tipo de inhibición de las moléculas aisladas frente a la  $hPTPIB_{1-400}$ .
- Emplear estudios de acoplamiento y dinámica molecular para predecir el sitio de unión de los productos activos y estudiar los cambios conformacionales de la  $hPTPIB_{1-400}$  a través del tiempo en complejo con los metabolitos aislados.
- Predecir *in silico* los descriptores ADME y la similitud a fármacos (*drug-like*) de las moléculas activas.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Aislamiento de los microorganismos fúngicos

Como parte de un programa de investigación centrado en la química de hongos de zonas semidesérticas de México y el descubrimiento de moduladores alostéricos de la proteína tirosina fosfatasa humana 1B de longitud completa (*hPTP1B<sub>1-400</sub>*), se realizó el aislamiento de microorganismos fúngicos en una muestra de suelo semidesértico de San Luis Potosí, México. Los hongos se obtuvieron a partir de diluciones seriadas de una suspensión del suelo colectado (1 g de muestra suspendida en 9 mL de agua destilada estéril). A partir de esta suspensión se realizaron diluciones en el orden de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ . Las suspensiones  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  se inocularon por triplicado en cajas con agar papa dextrosa (APD) suplementadas con gentamicina (1000  $\mu\text{g/mL}$ ). El micelio emergente se transfirió sucesivamente hasta obtener cultivos axénicos. De esta manera se aislaron seis microorganismos que fueron identificados internamente con una clave alfanumérica conteniendo las letras IQ y números sucesivos desde 424 hasta el 429.

#### 3.2 Obtención de extractos fúngicos

Los extractos orgánicos se prepararon a partir de los seis aislamientos fúngicos sembrados en medios sólidos de cereal Cheerios® y de arroz. Este proceso comenzó con el cultivo de las cepas en medio agar papa-dextrosa (APD) y la posterior transferencia de tres piezas de agar con micelio a medio líquido caldo papa dextrosa (CPD, 15 mL). Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm a temperatura ambiente durante 7 días. Después, cada cultivo se vertió en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 12 g de cereal Cheerios® y 10 g de arroz previamente esterilizados. El proceso de fermentación se realizó por un periodo de 28 días a temperatura ambiente con periodos normales de luz-oscuridad. Transcurrido el periodo de fermentación, se preparó el extracto orgánico de los microorganismos de acuerdo con la siguiente metodología: 1) a cada matraz con cultivo se le añadieron 60 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, la biomasa se fragmentó con la ayuda de una espátula y se dejó en agitación durante 24 h; 2) después del tiempo establecido, los cultivos se filtraron *in vacuo* y al residuo sólido se le agregaron 90 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 3) a la mezcla bifásica resultante se le añadieron 75 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y

posteriormente, se agitó por 10-15 minutos a 300 rpm; 4) la mezcla bifásica se sometió a un proceso de partición y la fracción orgánica se concentró a presión reducida; 5) el extracto orgánico resultante se reconstituyó con 100 mL de una mezcla 1:1 de MeOH-ACN y se sometió a un segundo proceso de reparto con 100 mL de hexanos. La fase de MeOH-ACN se concentró a presión reducida y la fracción hexánica se descartó.<sup>17,37</sup> Derivado de este procedimiento se obtuvieron 12 extractos orgánicos.

### 3.3 Identificación taxonómica de la cepa IQ-429

De acuerdo con el análisis cromatográfico en capa delgada (CCD) y los resultados de la actividad inhibitoria sobre la *hPTPI<sub>B1-400</sub>* de los extractos fúngicos, se seleccionó la cepa IQ-429 para su estudio químico. La identificación taxonómica del microorganismo IQ-429 se realizó mediante el análisis de la secuencia de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosómico (ADNr). Este procedimiento comenzó con la amplificación de la región ITS mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores ITS1 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').<sup>48</sup> Las concentraciones finales utilizadas para realizar las reacciones de PCR fueron las siguientes: 10 ng de ADN genómico fúngico, 0.8 pM de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq polimerasa y solución amortiguadora 1 × Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brasil). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 de µL. Las condiciones de reacción fueron 94 °C durante 10 min; 35 ciclos de 45s a 94 °C, 45s a 58 °C y 60s a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y se secuenciaron en un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) utilizando el cebador ITS1.

La secuencia de la región ITS del microorganismo IQ-429 se comparó con la biblioteca GenBank utilizando la búsqueda tipo BLAST.<sup>49</sup> Se obtuvo una colección de secuencias taxonómicamente relacionadas del National Center for Biotechnology Information Taxonomy Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

Posteriormente, las secuencias de ADN se alinearon utilizando el programa CLUSTAL X,<sup>50</sup>



se editaron y confirmaron visualmente en BIOEDIT.<sup>51</sup> Se realizaron análisis de máxima verosimilitud utilizando PhyML (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>).<sup>52</sup> Se completó la selección automática de modelos (SMS) utilizando el Criterio de Información de Akaike para seleccionar el mejor modelo de sustitución para las secuencias.<sup>53</sup> Se seleccionó el modelo GTR + I (I= 0.797 para la proporción de sitios invariantes; A = 0.20, C = 0.29, G = 0.27, T = 0.24) para la búsqueda del mejor árbol. La confianza en cada nodo se evaluó mediante 1000 réplicas bootstrap. Como grupo externo se utilizó al microorganismo *Haplographium penicillioides*. La secuencia de las regiones ITS del aislado fúngico IQ-429 se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso MW561669. Finalmente, se determinó que el hongo IQ-429 pertenece al género *Penicillium*. El análisis taxonómico se llevó a cabo por el Dr. Jesús Israel Morales Jiménez, adscrito al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

### **3.4 Procedimientos experimentales generales**

#### **3.4.1 Análisis cromatográficos**

La obtención de los productos naturales a partir de la cepa fúngica seleccionada se llevó a cabo utilizando técnicas cromatográficas. El fraccionamiento primario del extracto orgánico se realizó empleando cromatografía tipo FLASH (CF) en un sistema BUCHI C-605-C-605-C-610. El aislamiento y purificación de las moléculas se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) en un sistema Waters equipado con una bomba cuaternaria (2535), un inyector automático (2707) y a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA, 2998). La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el programa informático Empower® 3 (Waters). Los análisis se realizaron en modo analítico y semipreparativo en columnas de fase reversa Gemini-NX C<sub>18</sub> (5 µm, 4.6 × 250 mm y 5 µm, 10.0 × 250 mm para las series analítica y semipreparativa, respectivamente; Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.).

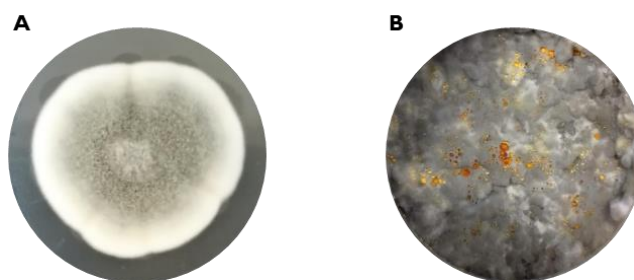
#### **3.4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas**

La determinación estructural de las moléculas aisladas se llevó a cabo mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Se realizaron

experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bidimensionales en un equipo Bruker Ascend III de 700 MHz equipado con una criosonda, que opera a 700 MHz para los experimentos de  $^1\text{H}$  y 175 MHz para  $^{13}\text{C}$ , o en un Bruker Avance III de 400 MHz utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Los desplazamientos químicos se indican en ppm y están referidos a las resonancias del disolvente residual ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  7.26/77.16 ppm para  $\text{CDCl}_3$ ). Los datos de masas de alta resolución (EM-AR) se obtuvieron en un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) acoplado a un sistema de cromatografía líquida de ultra eficiencia (CLUE) Waters Acquity (Waters Corp.). La rotación óptica se midió en un polarímetro Perkin-Elmer 323. El espectro UV se registró en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160U.

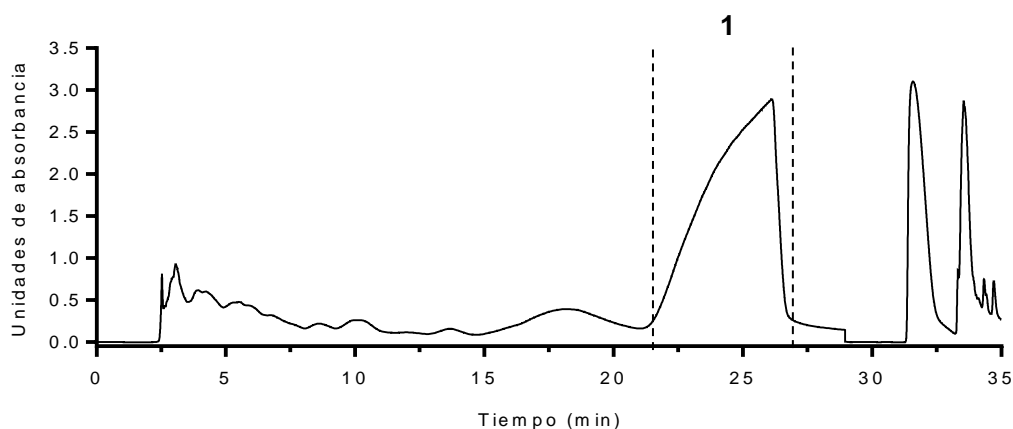
### 3.5 Estudio químico del microorganismo IQ-429

Con la finalidad de obtener suficiente material para realizar el estudio químico de IQ-429, se escaló el cultivo sólido de este hongo en cereal Cheerios® (8 ×) siguiendo el protocolo descrito en la sección “obtención de extractos fúngicos” de este capítulo (**Figura 6**). Transcurridos 28 días de fermentación, se fragmento la biomasa con la ayuda de una espátula y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1 L, posteriormente, se agregaron 500 mL de una solución 1:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, la mezcla se agitó a 100 rpm durante 24 h. A continuación, se filtró la disolución y se añadieron 750 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hasta obtener un volumen final de 2 L. La mezcla se agitó durante 30 min y se sometió a un proceso de reparto. La fracción orgánica se evaporó hasta sequedad. El sólido resultante se suspendió en 300 mL de una mezcla de disolventes 1:1 MeOH-ACN y se particionó con 300 mL de hexanos para eliminar las grasas provenientes del medio de cultivo. La fracción MeOH-ACN resultante se evaporó hasta sequedad para obtener 3.0 g de extracto seco.



**Figura 6.** A) *Penicillium* sp. (IQ-429) cultivado en ADP y B) en cereal Cheerios®.

El fraccionamiento del extracto se realizó mediante CF en fase normal, usando 25 g de gel de sílice de malla 230-400 (Macherey-Nagel) y un sistema de elución en gradiente de polaridad compuesto por Hex-EtOAc 100:0 → 0:100. Este procedimiento condujo a la obtención de nueve fracciones primarias (F<sub>1</sub>-F<sub>9</sub>). Posteriormente, la fracción F<sub>7</sub> (16 mg) se resolvió por CLAE en modo semipreparativo, utilizando un sistema de elución isocrático de MeOH-H<sub>2</sub>O 65:35 (ambos con ácido fórmico al 0,1%) y un flujo de elución de 4.6 mL/min (**Figura 7**). A partir de este procedimiento se obtuvieron 3.0 mg de xantopocina (**I**).

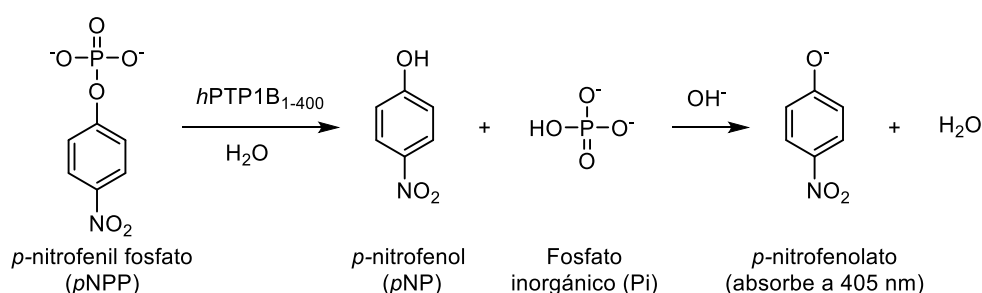


**Figura 7.** Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CLAE en modo semipreparativo de la fracción F<sub>7</sub>.

*Xantopocina (I)*.  $[\alpha]_D^{25} = -13.8$  ( $c = 0.0016$ , acetona). UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 246 (4.22), 270 (3.97), 281 (3.80), 306 (3.41), 393 (3.46). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 700 MHz)  $\delta$ : 11.92, (2H, s, 10-OH, 10'-OH), 7.52 (2H, s, H-5, H-5'), 6.38 (2H, s, H-4, H-4'), 5.47 (2H, s, H-9, H-9'), 4.43 (2H, s, 9-OH, 9'-OH), 3.80 (6H, s, 7-OCH<sub>3</sub>, 7'-OCH<sub>3</sub>), 2.33 (6H, s, 3-CH<sub>3</sub>, 3'-CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz)  $\delta$ : 188.3 (C-6, C-6'), 166.6 (C-1, C-1'), 160.7 (C-10, C-10'), 155.5 (C-3, C-3'), 137.5 (C-4a, C-4a'), 134.8 (C-5a, C-5a'), 124.7 (C-9a, C-9a'), 114.2 (C-5, C-5'), 109.0 (C-10a, C-10a'), 104.7 (C-4, C-4'), 83.0 (C-7, C-7'), 68.1 (C-8, C-8'), 62.7 (C-9, C-9'), 57.2 (7-OCH<sub>3</sub>, 7'-OCH<sub>3</sub>), 19.6 (3-CH<sub>3</sub>, 3'-CH<sub>3</sub>); EM-AR-ESI,  $m/z$  605.0942 [M - H]<sup>-</sup> (calcd. para C<sub>30</sub>H<sub>21</sub>O<sub>14</sub>, 605.0937).

### 3.6 Ensayos de inhibición enzimática

Los extractos fúngicos y el compuesto aislado fueron evaluados mediante un ensayo espectrofotométrico para establecer su actividad inhibitoria contra la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ . Esta evaluación tiene como base la hidrólisis del fosfato de *p*-nitrofenilo (*p*NPP). La cuantificación espectrofotométrica del producto colorido de la hidrólisis (*p*-nitrofenol) es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (**Figura 8**).<sup>54</sup> Para este ensayo se utilizó como control positivo el ácido ursólico, un producto natural de origen vegetal con importante actividad inhibitoria sobre la  $hPTPIB_{1-400}$ .<sup>17</sup>



**Figura 8.** Hidrólisis del fosfato de *p*-nitrofenilo (*p*NPP) por la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ . El *p*NPP es un sustrato genérico utilizado en ensayos *in vitro* de enzimas fosfatasas cuyo producto desfosforilado en su forma aniónica (*p*-nitrofenolato) produce un color amarillo intenso medible en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

Los ensayos de inhibición de la  $hPTPIB_{1-400}$  se realizaron en placas de 96 pozos. Los extractos fúngicos (200  $\mu$ g/mL), xantoeocina (**I**, 500  $\mu$ M) y el control positivo (AU, 500  $\mu$ M) se disolvieron en DMSO. 10  $\mu$ L de los materiales de prueba junto con 5  $\mu$ L de una solución de enzima (3  $\mu$ M) y una solución amortiguadora de HEPES 50 mM, pH 6,8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT, se incubaron durante 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 10  $\mu$ L del sustrato (*p*NPP 30 mM, Sigma-Aldrich). La mezcla de reacción se incubó durante 20 min a 37 °C y posteriormente, se determinó la absorbancia a 405 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en un volumen final de 100  $\mu$ L. El porcentaje de inhibición sobre la  $hPTPIB_{1-400}$  se calculó de acuerdo con la **Ecuación I**.

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

**Ecuación I**

donde %Inh representa el porcentaje de inhibición,  $A_{m_{405}}$  es la absorbancia corregida de las muestras ( $A_{405}$  final -  $A_{405}$  inicial) y  $A_{b_{405}}$  es la absorbancia del blanco ( $A_{b_{405}}$  final -  $A_{b_{405}}$  inicial).

Para determinar la  $CI_{50}$  de xantopocina (**I**), se realizó la metodología descrita anteriormente en un rango de concentraciones de 0-50  $\mu$ M. El valor de  $CI_{50}$  se calculó mediante un análisis de regresión no lineal empleando la **Ecuación 2** en el programa GraphPad Prism.

$$\%Inh = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^S}$$

**Ecuación 2**

### 3.7 Estudios de cinética enzimática

Para determinar el tipo de inhibición de xantopocina (**I**), se emplearon múltiples concentraciones de inhibidor y sustrato ( $p$ NPP). La constante de inhibición ( $k_i$ ) se calculó mediante un análisis de regresión no lineal, utilizando la **Ecuación 3** en el programa GraphPad Prism 6.0.<sup>17</sup>

$$v = \frac{V_{max}S}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{ak_i}\right)}$$

**Ecuación 3**

donde  $v$  es la velocidad de la reacción,  $V_{max}$  es la velocidad máxima;  $S$  e  $I$  son las concentraciones de sustrato e inhibidor, respectivamente;  $K_M$  es la constante de Michaelis;  $k_i$  es la constante de inhibición competitiva y  $ak_i$  es la constante de inhibición no competitiva. Se generaron gráficos de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) para determinar gráficamente el tipo de inhibición de **I** sobre la  $hPTPIB_{1-400}$ .

### 3.8 Estudios *in silico*

#### 3.8.1 Cálculos de dicroísmo circular electrónico (ECD) y de desplazamientos.

La xantoeopocina (**I**) se construyó y optimizó geoméricamente empleando el método semiempírico PM3 en el software Spartan'10 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, EUA). El análisis conformacional se llevó a cabo con el mismo software y campo de fuerza. Las estructuras de mínima energía obtenidas se revisaron manualmente y se filtraron en busca de redundancia. Posteriormente, los confórmeros se optimizaron geoméricamente y se minimizaron empleando DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP para los cálculos de dicroísmo circular electrónico (DCE) o B3LYP/6-31G(d) para los cálculos de desplazamientos químicos.<sup>39</sup>

Los cálculos de ECD se llevaron a cabo utilizando un campo de fuerza TD-SCF y MeOH como disolvente con un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), con el modelo de disolvente por defecto. La energía de excitación calculada (nm) y la fuerza rotatoria ( $R$ ) en forma de velocidad dipolar ( $R_{vel}$ ) se simularon en una curva ECD con la **Ecuación 4** implementada en SpecDis.<sup>55</sup> Donde  $E_k$  y  $R_k$  son la energía de transición y la fuerza rotatoria de la transición electrónica  $k^{th}$ , respectivamente y  $\sigma$  es la semiamplitud exponencial.

$$\Delta\varepsilon(\lambda) = \frac{1}{2.296 \times 10^{-39}} \times \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \sum_k E_{0k} R_{0k} e \left[ - \left\{ \frac{E - E_{0k}}{\sigma} \right\}^2 \right] \quad \text{Ecuación 4}$$

Las constantes de apantallamiento de RMN de xantoeopocina (**I**) se calcularon en  $\text{CHCl}_3$  con el método GIAO con un nivel teórico B3LYP/6-31G(d), utilizando el modelo de disolvente PCM.<sup>56</sup> Los datos experimentales y calculados se analizaron mediante el método de probabilidad DP4+.

Todos los cálculos se realizaron en la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli" de la UNAM, que cuenta con sistema operativo Linux de 25,312 núcleos y 15,000 GB de RAM.

### 3.8.2. Predicción de la estructura tridimensional de la hPTPIB<sub>1-400</sub>

Debido a la falta de información cristalográfica sobre la proteína PTPIB de cadena completa (hPTPIB<sub>1-400</sub>), los estudios *in silico* de acoplamiento y dinámica molecular se realizaron con el modelo obtenido por homología descrito por Jiménez-Arreola.<sup>17</sup> La estructura tridimensional de hPTPIB<sub>1-400</sub> se ensambló utilizando nueve plantillas con una identidad en la secuencia  $\geq 99\%$  y puntaje Z >1. Siguiendo el protocolo de I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>), el servidor generó cinco modelos.<sup>17, 57, 58</sup> La precisión de cada modelo se midió utilizando el puntaje C (puntaje de confianza, donde un valor más alto indica un modelo con mayor confianza), que osciló entre -2.19 y -2.88.<sup>58</sup> La estereoquímica de cada modelo se verificó utilizando el paquete PROCHECK. Los resultados de este análisis indicaron que para el modelo 1 (C = -2.19), el 99.7% de los aminoácidos se encontraban en las regiones más favorecidas o permitidas del gráfico de Ramachandran.<sup>17</sup> Estos datos son comparables con los obtenidos para estructuras cristalográficas, lo que indica que la calidad del modelo es lo suficientemente buena como para ser utilizada en análisis posteriores, como estudios *in silico* de acoplamiento y dinámica molecular.

### 3.8.3 Proteína y ligando

Al modelo homologado de hPTPIB<sub>1-400</sub> previamente validado<sup>17</sup> se le asignaron hidrógenos polares y cargas (Kollman) utilizando la interfaz gráfica AutoDockTools (ADT) 1.5.6. Los archivos obtenidos se guardaron en un formato adecuado para su uso en las interfaces AutoGrid 4.0 y AutoDock 4.0.

La xantoepocina (I) se construyó y optimizó energéticamente utilizando Spartan'10 con el método semi-empírico PM3. Posteriormente, el modelo resultante se optimizó mediante DFT al nivel teórico B3LYP/DGDZVP. El ligando se preparó en ADT 1.5.6.

### 3.8.4 Acoplamiento molecular

La predicción de la conformación de unión entre xantoepocina (I) y la hPTPIB<sub>1-400</sub> se realizó con el software AutoDock 4.0 utilizando un protocolo de acoplamiento molecular ciego previamente validado por Jiménez-Arreola, *et al.*,<sup>17</sup> el cual consistió en predecir el tipo de unión del fosfato de *p*-nitrofenilo (pNPP), compuesto que se une al dominio catalítico en

una conformación adecuada para la que se lleve a cabo la hidrólisis del grupo fosfato. Los resultados de la validación se midieron cuantitativamente mediante el número de poses obtenidas en el acoplamiento ciego en el sitio de unión predicho (28/100; dominio catalítico), indicando que el software (AutoDock 4.0) y el protocolo de acoplamiento predijo exitosamente el modo de unión del ligando.

Empleando el protocolo validado,<sup>17</sup> se realizó la predicción de la conformación más favorable de interacción xantoeopocina (**I**)-*h*PTPIB<sub>1-400</sub>. Se utilizó la interfaz de la proteína como primera posición de unión del ligando en una rejilla (grid) de búsqueda con dimensiones de 126 × 126 × 126 puntos (con 0.5 Å de separación). La simulación se realizó empleando un Algoritmo Genético Lamarckiano y 100 corridas. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de conglomerados con la interfaz ADT 1.5.6 y con PyMOL.<sup>37</sup>

### 3.8.5 Simulaciones de dinámica molecular (DM)

Las simulaciones de DM se realizaron por triplicado con la suite DM de AMBER 16 con el campo de fuerzas FF14SB.<sup>59,60</sup> Las coordenadas obtenidas de los estudios de acoplamiento molecular del modelo homólogo generado para la *h*PTPIB<sub>1-400</sub> y **I** se procesaron con Antechamber, para generar las topologías adecuadas para el módulo LEaP. Posteriormente, se utilizó LEaP para reducir, neutralizar (añadiendo aleatoriamente 11 contraiones Na<sup>+</sup>) e incluir el sistema en una caja octaédrica truncada solvatada (modelo de disolvente TIP3P) con una longitud de 10 Å. Las simulaciones se realizaron en condiciones periódicas. Para relajar la estructura y equilibrar el disolvente se llevó a cabo una minimización de gradiente conjugado, seguida de un calentamiento NVT y un equilibrado NPT mediante dinámica Langeviniana. La DM se registró durante 50 ns a 300 K y se guardaron fotogramas de la trayectoria a intervalos de 4 ps. Finalmente, se realizaron análisis de la desviación media cuadrática (RMSD) y de la fluctuación de la raíz-media cuadrática (RMSF) sobre la trayectoria utilizando CPPTRAJ.<sup>61</sup>

### 3.8.6 Cálculo de descriptores ADME

Se utilizó la herramienta web SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))<sup>62</sup> para estimar el perfil de absorción, distribución y metabolismo (ADME; no se consideró el perfil de eliminación) y la similitud a fármacos (*drug-like*) de xantoeopocina (**I**). Además, se evaluó si



el compuesto **I** es un compuesto PAIN (Pan Assay Interference Compounds). Los compuestos PAIN contienen subestructuras que generan respuestas potentes en diversos ensayos, independientemente de la diana molecular evaluada, lo que puede conducir a resultados falsos positivos.

SwissADME ofrece acceso gratuito a un conjunto de modelos predictivos para estimar el perfil global farmacocinético de moléculas pequeñas. Este servidor se basa en modelos computacionales robustos, rápidos y de fácil interpretación seleccionados por el Grupo de Modelado Molecular del Instituto Suizo de Bioinformática. Algunos de ellos se adaptaron con algoritmos de código abierto para garantizar la libertad de operación por la comunidad científica. Otros corresponden a sus propios modelos desarrollados y probados. SwissADME ofrece una interfaz amigable que facilita su uso incluso para aquellos usuarios con poca experiencia en quimioinformática o en química computacional.<sup>62</sup>

La molécula en formato SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) se utilizó como dato de entrada en el servidor SwissADME. Se calcularon los siguientes descriptores: *Log Po/w*, *Log S*, *permeabilidad a la barrera hematoencefálica*, *absorción gastrointestinal*, *inhibición de las enzimas glicoproteína P* y *citocromos P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C, CYP2D6, CYP3A4)*, *alertas de Lipinski* y *alertas PAIN*.

### 3.9 Experimentos de apagamiento de la fluorescencia

Las mediciones se realizaron en un espectrómetro Agilent Cary Eclipse con agitación constante a 20 °C. Para estos experimentos se incubó una solución 0.5 μM de *hPTPIB<sub>1-400</sub>* en una solución tampón (HEPES 50 mM, pH 6,8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT).<sup>37, 39</sup> La muestra se excitó a 280 nm y los espectros de emisión se registraron entre 300 y 500 nm. El efecto de filtro interno debido a la xantoepocina (**I**) se corrigió analizando los espectros de emisión de acuerdo con la **Ecuación 5**. “Donde  $F_{cor}$  y  $F_{obs}$  son las intensidades de fluorescencia corregida y medida, respectivamente.  $A_{ex}$  y  $A_{em}$  son las diferencias en los valores de absorbancia de la muestra tras la adición del ligando en las longitudes de onda de excitación (280 nm) y emisión (300-400 nm), respectivamente.”<sup>63</sup>

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{\frac{(A_{ex} + A_{em})}{2}}$$

### Ecuación 5

La  $k_a$  para el complejo I-hPTPIB<sub>1-400</sub> se obtuvo por regresión no lineal utilizando la **Ecuación 6**, donde  $F$  es la fluorescencia medida,  $F_0$  y  $F_c$  son la fluorescencia en ausencia del ligando y totalmente saturada.  $[P]_t$  y  $[L]_t$  son la concentración total de proteína y de ligando, y  $k_d = (1/k_a)$  es la constante de disociación.<sup>63</sup>

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t + [L]_t + k_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + k_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[P]_t}$$

### Ecuación 6

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como parte de un programa de investigación enfocado en la química de hongos de áreas semidesérticas de México y en el descubrimiento de moduladores alostéricos de la proteína tirosina fosfatasa IB de longitud completa (hPTPIB<sub>1-400</sub>),<sup>17,37</sup> se aislaron seis microorganismos fúngicos en muestras de suelo semidesértico para su estudio posterior. Todos los aislamientos se cultivaron en dos medios sólidos diferentes (arroz y cereal Cheerios®). Transcurrido el periodo de fermentación, se preparó el extracto orgánico de cada uno y se realizó un ensayo *in vitro* para conocer su actividad inhibitoria sobre la hPTPIB<sub>1-400</sub>. Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla I**.

**Tabla I.** Actividad de los extractos fúngicos evaluados a 20 µg/mL frente a la enzima hPTPIB<sub>1-400</sub>.

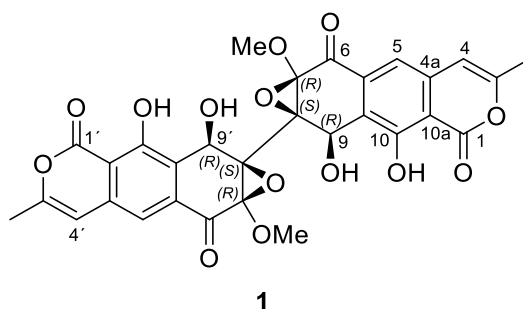
Etiqueta del microorganismo fúngico	Medio de cultivo	Porcentaje de inhibición
IQ-424	Cereal Cheerios®	71
	Arroz	98
IQ-425	Cereal Cheerios®	100
	Arroz	100
IQ-426	Cereal Cheerios®	76
	Arroz	100
IQ-427	Cereal Cheerios®	99
	Arroz	100
IQ-428	Cereal Cheerios®	100
	Arroz	20
IQ-429	Cereal Cheerios®	100
	Arroz	100

Debido a las destacadas propiedades inhibitorias (100% de inhibición a 20 µg/mL) sobre hPTPIB<sub>1-400</sub> y la simplicidad del extracto observado por cromatografía en capa delgada (CCD), se eligió al microorganismo *Penicillium* sp. IQ-429 para un estudio químico más detallado.

#### 4.1 Estudio químico de *Penicillium* sp. (IQ-429)

A través del fraccionamiento del extracto orgánico de *Penicillium* sp. (IQ-429), se logró aislar una naftopirona dimérica, conocida como xantopocina (**I**) (**Figura 9**).<sup>64</sup> La caracterización estructural de la molécula se realizó comparando sus datos espectroscópicos, espectrométricos y fisicoquímicos con los reportados en la literatura (**Figuras S4-S9**).<sup>64</sup> Es importante destacar que los espectros de RMN mono (RMN-1D) y bidimensionales (RMN-2D) empleados para realizar la caracterización estructural de **I** fueron registrados utilizando una muestra obtenida mediante un procedimiento distinto al mencionado en el apartado **3.5** de este documento. Durante el análisis inicial, se observó que el espectro de RMN <sup>1</sup>H presentaba señales que no correspondían al compuesto **I**. Por lo tanto, se mejoró el proceso de aislamiento empleando la metodología descrita en la sección **3.5**. Esta nueva muestra cuyo espectro de RMN <sup>1</sup>H se muestra en la **Figura S10**,

se utilizó para adquirir el espectro de DCE, llevar a cabo los ensayos enzimáticos y realizar el experimento de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de *hPTPIB*<sub>1-400</sub> con **I**.



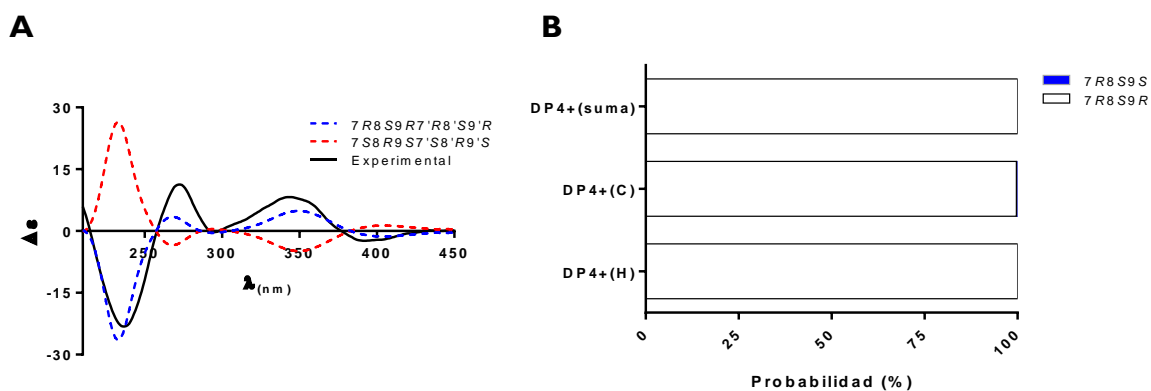
**Figura 9.** Estructura química de xantoeopocina (**I**).

La xantoeopocina (**I**) se reportó por primera vez por Igarashi y colaboradores en el año 2000.<sup>64</sup> Este metabolito fue aislado como un pigmento amarillo a partir de la fermentación líquida del micelio de *Penicillium simplicissimum* IFO5762. Establecieron su estructura química mediante el análisis de sus datos espectroscópicos (IR, UV y RMN), espectrométricos (EM-AR) y por derivatización química.<sup>64</sup> Además, reportaron el potencial de **I** como inhibidor del crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), con un valor de CMI de 0.78 y 1.56  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Recientemente, otra investigación demostró que xantoeopocina es sensible a la luz y que, bajo condiciones de oscuridad, la actividad antibacteriana de este metabolito se incrementa alcanzando un valor de CMI contra SARM cinco veces más baja que la reportada por Igarashi, *et al.*<sup>65</sup>

#### 4.2 Determinación de la configuración absoluta de xantoeopocina (**I**)

Aunque la estructura química de xantoeopocina (**I**) fue establecida en el trabajo previo de Igarashi y colaboradores, su configuración absoluta aún no había sido determinada. Para abordar esta cuestión, se registró el espectro de dicroísmo circular electrónico (DCE) experimental de **I** y se comparó con los espectros obtenidos mediante el cálculo de las transiciones electrónicas utilizando la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT).<sup>66</sup> Además, la distribución espacial correcta de xantoeopocina (**I**) se validó correlacionando los datos experimentales de RMN en una dimensión (RMN-1D) con los desplazamientos químicos calculados por el método ID-GIAO-NMR.<sup>56</sup>

La determinación de la configuración absoluta de **I** comenzó estableciendo su configuración relativa mediante la correlación observada en el espectro de NOESY entre los protones H-9/7-OCH<sub>3</sub> y H-9'/7'-OCH<sub>3</sub> (**Figura S9 y S11**), indicando que éstos se encuentran en la misma cara de la molécula. En consecuencia, sólo existen dos posibles opciones para la configuración absoluta de los centros estereogénicos: los enantiómeros 7R8S9R7'R8'S9'R y 7S8R9S7'S8'R9'S. A continuación, se calcularon computacionalmente los espectros de dicroísmo circular para ambos enantiómeros y se compararon con el espectro DCE experimental para **I**. Esta comparación evidenció que la forma de la curva, compuesta por dos efectos Cotton negativos a 234 y 389 nm y dos efectos Cotton positivos a 269 y 342 nm, se ajustaba de manera armónica al espectro calculado para el enantiómero 7R8S9R7'R8'S9'R (**Figura 10A**). Esto permitió establecer la configuración absoluta de **I**. Conjuntamente, los desplazamientos químicos calculados por el método ID-GIAO-NMR para los diastereoisómeros 7R8S9S7'R8'S9'S y 7R8S9R7'R8'S9'R, utilizando el análisis estadístico DP4+, mostraron que la probabilidad para <sup>13</sup>C (99,7%) y <sup>1</sup>H (100%) respaldan la configuración absoluta de **I** como 7R8S9R7'R8'S9'R (**Figura 10B**).



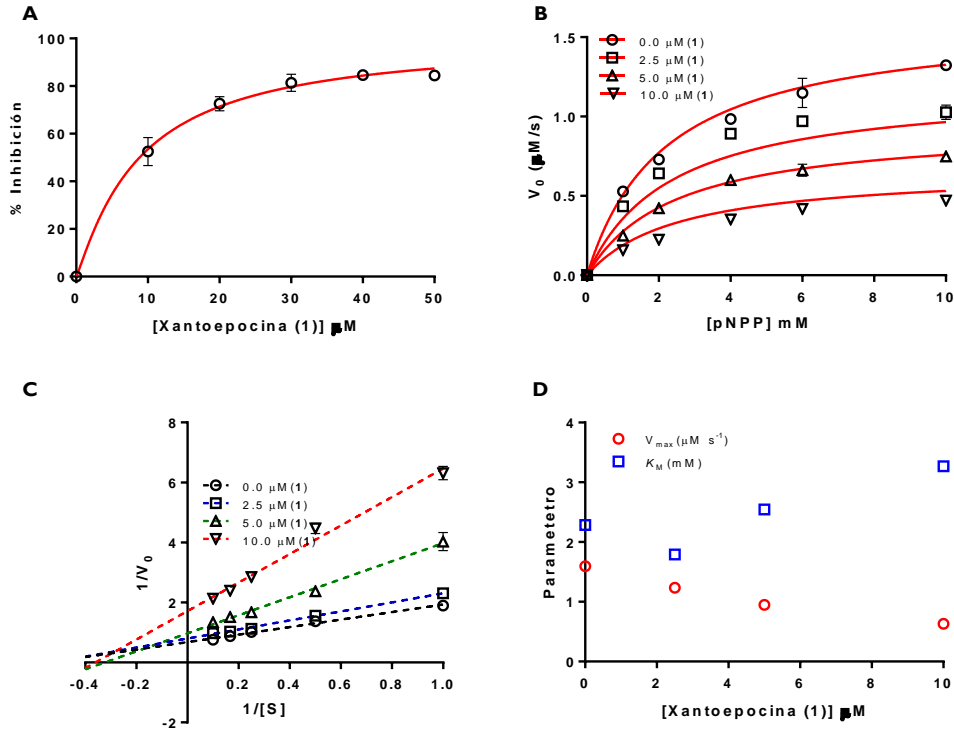
**Figura 10.** A) Espectro de DCE experimental para xantopocina (**I**, línea negra), espectros de DCE calculados para los enantiómeros 7R8S9R7'R8'S9'R (línea discontinua azul) y 7S8R9S7'S8'R9'S (línea discontinua roja). B) Gráfico de probabilidades DP4+ generadas al correlacionar los datos experimentales RMN-ID para **I** con los desplazamientos químicos calculados para los diastereoisómeros 7R8S9S7'R8'S9'S (azul) y 7R8S9R7'R8'S9'R (blanco).

#### 4.3 Determinación de las propiedades inhibitorias de xantopocina (**I**) sobre hPTPIB<sub>1-400</sub>

Las propiedades inhibitorias *in vitro* de la xantopocina (**I**) contra hPTPIB<sub>1-400</sub> se determinaron empleando un método espectrofotométrico. Los resultados de esta

evaluación mostraron que **I** inhibe a la  $hPTPIB_{1-400}$  de manera dependiente de la concentración (**Figura I IA**) con un valor de  $CI_{50}$  de  $8.8 \pm 1.0 \mu M$ . El compuesto **I** fue más activo que el control positivo, ácido ursólico ( $CI_{50} = 26.6 \pm 1.8 \mu M$ ; valor determinado en ensayos previos realizado en el grupo de trabajo)<sup>17</sup>, algunas fenalenonas diméricas y derivados de butirolactona I aislados de hongos del subfilo pezizomycotina.<sup>9,14</sup> Previamente, se han descrito naftopironas y antraquinonas simples y diméricas de hongos como inhibidores de la PTPIB; algunos ejemplos incluyen la rubrofusarina B, TMC-256A1, aurasperona F,<sup>67</sup> y cuatro antraquinonas previamente aisladas de *Malbranchea circinata*.<sup>67, 68</sup> Sin embargo, hasta la fecha sólo se han descrito 15 inhibidores de  $hPTPIB_{1-400}$  de plantas y microorganismos. Es la primera vez que se describe una naftopirona dimérica como inhibidor de la PTPIB humana de cadena completa.

Para determinar el tipo de inhibición de **I**, se realizaron estudios cinéticos utilizando un rango de concentraciones de sustrato y de compuesto **I** (**Figura I IB**). Los resultados se analizaron mediante un gráfico de doble recíproco de Lineweaver-Burk (**Figura I IC**). El gráfico resultante muestra un grupo de líneas que se intersecan en el segundo cuadrante, representativo de un inhibidor de tipo mixto, con valores crecientes de  $K_M$  y decrecientes de  $V_{max}$  (**Figura I ID**). Los valores de  $k_i$  y  $\alpha$  calculados fueron  $5.5 \mu M$  y  $1.2$  ( $\alpha k_i = 6.6 \mu M$ ), respectivamente. Es destacable que el valor cercano a uno de  $\alpha$  indica que la xantopocina (**I**) presenta una afinidad similar tanto por la  $hPTPIB_{1-400}$  libre como por el complejo  $hPTPIB_{1-400}$ -pNPP, lo que sugiere que puede inhibir su actividad a través de un mecanismo alostérico putativo.

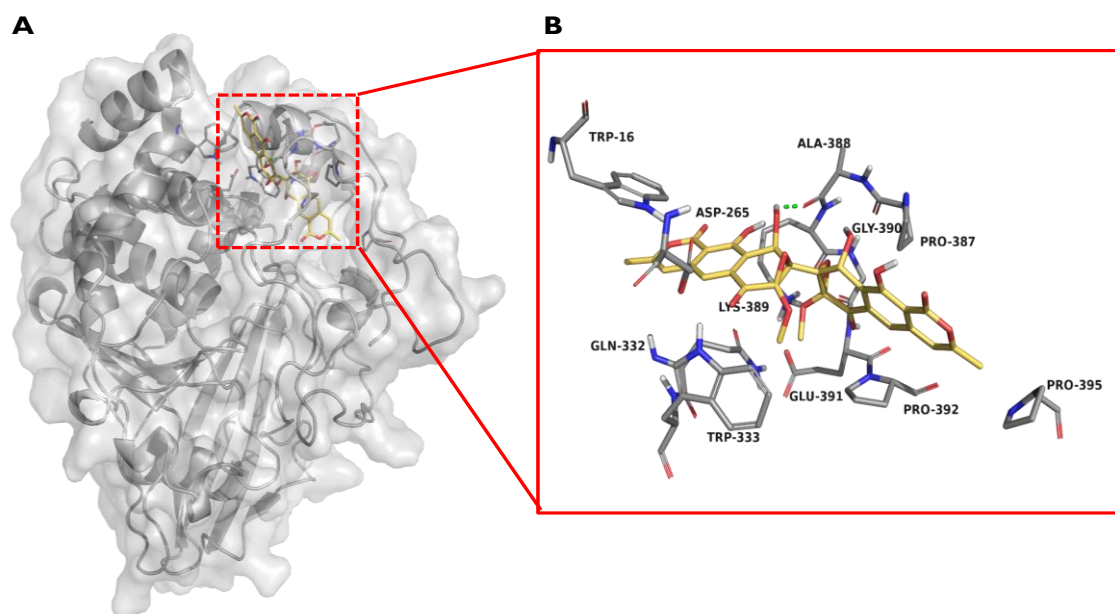


**Figura 11.** A) Curva concentración-respuesta de xantopocina (I) frente a hPTPIB<sub>1-400</sub>. B) Gráfico de velocidad de reacción frente a un rango de concentraciones de sustrato que muestra la velocidad relativa de hPTPIB<sub>1-400</sub> en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de I. C) Gráfico de Lineweaver-Burk de xantopocina (I) sobre la actividad de hPTPIB<sub>1-400</sub> describiendo líneas que se interceptan en un solo punto a la izquierda del eje vertical, el patrón típico observado en una inhibición de tipo mixta, validado por el incremento de los valores de la K<sub>M</sub> y la disminución de V<sub>max</sub> D). Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

#### 4.4 Estudios de acoplamiento molecular

La predicción del sitio de unión para la xantopocina (I) en la hPTPIB<sub>1-400</sub>, se llevó a cabo mediante estudios de acoplamiento molecular utilizando el programa AutoDock. Se utilizó un modelo obtenido por homología de la hPTPIB<sub>1-400</sub> previamente validado por nuestro grupo de trabajo.<sup>17</sup> Los resultados de esta predicción indicaron que I se une a hPTPIB<sub>1-400</sub> en un sitio hidrofóbico, mostrando interacciones con los residuos del dominio C-terminal (Asp<sub>265</sub>, Gln<sub>332</sub>, Trp<sub>333</sub>, Ser<sub>386</sub>, Pro<sub>387</sub>, Ala<sub>388</sub>, Lys<sub>389</sub>, Gly<sub>390</sub>, Glu<sub>391</sub>, Pro<sub>392</sub> y Pro<sub>395</sub>) y un aminoácido del dominio N-terminal (Trp<sub>16</sub>) (**Figura 12**). Los contactos predichos de esta molécula con residuos del extremo C-terminal de hPTPIB<sub>1-400</sub> sugieren que la xantopocina (I) puede inducir cambios conformacionales en la proteína, bloqueando la enzima en una conformación incapaz de realizar la catálisis. Las interacciones principales

entre **I** y la  $hPTPIB_{1-400}$  se estiman que son de naturaleza hidrófoba (fuerzas de Van der Waals y CH- $\pi$ ), así como de enlaces de hidrógeno.



**Figura 12.** A) Modelo estructural del complejo xantopocina (**I**)- $hPTPIB_{1-400}$  (barras amarillas). B) Representación en 3D de la interacción del complejo xantopocina (**I**)- $hPTPIB_{1-400}$ . Los gráficos fueron generados con PyMol.

#### 4.5 Simulaciones de dinámica molecular (DM)

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) con el fin de obtener más información sobre la interacción del dominio C-terminal (residuos 301-400) en el complejo xantopocina (**I**)- $hPTPIB_{1-400}$ . Estas simulaciones de DM se basaron en el modelo de predicción obtenido a través de los estudios de acoplamiento molecular. De manera interesante, después de equilibrar el sistema para la simulación, se observó una ligera modificación en el sitio de unión predicho para **I**, incorporando los residuos Pro<sub>180</sub>, Phe<sub>182</sub> (asa WPD) y Thr<sub>263</sub> (asa P).

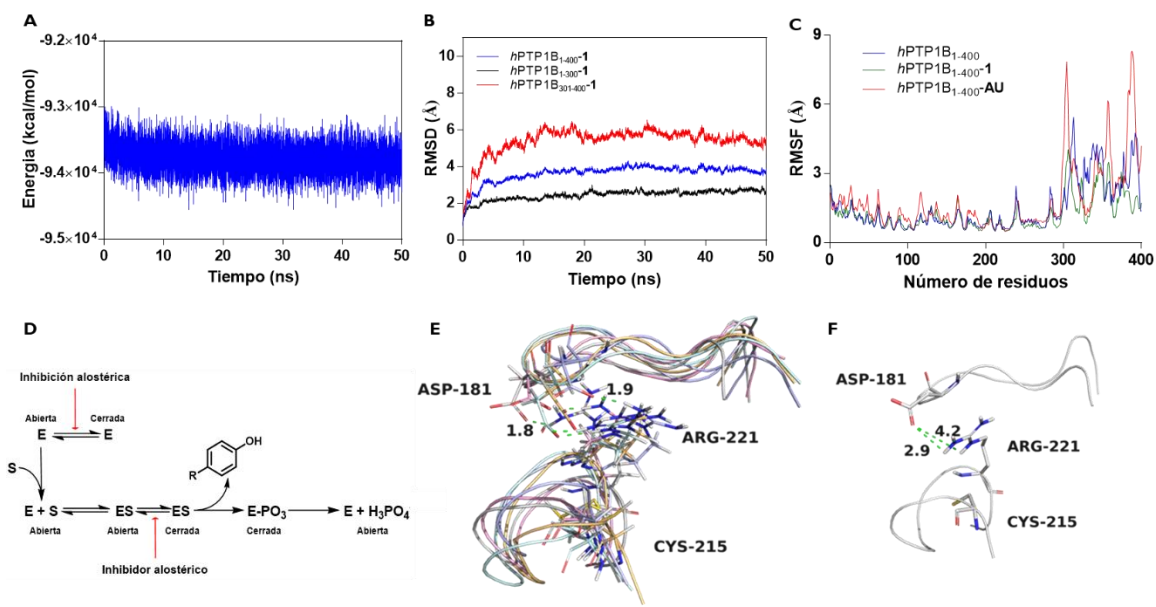
Los resultados preliminares de la simulación del complejo xantopocina (**I**)- $hPTPIB_{1-400}$  mostraron que el sistema fue estable sobre los 50 ns de la simulación (**Figura 13A**), alcanzando el equilibrio después de los 5 ns. La desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) calculada para los residuos 1-300 del complejo **I**- $hPTPIB_{1-400}$  fue en promedio de 2.4 Å. Sin embargo, para los residuos 301-400, la RMSD fue en promedio de



5.4 Å (**Figura 13B**), significativamente más bajo que la RMSD (6.8 Å) reportada para la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> en su forma libre.<sup>17</sup> Estos resultados, en combinación con el análisis de la fluctuación cuadrática media (RMSF, **Figura 13C**) de los residuos involucrados en el dominio C-terminal, sugieren que la xantopocina (**I**) disminuye la dinámica promedio del sistema, en contraste con el ácido ursólico que la incrementa significativamente.<sup>17</sup>

El análisis detallado de los aminoácidos involucrados en el sitio de unión de **I** con la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> sobre la trayectoria, particularmente de los residuos Prp<sub>180</sub> y Phe<sub>180</sub>, predice que la xantopocina (**I**) afecta significativamente la dinámica y función del asa WPD, bloqueándola en una conformación cerrada (**Figura 13D**). El mecanismo molecular involucrado en esta interacción incluye la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares y puentes salinos con una distancia de aproximadamente 1.8 Å entre las cadenas laterales del Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub>, residuos clave en la tríada catalítica de la enzima. Estos residuos generalmente están a distancias de 2.9 y 4.2 Å en la conformación *apo*-cerrada de la enzima (forma activa) según la estructura cristalizada (PDB 1SUG, **Figura 13F**). Con base en estos hallazgos, se sugiere que la modulación alostérica de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> por la unión con la xantopocina (**I**) está asociada con cambios en la dinámica y movimientos conformacionales a gran escala del asa WPD y del dominio C-terminal intrínsecamente desordenado. Estos cambios en la dinámica pueden llevar a la alteración de la conformación y actividad de la enzima, lo que resulta en la inhibición de su función catalítica.

Basándose en los resultados de la dinámica molecular (DM), se propone que la modulación alostérica de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> por la xantopocina (**I**) se debe a su interacción con los aminoácidos Pro<sub>180</sub> y Phe<sub>182</sub>. Esta interacción deshabilita la interacción CH-π, que normalmente involucra a la Pro<sub>185</sub>.<sup>12</sup> Al desfavorecer esta interacción, se facilita la formación de enlaces de hidrógeno y puentes salinos entre los residuos Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub>, bloqueando así el asa WPD en una conformación cerrada. Esto es similar a lo que ocurre cuando la enzima se une a un inhibidor competitivo como TCS401.<sup>69</sup> Como consecuencia, se inhabilita el reconocimiento, la unión y la liberación de sustrato, así como la catálisis.



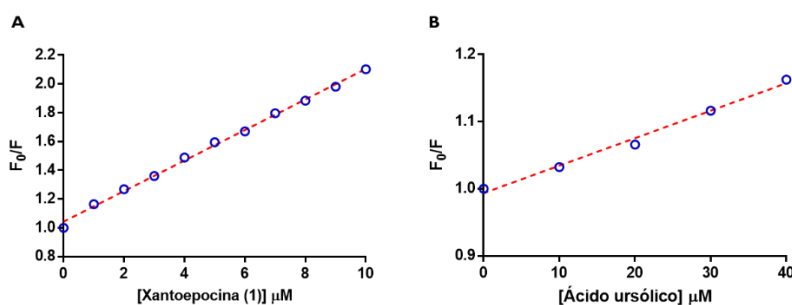
**Figura 13.** A) Perfil energético del complejo I-*hPTPIB*<sub>1-400</sub> sobre la simulación de 50 ns. B) RMSD de los complejos I-*hPTPIB*<sub>1-400</sub> (azul marino), I-*hPTPIB*<sub>1-300</sub> (negro) e I-*hPTPIB*<sub>301-400</sub> (rojo). C) Los valores de RMSF de los átomos se muestran en función del número de residuos. Los valores de RMSF para *hPTPIB*<sub>1-400</sub>, I-*hPTPIB*<sub>1-400</sub> y AU-*hPTPIB*<sub>1-400</sub> se muestran en azul marino, verde y rojo. E y F) En estos paneles se muestran las asas PTP y WPD del complejo I-*hPTPIB*<sub>1-400</sub> a lo largo de una trayectoria de 50 ns. La figura muestra los enlaces de hidrógeno establecidas entre Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub> a lo largo de la trayectoria. D) Mecanismo de inhibición alostérico propuesto de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> por I. Se propone que xantopocina (I) induce cambios conformacionales dinámicos y a gran escala al bloquear el asa WPD en una conformación cerrada, evitando el reconocimiento del sustrato, unión, catálisis y liberación del sustrato. E) Distancia promedio entre Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub> a 0, 20, 30, 40 y 50 ns (gris, rosa, violeta, cian y naranja, respectivamente). F) Distancia promedio entre Asp<sub>181</sub> y Arg<sub>221</sub> en la conformación apo-cerrada de un modelo trunco de PTPIB (PDB ISUG). Todos los modelos se generaron con PyMol.

#### 4.6 Experimentos de apagamiento de la fluorescencia de *hPTPIB*<sub>1-400</sub> con xantopocina (I)

Se realizaron experimentos de apagamiento de fluorescencia para confirmar la interacción de la xantopocina (I) con la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> y de esta manera, respaldar los resultados de los estudios de acoplamiento y dinámica molecular. La titulación de *hPTPIB*<sub>1-400</sub> con concentraciones crecientes de I apagó la fluorescencia intrínseca de la proteína mediante un mecanismo estático,<sup>70, 71</sup> lo que significa que el fluoróforo (triptófanos en *hPTPIB*<sub>1-400</sub>) e I forman un complejo no fluorescente en el estado fundamental que aumenta su población a concentraciones crecientes de xantopocina (I).<sup>71</sup> Lo anterior se determinó mediante el cálculo del valor de la constante Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), la cual permite determinar el mecanismo de “quenching” (estático o dinámico) e indica la sensibilidad de un fluoróforo

por su desactivador. En este sentido, si el fluoróforo es parcial o totalmente inaccesible al desactivador, el valor de  $K_{SV}$  será bajo. Por el contrario, se incrementa cuanto más accesible sea el fluoróforo de la molécula en cuestión.

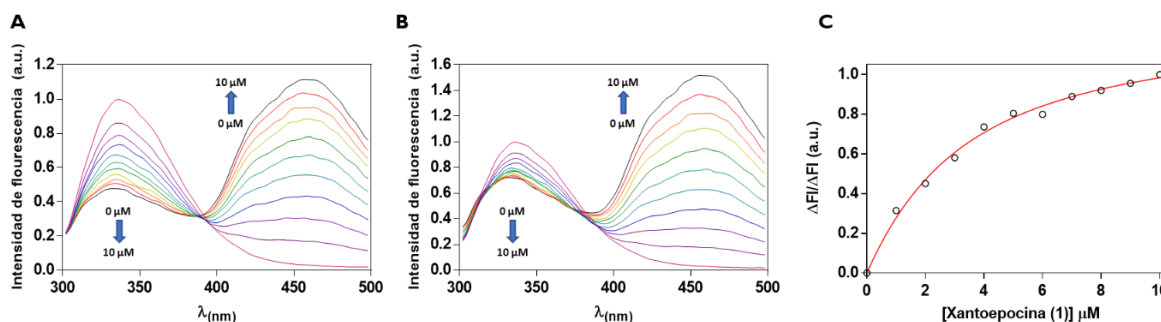
El valor de  $K_{SV}$  calculado para **I** fue de  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , dos órdenes de magnitud más grande que el del ácido ursólico ( $K_{SV} = 4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ; calculado con datos obtenidos previamente en el grupo de trabajo).<sup>17</sup> Este resultado indica que la xantoepocina (**I**) tiene una mayor afinidad por la  $hPTPIB_{1-400}$  en comparación con el ácido ursólico. Además, se determinó que el ácido ursólico es un desactivador estático, lo cual se evidencia por la tendencia lineal en el gráfico de Stern-Volmer (**Figura 14**). Estos hallazgos son relevantes, ya que indican que la xantoepocina (**I**) tiene una mayor capacidad para inducir cambios conformacionales a mayor escala que el ácido ursólico en la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ . Esos cambios conformacionales afectan la dinámica de las asas PTP y WPD en la enzima, lo que a su vez resulta en la inhibición de su actividad catalítica.



**Figura 14.** A) Gráfico de Stern–Volmer para  $hPTPIB_{1-400}$  vs. concentraciones crecientes de **I** y de B) ácido ursólico (lo datos para realizar este gráfico fueron tomados del trabajo previo de Jiménez-Arreola y colaboradores).<sup>17</sup>

La xantoepocina (**I**) mostró un efecto de filtro interno sustancial al absorber energía en las longitudes de onda de excitación y emisión (280, 300-400 nm), disminuyendo tanto la energía que llega a los fluoróforos intrínsecos dentro de la proteína como la intensidad de fluorescencia del complejo **I**- $hPTPIB_{1-400}$ .<sup>63, 72</sup> Los espectros de emisión no corregidos y corregidos (**Figura 15A y B**, respectivamente) del complejo muestran que el apagamiento de la fluorescencia es sustancialmente menor después de la corrección del efecto de filtro interno, reduciéndola de 53.2% a 28.8%. La constante de afinidad ( $k_a$ ) calculada para el complejo tras la corrección del filtro interno fue de  $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (**Figura 15C**). Hasta

ahora, la xantopocina (**I**) es el metabolito fúngico que se une con mayor afinidad a la PTPIB de longitud completa y su magnitud es comparable a la reportada para la trodusquemina, un aminosterol que se une a la proteína con estequiometría 2:1 (ligando-proteína) y constantes de afinidad de  $3.3 \times 10^6$  y  $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .<sup>36</sup>



**Figura 15.** A) Espectros de fluorescencia de  $hPTPIB_{1-400}$  ( $0.5 \mu\text{M}$ ) con concentraciones crecientes de xantopocina (**I**) ( $0-10 \mu\text{M}$ ) antes de la corrección del efecto de filtro interno. B) Espectros de fluorescencia de  $hPTPIB_{1-400}$  ( $0.5 \mu\text{M}$ ) con concentraciones crecientes de xantopocina (**I**) ( $0-10 \mu\text{M}$ ) tras la corrección del efecto de filtro interno. C) Curva de titulación de  $hPTPIB_{1-400}$  ( $0.5 \mu\text{M}$ ) con concentraciones crecientes de xantopocina (**I**) ( $0-10 \mu\text{M}$ ) después de la corrección del efecto de filtro interno. Las muestras se excitaron a  $280 \text{ nm}$  y los espectros de emisión se registraron de  $300$  a  $500 \text{ nm}$ . Los cambios máximos de emisión de fluorescencia se corrigieron para tener en cuenta la dispersión de la luz y se representaron gráficamente frente a la concentración total de proteína. La línea roja procede del ajuste de los datos al modelo de unión (**Ecuación 6**) para obtener la  $k_d$  ( $1/k_d$ ). Los experimentos se realizaron en solución amortiguadora conteniendo HEPES  $50 \text{ mM}$ , NaCl  $100 \text{ mM}$  y DTT  $1.5 \text{ mM}$  a pH  $6.8$ .

#### 4.7 Predicciones *in silico* de las propiedades ADME de xantopocina (**I**)

La evaluación experimental de la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción [ADME]) y la similitud a fármacos (*drug-like*) de los nuevos candidatos a fármacos es un requisito indispensable en las etapas iniciales del proceso de desarrollo. Sin embargo, llevar a cabo esta evaluación resulta costoso y consume mucho tiempo. Afortunadamente, se han desarrollado herramientas web como enfoques alternativos.<sup>73</sup> No obstante, es importante mencionar que éstos no pretenden reemplazar la validación experimental, sino más bien, centrar los esfuerzos experimentales en un número reducido de compuestos.<sup>74</sup>

La xantopocina (**I**) inhibió la actividad fosfatasa de la  $hPTPIB_{1-400}$  con una  $CI_{50}$  de  $8.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$ , siendo más activo que el control positivo (ácido ursólico;  $CI_{50}$  de  $26.6 \pm 1.8$

$\mu\text{M}$ ) utilizado en los ensayos *in vitro*.<sup>17</sup> Además, se comporta como un inhibidor de tipo mixto, característica deseable en la búsqueda de inhibidores de esta proteína. Por sí sola esta evidencia experimental no es suficiente para considerar a **I** como una molécula con potencial terapéutico. Sin embargo, se estimó el perfil farmacocinético de **I**, así como su similitud a fármacos (*drug-like*) y la probabilidad de que **I** sea un compuesto PAIN, todo esto con el objetivo de predecir la factibilidad de continuar el estudio de xantoepocina (**I**) como una posible opción terapéutica. Para realizar esta tarea, se utilizó la herramienta web SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)), un servidor validado de libre acceso que permite predecir las propiedades ADME, similitud a fármacos (*drug-like*), así como la accesibilidad sintética de moléculas pequeñas.<sup>62</sup> Se estima que la precisión de las predicciones realizadas por SwissADME oscilan entre el 72% y el 94%.<sup>62</sup>

Para estimar las propiedades de absorción de xantoepocina (**I**) se calcularon los descriptores para predecir la lipofiliadad ( $\log P_{o/w}$ : coeficiente de partición de un compuesto entre agua y 1-octanol) y la solubilidad en agua ( $\log S$ ) de **I**. Para calcular el descriptor  $\log P_{o/w}$ , SwissADME dispone de cinco modelos predictivos. En este trabajo se utilizó el descriptor Conceso de  $\log P_{o/w}$  (Consensus  $\log P_{o/w}$ ), que es el promedio aritmético de los valores predichos por los cinco métodos propuestos por este servidor.<sup>62</sup> El descriptor  $\log S$  seleccionado fue  $\log S$  (SILICOS-IT). Este descriptor fue desarrollado por SILICOS-IT; estima el logaritmo decimal de la solubilidad molar en agua.<sup>62</sup>

Las propiedades de distribución de xantoepocina (**I**) se estimaron con los descriptores de permeabilidad de **I** en la barrera hematoencefálica (*BBB*, por sus siglas en inglés) y de absorción gastrointestinal (*Absorción GI*). También, se estimó si **I** puede ser sustrato de la glicoproteína P (sustrato P-gp). Para calcular el primer descriptor (*BBB*), SwissADME realiza la lectura del modelo de clasificación gráfica de “huevo hervido” (BOILED-Egg), que funciona mediante el cálculo de la lipofilia y la polaridad de moléculas pequeñas.<sup>75</sup> Este modelo fue construido con 260 moléculas permeables y no permeables a la barrera hematoencefálica.<sup>75</sup> Por otro lado, para estimar si las moléculas pueden ser sustratos de la glicoproteína P (*sustrato P-gp*) y de las isoenzimas CYP más importantes (predictores para estimar la distribución), SwissADME aplica el algoritmo de máquina de soportes vectoriales (SVM) en conjuntos de datos curados meticulosamente de moléculas

que son sustratos/no sustratos o inhibidores/no inhibidores conocidos de estas proteínas. Los modelos predicen como resultado "Sí" o "No", si la molécula tiene una mayor probabilidad de ser sustrato o no de las proteínas mencionadas.<sup>62</sup>

El metabolismo de xantoepocina (**I**) se estimó mediante la predicción de la inhibición de los principales citocromos CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, que son claves en la eliminación de fármacos en el organismo.

La similitud de xantoepocina a fármacos (*drug-like*) se estimó mediante la regla empírica de Lipinski, que determina la probabilidad de que una molécula logre convertirse en un fármaco oral.<sup>76</sup>

**Tabla 2.** Descriptores para estimar el perfil farmacocinético, la similitud a fármacos y las alertas PAIN para xantoepocina (**I**), usando la herramienta de libre acceso SwissADME.

Descriptores	Xantoepocina ( <b>I</b> )
Conceso de Log $P_{o/w}$	1.39
Log S	-6.72
Absorción GI	Baja
BBB	No
Sustrato P-gp	No
Inhibidor CYP1A2	No
Inhibidor CYP2C19	No
Inhibidor CYP2C9	Sí
Inhibidor CYP2D6	No
Inhibidor CYP3A4	No
Similitud a fármacos ( <i>drug-like</i> ) (No. de violaciones a las reglas de Lipinski)	PM >500 Polaridad
Alertas PAINS	Ninguna

En relación a los descriptores de adsorción (**Tabla 2**), el Conceso de Log  $P_{o/w}$ , para xantoepocina (**I**; 1.39) estima que el valor es menor que el valor medio predicho para fármacos aprobados por la FDA (1.949), de acuerdo con una análisis de una base de datos de 1692 de moléculas pequeñas aprobados.<sup>74, 77</sup> El valor estimado de Log S para **I** es de -6.72, menor que el valor medio pronosticado para los fármacos aprobados por la FDA (-4.105).<sup>74</sup> También se predijo que **I**, podría presentar una baja absorción gastrointestinal.

La estimación de las propiedades de distribución de xantopocina (**I**), predicen que xantopocina no atraviesa la barrera hematoencefálica y que tampoco es sustrato de la glicoproteína P (**Tabla 2**), una proteína que desempeña un papel crucial en la distribución de fármacos dentro del cuerpo debido a su capacidad para eliminar/extraer una amplia gama de moléculas estructuralmente diversas de varios compartimentos.<sup>78</sup>

En relación con la predicción de las propiedades de metabolismo, se predijo que xantopocina (**I**) inhibe a 2C9, una de las cinco isoformas de las enzimas citocromo P450, estimadas con SwissADME (**Tabla 2**). 2C9 se expresa abundantemente y es especialmente importante para el aclaramiento metabólico de fármacos.<sup>79</sup> Se ha estimado que el 31% de metabolitos de la base de datos BIOFACQUIM que alberga 531 productos naturales aislados en México, también inhiben a la enzima 2C9.<sup>74</sup>

Con respecto a las predicciones de la similitud a fármacos (*drug-like*) de xantopocina (**I**), se estima que esta molécula viola dos de las cinco reglas de *Lipinski* (**Tabla 2**), su tamaño y polaridad no son similares a los de fármacos orales.<sup>76</sup>

Finalmente, se estima que **I** no es un compuesto tipo PAIN (Pan Assay Interference Compounds), los cuales tienen subestructuras que muestran una respuesta potente en ensayos, independientemente de la diana molecular evaluada. Sin embargo, se considera que este descriptor no es suficiente para identificar a todos los frequent hitter, compuestos que han sido identificados como “hits” en múltiples ensayos de cribado de alto rendimiento que no se relacionan entre sí. Estos compuestos se dividen en dos categorías: i) compuestos que pueden unirse inespecíficamente a una gran variedad de diana moleculares y ii) compuestos que interfieren en las técnicas de ensayo, arrojando resultados “falsos positivos”.<sup>80</sup> Una limitación significativa es que se asume que los mecanismos responsables de la mayoría de las subestructuras consideradas en el descriptor PAINS exhiben una reactividad covalente no selectiva, que es solo uno de los mecanismos de acción de los frequent hitters.<sup>80, 81</sup>

## 5 CONCLUSIONES

El estudio químico del extracto bioactivo de *Penicillium* sp. IQ-429 condujo al aislamiento de xantopocina (**I**). La configuración absoluta de **I** se estableció como 7R8S9R7'R8'S9'R.

Xantopocina (**I**) inhibe *in vitro* la actividad fosfatasa de *hPTPIB*<sub>1-400</sub>, con un valor de  $CI_{50} 8.8 \pm 1.0 \mu M$ , mediante un mecanismo mixto.

Las simulaciones de acoplamiento molecular ciego con un modelo homólogo validado de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub>, predijo que xantopocina (**I**) interactúa principalmente con los residuos Pro<sub>180</sub> y Phe<sub>182</sub> del dominio N-terminal y que dicha unión modifica la dinámica y función de las asas PTP y WPD, sugiriendo una inhibición alostérica desencadenada por cambios conformacionales.

Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia confirmaron que la xantopocina (**I**) se une a la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> y apaga su fluorescencia intrínseca mediante un mecanismo estático, induciendo cambios conformacionales que se traducen en la inhibición de la actividad fosfatasa de la enzima. La xantopocina (**I**) es el metabolito fúngico con la mayor afinidad de unión a la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> reportado hasta ahora.

Se sugiere que la xantopocina (**I**) inhibe a la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> a través de un mecanismo de inhibición alostérico que involucra al dominio C-terminal de la *PTPIB* de cadena completa y además inhabilita la dinámica del asa WPD en la conformación *apo-hPTPIB*<sub>1-400</sub>.

Se estimó que las propiedades de absorción de xantopocina (**I**) son bajas en comparación con las estimadas para fármacos aprobados. De acuerdo con los descriptores predichos, el compuesto **I** podría tener buena distribución. Además, **I** sólo inhibe al citocromo 2C9, uno de los cinco evaluados. También se predijo que el tamaño y polaridad de **I** no son similares a los de fármacos orales.



## 6 REFERENCIAS

- (1) Cheng, H.-C.; Qi, R. Z.; Paudel, H.; Zhu, H.-J. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Res* **2011**, 1-3. DOI: 10.4061/2011/794089.
- (2) Feldhammer, M.; Uetani, N.; Miranda-Saavedra, D.; Tremblay, M. L. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2013**, 48 (5), 430-445. DOI: 10.3109/10409238.2013.819830.
- (3) Tonks, N. K. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* **2003**, 546 (1), 140-148. DOI: 10.1016/s0014-5793(03)00603-3.
- (4) Alonso, A.; Sasin, J.; Bottini, N.; Friedberg, I.; Osterman, A.; Godzik, A.; Hunter, T.; Dixon, J.; Mustelin, T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **2004**, 117 (6), 699-711. DOI: 10.1016/j.cell.2004.05.018.
- (5) K., T. N. Overview of protein tyrosine phosphatases. In *Handbook of Cell Signaling*, Dennis, R. A. B. a. E. A. Ed.; Academic Press, **2003**.
- (6) Wang, W. Q.; Sun, J. P.; Zhang, Z. Y. An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. *Curr Top Med Chem* **2003**, 3 (7), 739-748. DOI: 10.2174/1568026033452302.
- (7) Barford, D.; Flint, A. J.; Tonks, N. K. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **1994**, 263 (5152), 1397-1404.
- (8) Villamar-Cruz, O.; Loza-Mejía, M. A.; Arias-Romero, L. E.; Camacho-Arroyo, I. Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer. *Biosci Rep* **2021**, 41 (11). DOI: 10.1042/BSR20211994.
- (9) Singh, S.; Singh Grewal, A.; Grover, R.; Sharma, N.; Chopra, B.; Kumar Dhingra, A.; Arora, S.; Redhu, S.; Lather, V. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorg Chem* **2022**, 121, 105626. DOI: doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626.
- (10) Simoncic, P. D.; McGlade, C. J.; Tremblay, M. L. PTP1B and TC-PTP: novel roles in immune-cell signaling. *Can J Physiol Pharmacol* **2006**, 84 (7), 667-675. DOI: 10.1139/y06-012.
- (11) Liu, R.; Mathieu, C.; Berthelet, J.; Zhang, W.; Dupret, J.-M.; Rodrigues Lima, F. Human protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): from structure to clinical inhibitor perspectives. *Int J Mol Sci* **2022**, 23 (13), 7027. DOI: 10.3390/ijSM23137027.
- (12) Choy, M. S.; Li, Y.; Machado, L. E. S. F.; Kunze, M. B. A.; Connors, C. R.; Wei, X.; Lindorff-Larsen, K.; Page, R.; Peti, W. Conformational rigidity and protein dynamics at distinct timescales regulate PTP1B activity and allostery. *Mol Cell* **2017**, 65 (4), 644-658.e645. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.01.014.
- (13) Crean, R. M.; Biler, M.; Van Der Kamp, M. W.; Hengge, A. C.; Kamerlin, S. C. L. Loop dynamics and enzyme catalysis in protein tyrosine phosphatases. *J Am Chem Soc* **2021**, 143 (10), 3830-3845. DOI: 10.1021/jacs.0c11806.
- (14) Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randal, M.; et al. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, 11 (8), 730-737. DOI: 10.1038/nsmb803.

- (15) Wang, Q.; Fu, X. Q.; Zheng, Q. C. Exploring the allosteric mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B by molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* **2020**, *38* (13), 4040-4047. DOI: 10.1080/07391102.2019.1682049.
- (16) Sharma, B.; Xie, L.; Yang, F.; Wang, W.; Zhou, Q.; Xiang, M.; Zhou, S.; Lv, W.; Jia, Y.; Pokhrel, L.; et al. Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *Eur J Med Chem* **2020**, *199*, 112376. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112376.
- (17) Jiménez-Arreola, B. S.; Aguilar-Ramírez, E.; Cano-Sánchez, P.; Morales-Jiménez, J.; González-Andrade, M.; Medina-Franco, J. L.; Rivera-Chávez, J. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B. *Bioorg Chem* **2020**, *101*, 103893. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103893.
- (18) Tautz, L.; Critton, D. A.; Grotegut, S. Protein tyrosine phosphatases: Structure, function, and implication in human disease. *Methods Mol Biol* **2013**, 179-221, 1053. DOI: 10.1007/978-1-62703-562-0\_13.
- (19) Rocha, S.; Corvo, L. M.; Fernandes, E.; Freitas, M. The emerging target protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) for type 2 diabetes mellitus management. *J Diabetes Clin Res* **2022**, *3* (4). DOI: 10.33696/diabetes.3.048.
- (20) Association, A. D. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* **2021**, *44* (Suppl 1), S15-S33. DOI: 10.2337/dc21-S002.
- (21) IDF Diabetes Atlas; International Diabetes Federation, **2021**.
- (22) Rines, A. K.; Sharabi, K.; Tavares, C. D. J.; Puigserver, P. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (11), 786-804. DOI: 10.1038/nrd.2016.151.
- (23) Chaudhury, A.; Duvoor, C.; Reddy Dendi, V. S.; Kraleti, S.; Chada, A.; Ravilla, R.; Marco, A.; Shekhawat, N. S.; Montales, M. T.; Kuriakose, K.; et al. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front Endocrinol* **2017**, *8*, 6. DOI: 10.3389/fendo.2017.00006.
- (24) INEGI. Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2022 (preliminar). 2023. *Comunicado de prensa núm. 29/23* **2023**.
- (25) Abdelsalam; Korashy; Zeidan; Agouni. The role of protein tyrosine phosphatase (PTP)-1B in cardiovascular disease and its interplay with insulin resistance. *Biomolecules* **2019**, *9* (7), 286. DOI: 10.3390/biom9070286.
- (26) Genovese, M.; Nesi, I.; Caselli, A.; Paoli, P. Natural  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1b inhibitors: A source of scaffold molecules for synthesis of new multitarget antidiabetic drugs. *Molecules* **2021**, *26* (16), 4818. DOI: 10.3390/molecules26164818.
- (27) Zhang, S.; Zhang, Z. Y. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov Today* **2007**, *12* (9-10), 373-381. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.03.011.
- (28) Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C. C.; et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **1999**, *283* (5407), 1544-1548. DOI: 10.1126/science.283.5407.1544.

- (29) Cho, H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity. *Vitam Horm* **2013**, *91*, 405-424. DOI: 10.1016/B978-0-12-407766-9.00017-1.
- (30) Cheng, A.; Uetani, N.; Simoncic, P. D.; Chaubey, V. P.; Lee-Loy, A.; Mcglade, C. J.; Kennedy, B. P.; Tremblay, M. L. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* **2002**, *2* (4), 497-503. DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00149-1.
- (31) Zabolotny, J. M.; Bence-Hanulec, K. K.; Stricker-Krongrad, A.; Haj, F.; Wang, Y.; Minokoshi, Y.; Kim, Y.-B.; Elmquist, J. K.; Tartaglia, L. A.; Kahn, B. B.; et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* **2002**, *2* (4), 489-495. DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00148-x.
- (32) Bence, K. K.; Delibegovic, M.; Xue, B.; Gorgun, C. Z.; Hotamisligil, G. S.; Neel, B. G.; Kahn, B. B. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* **2006**, *12* (8), 917-924. DOI: 10.1038/nm1435.
- (33) Morrison, C. D.; White, C. L.; Wang, Z.; Lee, S. Y.; Lawrence, D. S.; Cefalu, W. T.; Zhang, Z. Y.; Gettys, T. W. Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age. *Endocrinology* **2007**, *148* (1), 433-440. DOI: 10.1210/en.2006-0672.
- (34) Zhang, X.; Jiang, H.; Li, W.; Wang, J.; Cheng, M. Computational insight into protein tyrosine phosphatase 1B inhibition: A case study of the combined ligand and structure-based approach. *Comput Math Methods Med* **2017**, 1-13. DOI: 10.1155/2017/4245613.
- (35) Liu, Z.; Gao, H.; Zhao, Z.; Huang, M.; Wang, S.; Zhan, J. Status of research on natural protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as potential antidiabetic agents: Update. *Biomed Pharmacother* **2023**, *157*, 113990. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113990.
- (36) Krishnan, N.; Koveal, D.; Miller, D. H.; Xue, B.; Akshinthala, S. D.; Kragelj, J.; Jensen, M. R.; Gauss, C.-M.; Page, R.; Blackledge, M.; et al. Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nat Chem Biol* **2014**, *10* (7), 558-566. DOI: 10.1038/nchembio.1528.
- (37) Rivera-Chávez, J.; Coporo-Blancas, D.; Morales-Jiménez, J. One-step partial synthesis of (±)-asperteretone B and related hPTP1B<sub>1-400</sub> inhibitors from butyrolactone I. *Bioorg Med Chem* **2020**, *28* (24), 115817. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115817.
- (38) Zhang, W.; Hong, D.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Shen, Q.; Li, J. Y.; Hu, L. H.; Li, J. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760* (10), 1505-1512. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.05.009.
- (39) Rivera-Chávez, J.; Bustos-Brito, C.; Aguilar-Ramírez, E.; Martínez-Otero, D.; Rosales-Vázquez, L. D.; Dorazco-González, A.; Cano-Sánchez, P. Hydroxy-neo-Clerodanes and 5,10-seco-neo-Clerodanes from *Salvia decora*. *J Nat Prod* **2020**, *83* (7), 2212-2220. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00313.
- (40) Qian, S.; Zhang, M.; He, Y.; Wang, W.; Liu, S. Recent advances in the development of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for type 2 diabetes. *Future Med Chem* **2016**, *8* (11), 1239-1258. DOI: doi: 10.4155/fmc-2016-0064.
- (41) Jin, T.; Yu, H.; Huang, X.-F. Selective binding modes and allosteric inhibitory effects of lupane triterpenes on protein tyrosine phosphatase 1B. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 20766. DOI: 10.1038/srep20766.

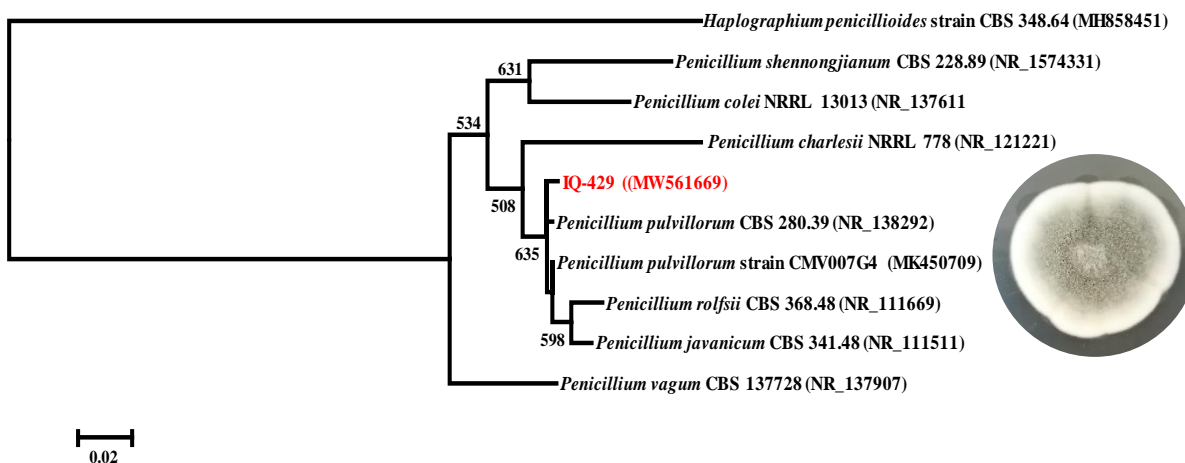
- (42) Kumar, G. S.; Page, R.; Peti, W. The mode of action of the protein tyrosine phosphatase 1b inhibitor ertiprotafib. *PLOS ONE* **2020**, *15* (10), e0240044. DOI: 10.1371/journal.pone.0240044.
- (43) Lantz, K. A.; Hart, S. G. E.; Planey, S. L.; Roitman, M. F.; Ruiz-White, I. A.; Wolfe, H. R.; Mclane, M. P. Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity* **2010**, *18* (8), 1516-1523. DOI: 10.1038/oby.2009.444.
- (44) Fukuda, S.; Ohta, T.; Sakata, S.; Morinaga, H.; Ito, M.; Nakagawa, Y.; Tanaka, M.; Matsushita, M. Pharmacological profiles of a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, JTT-551. *Diabetes Obes Metab* **2010**, *12* (4), 299-306. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2009.01162.x.
- (45) Krishnan, N.; Konidaris, K. F.; Gasser, G.; Tonks, N. K. A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *J Biol Chem* **2018**, *293* (5), 1517-1525. DOI: 10.1074/jbc.c117.819110.
- (46) Digenio, A.; Pham, N. C.; Watts, L. M.; Morgan, E. S.; Jung, S. W.; Baker, B. F.; Geary, R. S.; Bhanot, S. Antisense inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B with IONIS-PTP-1B. *Diabetes Care* **2018**, *41* (4), 807-814. DOI: 10.2337/dc17-2132.
- (47) Koller, E.; Gaarde, W. A.; Monia, B. P. Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. *Trends Pharmacol Sci* **2000**, *21* (4), 142-148. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)01448-6.
- (48) Gardes, M.; Bruns, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **1993**, *2* (2), 113-118. DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x.
- (49) Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **1997**, *25* (17), 3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.
- (50) Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **1997**, *25* (24), 4876-4882. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876.
- (51) Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **1999**, *41*, 95-98.
- (52) Guindon, S.; Dufayard, J. F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **2010**, *59* (3), 307-321. DOI: 10.1093/sysbio/syq010.
- (53) Lefort, V.; Longueville, J. E.; Gascuel, O. SMS: Smart model selection in PhyML. *Mol Biol Evol* **2017**, *34* (9), 2422-2424. DOI: 10.1093/molbev/msx149.
- (54) Mercan, F.; Bennett, A. M. Analysis of protein tyrosine phosphatases and substrates. *Curr Protoc Mol Biol* **2010**, *91* (1), 18.16.11-18.16.11. DOI: 10.1002/0471142727.mb1816s91.
- (55) Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G. SpecDis: quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra. *Chirality* **2013**, *25* (4), 243-249. DOI: 10.1002/chir.22138.

- (56) Grimblat, N.; Zanardi, M. M.; Sarotti, A. M. Beyond DP4: An improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts. *J Org Chem* **2015**, *80* (24), 12526-12534. DOI: 10.1021/acs.joc.5b02396.
- (57) Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* **2015**, *12* (1), 7-8. DOI: 10.1038/nmeth.3213.
- (58) Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **2010**, *5* (4), 725-738. DOI: 10.1038/nprot.2010.5.
- (59) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **2015**, *11* (8), 3696-3713. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
- (60) Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* **2013**, *3* (2), 198-210. DOI: 10.1002/wcms.1121.
- (61) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9* (7), 3084-3095. DOI: 10.1021/ct400341p.
- (62) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 42717. DOI: 10.1038/srep42717.
- (63) Bakar, K. A.; Feroz, S. R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand-protein binding affinity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2019**, *223*, 117337. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117337.
- (64) Igarashi, Y.; Kuwamori, Y.; Takagi, K.; Ando, T.; Fudou, R.; Furumai, T.; Oki, T. Xanthoepocin, a new antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IFO5762. *Journal Antibiot* **2000**, *53* (9), 928-933. DOI: 10.7164/antibiotics.53.928.
- (65) Vrabl, P.; Siewert, B.; Winkler, J.; Schöbel, H.; Schinagl, C. W.; Knabl, L.; Orth-Höller, D.; Fiala, J.; Meijer, M. S.; Bonnet, S.; *et al.* Xanthoepocin, a photolabile antibiotic of *Penicillium ochrochloron* CBS 123823 with high activity against multiresistant gram-positive bacteria. *Microb Cell Fact* **2022**, *21* (1), 1. DOI: 10.1186/s12934-021-01718-9.
- (66) Pescitelli, G.; Bruhn, T. Good computational practice in the assignment of absolute configurations by TDDFT calculations of ECD spectra. *Chirality* **2016**, *28* (6), 466-474. DOI: 10.1002/chir.22600.
- (67) Nazir, M.; Saleem, M.; Ali, I.; Abbas, G.; Rehman, N. U.; Green, I. R.; Hussain, W.; Khan, S.; Hussain, H. Fungal metabolites as anti-diabetic agents: emphasis on PTPIB inhibitors. *Phytochemi Rev* **2021**, *20* (1), 119-143. DOI: 10.1007/s11101-020-09701-9.

- (68) Rangel-Grimaldo, M.; Macías-Rubalcava, M. L.; González-Andrade, M.; Raja, H.; Figueroa, M.; Mata, R.  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1b inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J Nat Prod* **2020**, *83* (3), 675-683. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01108.
- (69) Iversen, L. F.; Andersen, H. S.; Branner, S.; Mortensen, S. B.; Peters, G. H.; Norris, K.; Olsen, O. H.; Jeppesen, C. B.; Lundt, B. F.; Ripka, W.; et al. Structure-based design of a low molecular weight, nonphosphorus, nonpeptide, and highly selective inhibitor of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *J Biol Chem* **2000**, *275* (14), 10300-10307. DOI: 10.1074/jbc.275.14.10300.
- (70) Mátyus, L.; Szöllosi, J.; Jenei, A. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *J Photochem Photobiol B* **2006**, *83* (3), 223-236. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2005.12.017.
- (71) Alexiev, U.; Farrens, D. L. Fluorescence spectroscopy of rhodopsins: insights and approaches. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1837* (5), 694-709. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.10.008.
- (72) Fonin, A. V.; Sulatskaya, A. I.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. inner filter effect correction. *PLOS ONE* **2014**, *9* (7), e103878. DOI: 10.1371/journal.pone.0103878.
- (73) Jia, C. Y.; Li, J. Y.; Hao, G. F.; Yang, G. F. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. *Drug Discov Today* **2020**, *25* (1), 248-258. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.10.014.
- (74) Durán-Iturbide, N. A.; Díaz-Eufracio, B. I.; Medina-Franco, J. L. *In silico* ADME/Tox profiling of natural products: A focus on BIOFACQUIM. *ACS Omega* **2020**, *5* (26), 16076-16084. DOI: 10.1021/acsomega.0c01581.
- (75) Daina, A.; Zoete, V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem* **2016**, *11* (11), 1117-1121. DOI: 10.1002/cmdc.201600182.
- (76) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46* (1-3), 3-26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- (77) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (D1), D1074-D1082. DOI: 10.1093/nar/gkx1037.
- (78) Lagorce, D.; Douguet, D.; Miteva, M. A.; Villoutreix, B. O. Computational analysis of calculated physicochemical and ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors. *Sci Rep* **2017**, *7*, 46277. DOI: 10.1038/srep46277.
- (79) Daly, A. K.; Rettie, A. E.; Fowler, D. M.; Miners, J. O. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and clinical considerations. *J Pers Med* **2017**, *8* (1). DOI: 10.3390/jpm8010001.
- (80) Yang, Z. Y.; He, J. H.; Lu, A. P.; Hou, T. J.; Cao, D. S. Frequent hitters: nuisance artifacts in high-throughput screening. *Drug Discov Today* **2020**, *25* (4), 657-667. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.01.014.

(81) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem* **2010**, *53* (7), 2719-2740. DOI: 10.1021/jm901137j.

## 7 ANEXOS

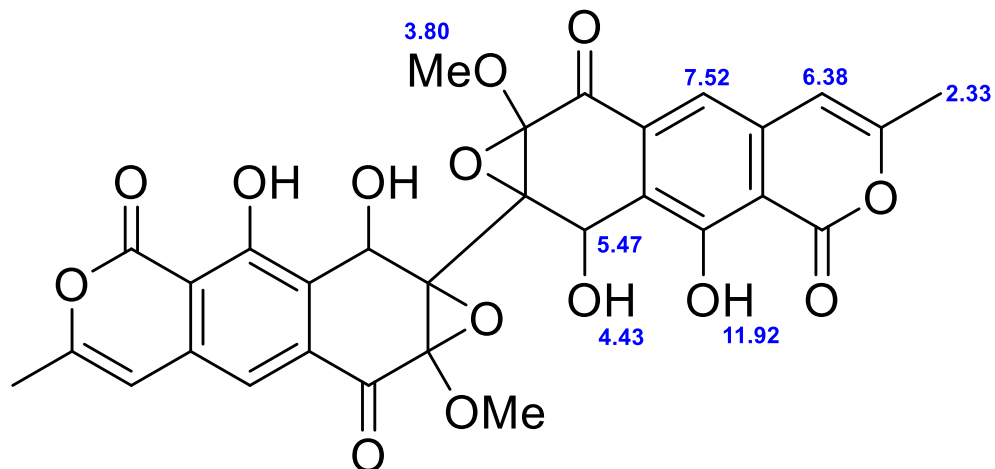


**Figura S1.** Árbol de máxima verosimilitud ( $-\ln L = 1844.06$ ) de la región ITS del microorganismo fúngico IQ-429. La secuencia de la región ITS de *Haplographium penicillioides* se utilizó como grupo externo. La barra de escala indica una divergencia de secuencia estimada del 2%. Los valores de soporte Bootstrap se indican para los nodos principales con valores  $\geq 50\%$ .

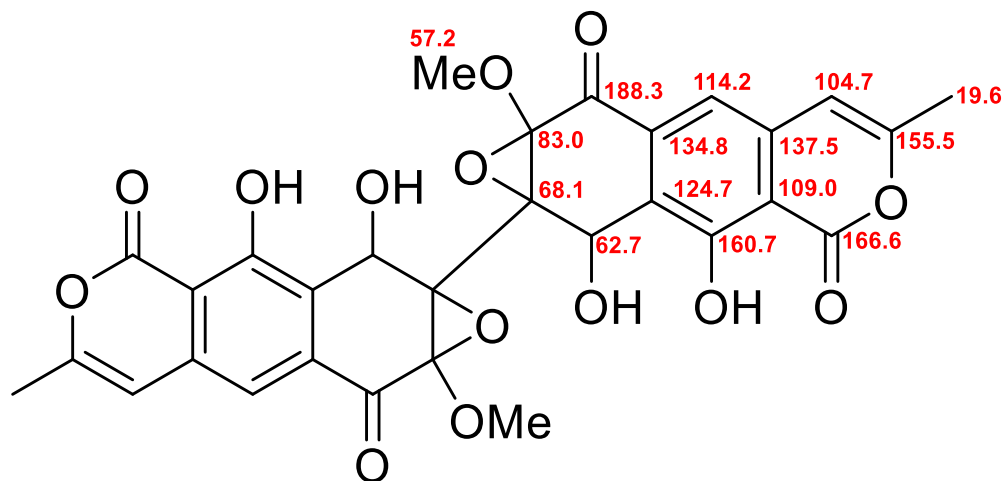
**Tabla S1.** Datos de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz) y RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de xantoeopocina (**1**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Posición	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult.	Posición	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult.
1,1'	166.6		8,8'	68.1	
3,3'	155.5		9,9'	62.7	5.47, s
4,4'	104.7	6.38, s	9a,9a'	124.7	
4a,4a'	137.5		10,10'	160.7	
5,5'	114.2	7.52, s	10a,10a'	109.0	
5a,5a'	134.8		3-CH <sub>3</sub> , 3'-CH <sub>3</sub>	19.6	2.33, s
6,6'	188.3		9-OH, 9'-OH		4.43, s
7,7'	83.0		10-OH, 10'-OH		11.92, s
7-OCH <sub>3</sub> , 7'-OCH <sub>3</sub>	57.2	3.8, s			

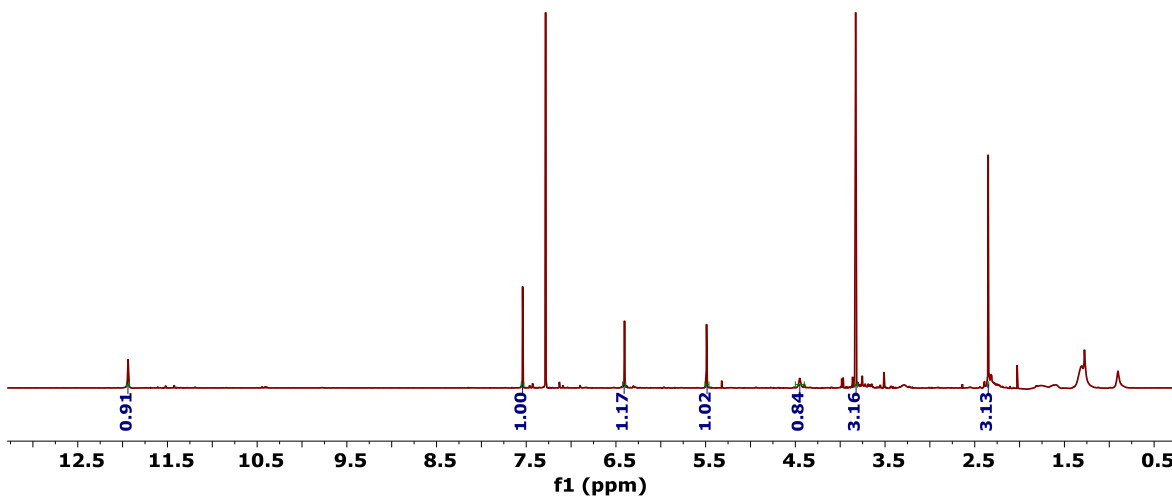




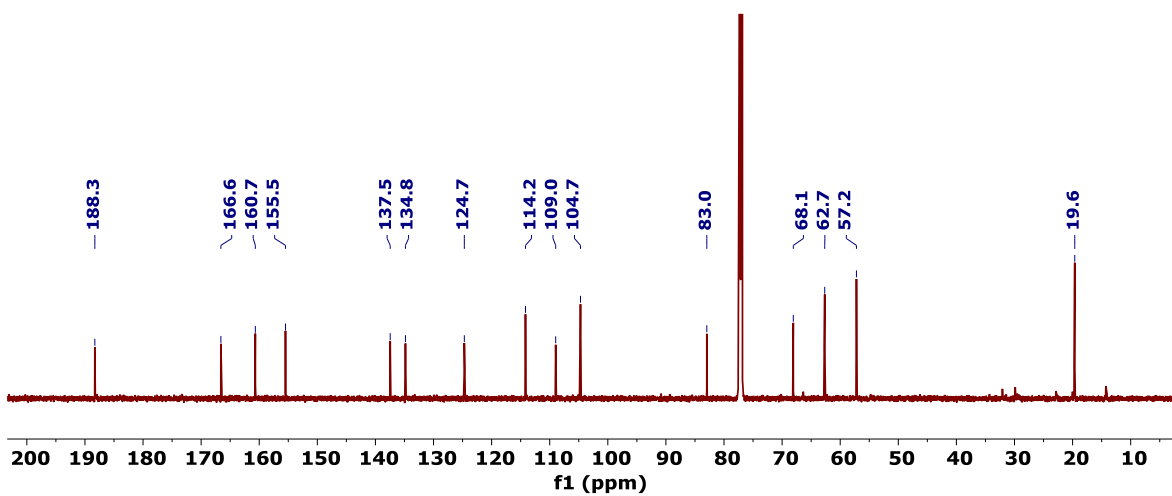
**Figura S2.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz) del compuesto I.



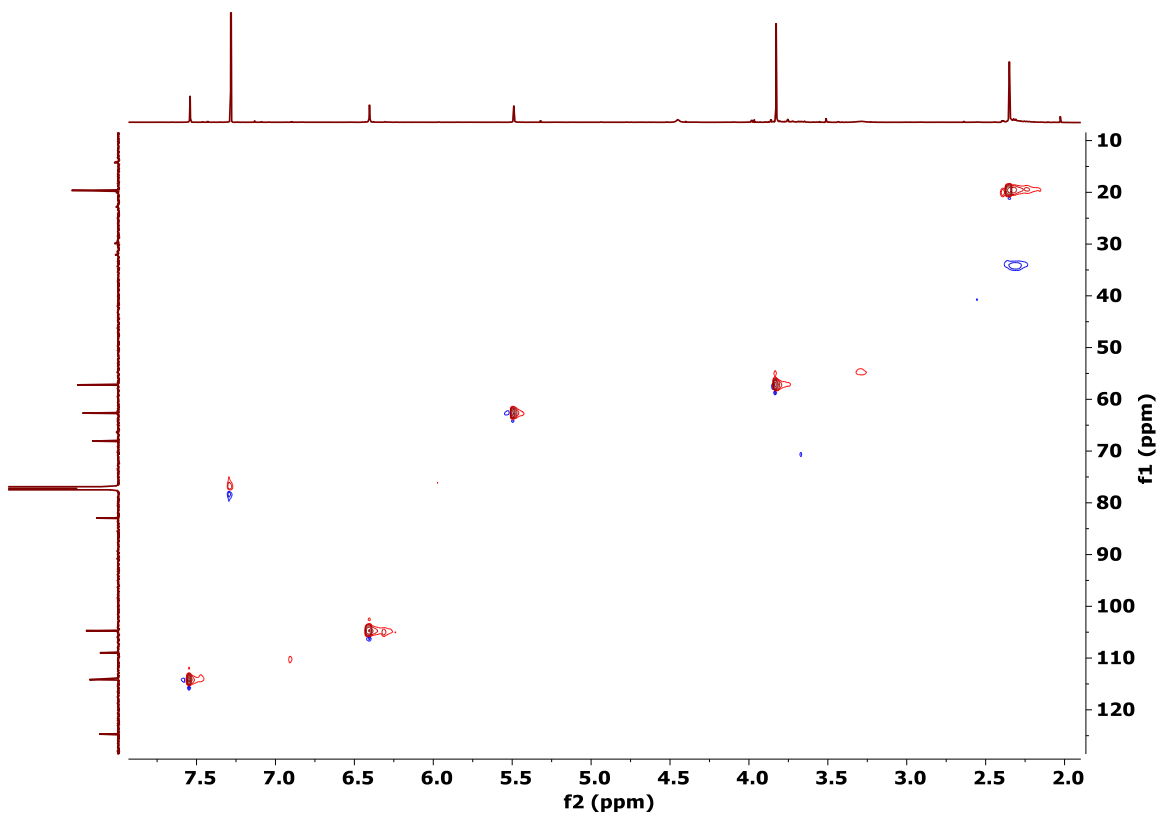
**Figura S3.** Desplazamientos químicos de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) del compuesto I.



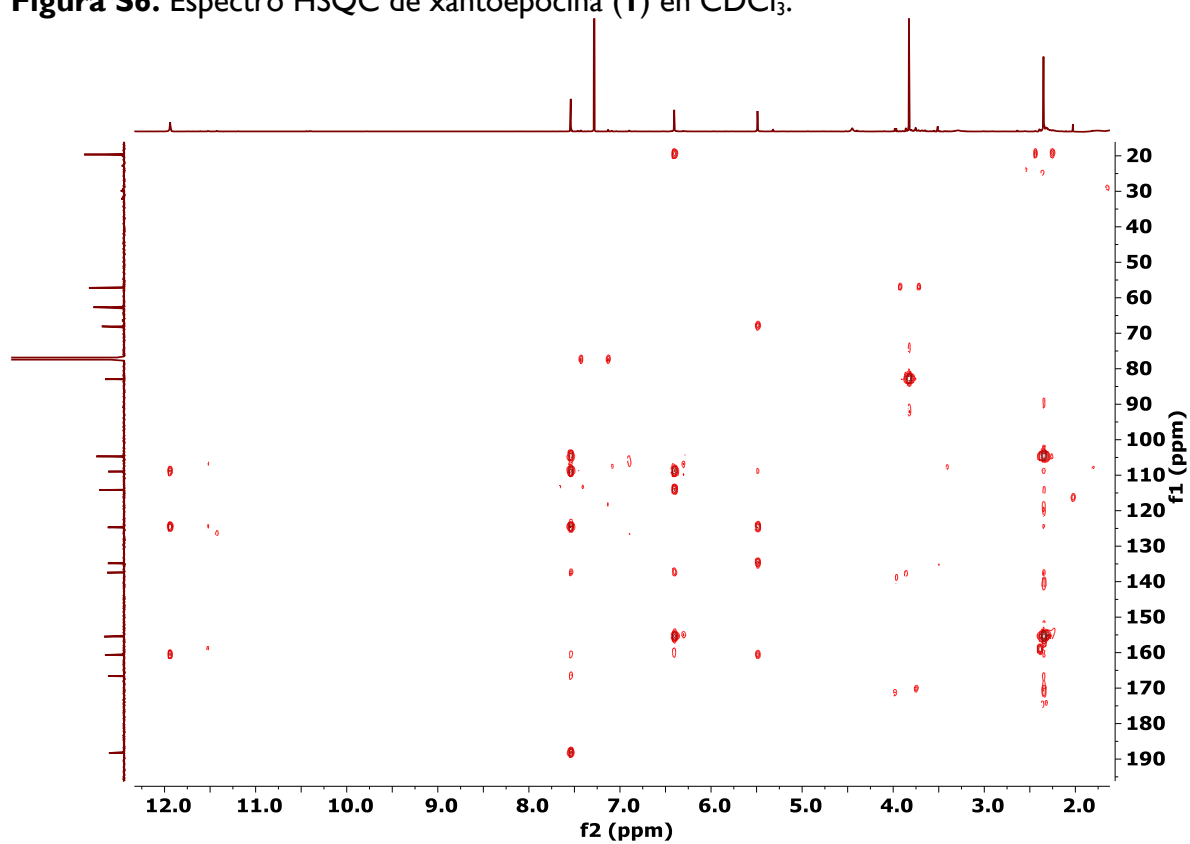
**Figura S4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de xantopocina (I) en CDCl<sub>3</sub> a 700 MHz.



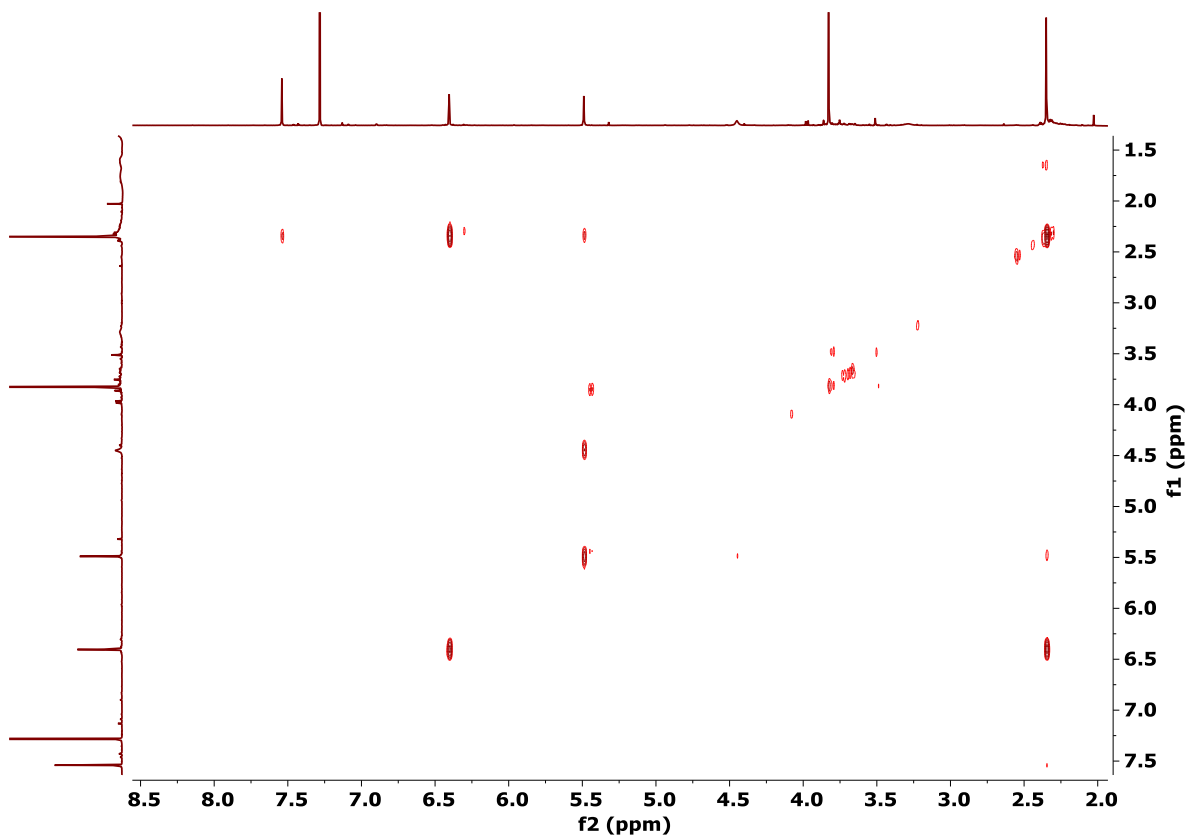
**Figura S5.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de xantopocina (I) en CDCl<sub>3</sub> a 175 MHz.



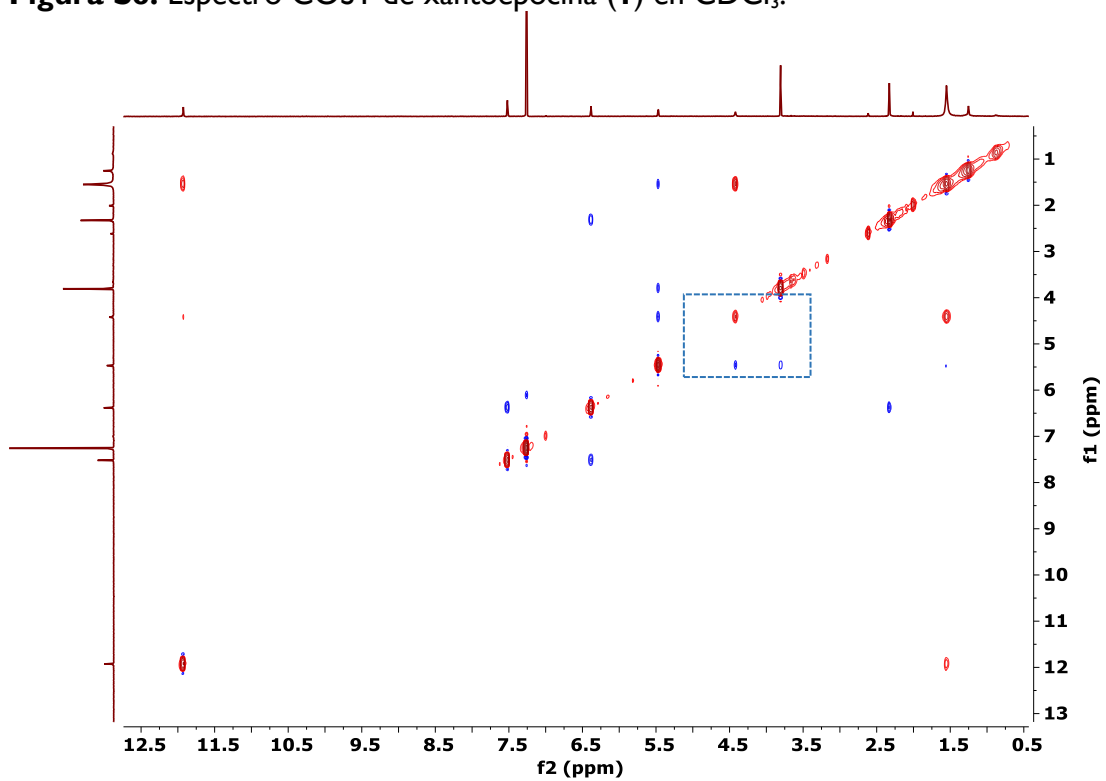
**Figura S6.** Espectro HSQC de xantopocina (**I**) en  $\text{CDCl}_3$ .



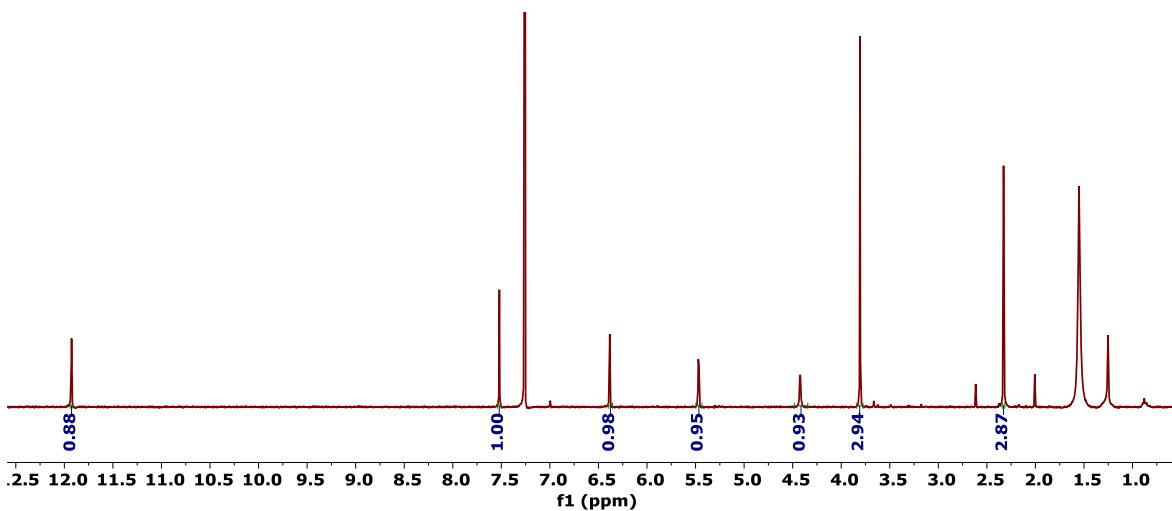
**Figura S7.** Espectro HMBC de xantopocina (**I**) en  $\text{CDCl}_3$ .



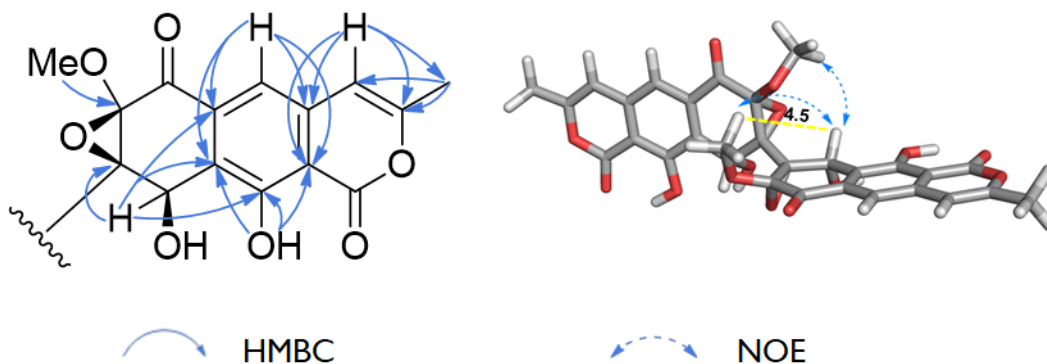
**Figura S8.** Espectro COSY de xantopocina (I) en  $\text{CDCl}_3$ .



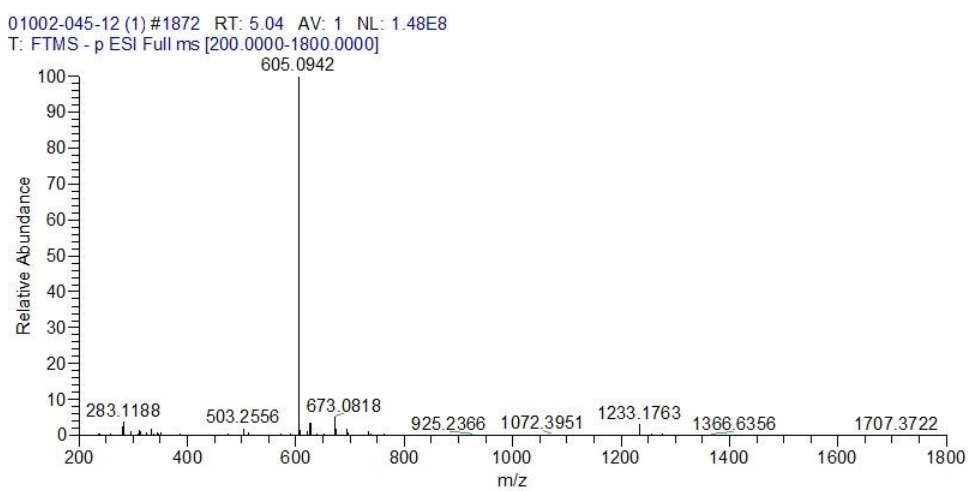
**Figura S9.** Espectro NOESY de xantopocina (I) en  $\text{CDCl}_3$  A 400 MHz. Se resalta la correlación NOE entre H-9/7- $\text{OCH}_3$  y H-9'/7'- $\text{OCH}_3$ .



**Figura S10.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de xantopocina (**I**) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



**Figura S11.** Correlaciones HMBC y NOE claves del compuesto **I**.



**Figura S12.** Espectro masas de EM-AR-ESI de xantopocina (**I**).

## 7 PUBLICACIÓN



# Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429

Ingrid Y. Martínez-Aldino<sup>a,1</sup>, Martha Villaseca-Murillo<sup>a</sup>, Jesús Morales-Jiménez<sup>b,\*</sup>, José Rivera-Chávez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> CONACYT-Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA), Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a sección, 78216 San Luis Potosí, Mexico

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Xanthoepocin  
Allosteric modulators/inhibitors  
*h*PTP1B<sub>1-400</sub>  
*Penicillium* sp.  
Computational chemistry

## ABSTRACT

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is an active target for developing drugs to treat type II diabetes, obesity, and cancer. However, in the past, research programs targeting this enzyme focused on discovering inhibitors of truncated models (*h*PTP1B<sub>1-282</sub>, *h*PTP1B<sub>1-298</sub>, or *h*PTP1B<sub>1-321</sub>), losing valuable information about the ligands' mechanism of inhibition and selectivity. Nevertheless, finding an allosteric site in *h*PTP1B<sub>1-321</sub>, and the full-length (*h*PTP1B<sub>1-400</sub>) protein expression, have shifted the strategies to discover new PTP1B inhibitors. Accordingly, as part of a research program directed at finding non-competitive inhibitors of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> from *Penicillium* sp., the extract of *Penicillium* sp. (IQ-429) was chemically investigated. This study led to xanthoepocin (**1**) isolation, which was elucidated by means of spectroscopic and spectrometric data. The absolute configuration of **1** was determined to be 7*R*8*S*9*R*7'*R*8'*S*9'*R* by comparing the theoretical and experimental ECD spectra and by GIAO-NMR DP4 + statistical analysis. Xanthoepocin (**1**) inhibited the phosphatase activity of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> (IC<sub>50</sub> value of 8.8 ± 1.0 μM) in a mixed type fashion, with *k*<sub>i</sub> and α*k*<sub>i</sub> values of 5.5 and 6.6 μM, respectively. Docking xanthoepocin (**1**) with a homologated model of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> indicated that it binds in a pocket different from the catalytic triad at the interface of the N and C-terminal domains. Molecular dynamics (MD) simulations showed that **1** locks the WPD loop of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> in a closed conformation, avoiding substrate binding, products release, and catalysis, suggesting an allosteric modulation triggered by large-scale conformational and dynamics changes. Intrinsic quenching fluorescence experiments indicated that **1** behaves like a static quencher of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> (*K*<sub>SV</sub> = 1.1 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>), and corroborated that it binds to the enzyme with an affinity constant (*K*<sub>a</sub>) of 3.7 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>. Finally, the drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of **1** were predicted with SwissADME.

## 1. Introduction

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) negatively regulates leptin, insulin, and epidermal growth factor signaling, and is one of the most promising targets for developing drugs to treat type II diabetes mellitus, obesity, and cancer [1–3]. Canonically, the soluble form of PTP1B is a 435 amino acid protein; however, shorter versions are commonly used in biological screening assays (282, 298, and 321) [4]. Its N-terminal domain holds the catalytic domain and comprises the PTP loop (residues 214–223, including the catalytic Cys<sub>215</sub>), the WPD loop (residues

177–188, counting Asp<sub>181</sub>, a proton donor/acceptor during catalysis), which dynamics (open/closed conformation) is crucial for catalysis, and the substrate-binding loop (SBL, residues 44–49), which defines the depth and selectivity of the catalytic site [3,5,6]. Furthermore, human PTP1B<sub>1-321</sub> holds an allosteric site located 20 Å away from the catalytic pocket, at the joint interface of helices α-3 (residues 189–201), α-6 (residues 265–281), and α-7 (residues 286–295), in the C-terminal domain [2,6,7]. Thus far, several inhibitors of the truncated model of *h*PTP1B have been developed, including ligands binding to the catalytic domain in a substrate-like and non-substrate-like manner, and

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [jesus.morales@ipicyt.edu.mx](mailto:jesus.morales@ipicyt.edu.mx) (J. Morales-Jiménez), [jrivera@iquimica.unam.mx](mailto:jrivera@iquimica.unam.mx) (J. Rivera-Chávez).

<sup>1</sup> Taken in part from the Ph.D. thesis of I. Y. Martínez-Aldino

molecules docking to the allosteric site [8–10]. Remarkably, since the expression of a full-length human hPTP1B<sub>1-400</sub> by Tonks and coworkers, a new allosteric inhibition mechanism targeting the intrinsically disordered C-terminal domain (residues 301–400) of the protein was proposed [11]. Since then, several natural products, mainly from Pezizomycotina (microscopic fungi), have been reported as full-length protein inhibitors [12–14].

Interestingly, truncated hPTP1Bs and hPTP1B<sub>1-400</sub> behave biochemically different when confronted with inhibitors *in vitro*. For example, ursolic acid is a well-characterized competitive inhibitor of shorten hPTP1B [15]. Conversely, it binds in a 1:1 protein–ligand ratio and behaves as a non-competitive inhibitor against the full-length protein [13,16]. These data suggest that the use of truncated models of the protein in drug discovery programs may lead to the loss of valuable information about the mechanism of inhibition of a ligand. Furthermore, it was recently reported that ertiprotafib, a PTP1B inhibitor that reached clinical trials, does not inhibit hPTP1B competitively [17]. Instead, it induces protein aggregation in a concentration-dependent manner, resulting in inhibition of the phosphatase activity [17]. Altogether, these facts highlight the relevance of establishing the molecular mode of inhibition of a ligand before extensive compound optimization efforts.

Towards discovering allosteric modulators of hPTP1B<sub>1-400</sub> from fungi (harvested in semi-desert areas in Mexico), the extract of *Penicillium* sp. IQ-429 was chemically investigated. This study allowed the isolation of xanthoepocin (**1**), a dimeric naphthopyrone with promising activity as hPTP1B<sub>1-400</sub> inhibitor. Spectroscopic, spectrometric, chiroptic, and theoretical-statistical approaches (ECD-TD-DFT and GIAO-NMR calculations) were used to elucidate the structure and absolute configuration of compound **1**. Concentration-response curves, kinetic studies, and quenching fluorescence experiments were performed to establish the IC<sub>50</sub>, inhibition constant ( $k_i$ ), mode of inhibition, and the affinity constant ( $k_a$ ) of **1**. The putative molecular bases of the inhibition were predicted using computational approaches, such as molecular docking and dynamics. Overall, this study's results showed that the interaction of **1** with residues of the WPD loop and the C-terminal domain of hPTP1B<sub>1-400</sub> locks the WPD loop in a closed conformation, further avoiding substrate binding, product release, and catalysis. The molecular mechanism involves large-scale conformational and dynamic changes onto the structure of the enzyme, allosterically modulating its phosphatase activity.

## 2. Results and discussion

As part of a research program focused on the chemistry of fungi from semi-desert areas in Mexico and the discovery of allosteric modulators of the full-length human protein tyrosine phosphatase 1B (hPTP1B<sub>1-400</sub>) [13,14], a few fungi isolated from a semi-desert soil sample were cultured in two different solid media (rice and cereal). The organic extracts were prepared and screened *in vitro* as hPTP1B<sub>1-400</sub> inhibitors. Based on its potent inhibitory properties (100% inhibition at 20 ppm) against hPTP1B<sub>1-400</sub>, the extract of *Penicillium* sp. (IQ-429) was selected for chemical investigation. Fractionation of this sample using a set of conventional chromatographic methods allowed the isolation of xanthoepocin (**1**) [18], which was chemically characterized by comparing its spectroscopic, spectrometric, and physicochemical data with those reported in the literature. The 1D, 2D NMR, and HR-ESI-MS spectra are provided in the Supporting Information file.

Identical to xanthoepocin (**1**) [18], compound **1** was isolated as an optically active ( $[\alpha]_D^{25} = -13.8$ ) yellow solid. Its molecular formula was calculated to be C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>O<sub>14</sub> as determined by HR-ESI-MS, indicating an index of hydrogen deficiency of 20. The <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and HSQC NMR data of **1** revealed a chelated phenolic hydrogen ( $\delta_H$  11.92), two aromatic protons ( $\delta_H/\delta_C$  7.52/114.2, 6.38/104.7), one oxymethine ( $\delta_H/\delta_C$  5.47/62.7), one hydroxy ( $\delta_H$  4.43), one methoxy moiety ( $\delta_H/\delta_C$  3.80/57.2, and a methyl group ( $\delta_H/\delta_C$  2.33/19.6), together with ten fully

substituted carbons, including five aromatic carbons ( $\delta_C$  134.8, 124.7, 137.5, 109.0 and 155.5), two oxygenated ( $\delta_C$  83.0 and 68.1), two carbonyls ( $\delta_C$  166.6 and 188.3), and one phenolic group ( $\delta_C$  160.7). Careful analysis of the HMBC spectrum (Figures S7 and S10, Supporting Information) allowed to partially assign the structure of **1** as shown in **1a** (Fig. 1). Interestingly, substructure **1a** only accounts for a minimal formula of C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>, indicating that **1** is a symmetric dimer.

### 2.1. Absolute configuration

Xanthoepocin (**1**, Fig. 1) was first reported by Igarashi and coworkers in 2000 [18]. This metabolite was isolated as a yellow pigment from the liquid fermentation and mycelia of *Penicillium simplicissimum* IFO5762. The structure of **1** was established based on the analysis of spectroscopic (IR, UV, and NMR), spectrometric data (HR-MS), and chemical derivatization. However, in that study, its absolute configuration was not determined. Furthermore, biological evaluation against a panel of yeast, Gram-positive and negative bacteria demonstrated its potential as antibiotic and antifungal against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Torulopsis glabrata*, respectively [18].

Herein, the relative configuration of **1** was established by NOESY correlation observed between H-9/7-OMe and H-9'/7'-OMe (Figure S10), indicating that these protons are in the same face of the molecule. Consequently, just two options for the absolute configuration of the stereocenters are possible: enantiomers 7R8S9R7'R8'S9'R and 7S8R9S7'S8'R9'S. Then, to establish the absolute configuration of **1**, its experimental ECD spectrum was recorded and compared with those obtained by calculating the electronic transitions using Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) [19] for enantiomers 7R8S9R7'R8'S9'R and 7S8R9S7'S8'R9'S (Fig. 2). The experimental ECD spectrum for **1** displayed two negative Cotton effects at 234 and 389 nm and two positives at 269 and 342 nm. The shape of the curve was in good agreement with that calculated for the 7R8S9R7'R8'S9'R enantiomer, thus establishing its absolute configuration. Additionally, the correct spatial distribution of xanthoepocin (**1**) was corroborated by comparing the experimental 1D-NMR data with the 1D-GIAO-NMR calculated chemical shifts for diastereomers 7R8S9S7'R8'S9'S and 7R8S9R7'R8'S9'R using DP4 + statistical analysis [20]. The DP4 + probability for <sup>13</sup>C (99.7 %) and <sup>1</sup>H (100 %) and all data (100 %) fully supported the absolute configuration of **1** as 7R8S9R7'R8'S9'R.

### 2.2. Xanthoepocin (**1**) is a mixed-type inhibitor of hPTP1B<sub>1-400</sub>

The *in vitro* inhibitory properties of xanthoepocin (**1**) against hPTP1B<sub>1-400</sub> were determined using a spectrophotometric method. Results from this evaluation shown that **1** inhibits hPTP1B<sub>1-400</sub> in a concentration-dependent manner (Fig. 3A) with an IC<sub>50</sub> value of 8.8 ± 1.0 μM (Fig. 3A). Compound **1** was threefold more active than ursolic acid (IC<sub>50</sub> = 26.6 ± μM, positive control) [16], some dimeric phenalenones [13] and butyrolactone I derivatives [14] isolated from fungi of the Pezizomycotina subphylum. Previously, single and dimeric naphthopyrones and anthraquinones from fungi have been described as inhibitors of truncated models of PTP1B. Some examples include rubrofusarin B, TMC-256A1, aurasperone F, and four anthraquinones previously isolated from *Malbranchea circinata* [21,22]. However, only 15 inhibitors of hPTP1B<sub>1-400</sub> have been isolated from plants and microorganisms up to date. Thus, it is the first report of a dimeric naphthopyrone as an inhibitor of the full-length human PTP1B.

To determine the mode of inhibition of **1** towards hPTP1B<sub>1-400</sub>, kinetic studies were performed using a range of substrate and compound **1** concentrations (Fig. 3B), and analyzed by the double-reciprocal Lineweaver-Burk plot (Fig. 3C). The results shown in Fig. 3C display a set of lines intersecting in the second quadrant, representative of a mixed-type inhibitor, with increasing  $K_M$  and decreasing  $V_{max}$  values (Fig. 3D) [23,24]. The  $k_i$  and  $\alpha$  values calculated were 5.5 μM and 1.2 ( $\alpha k_i = 6.6$



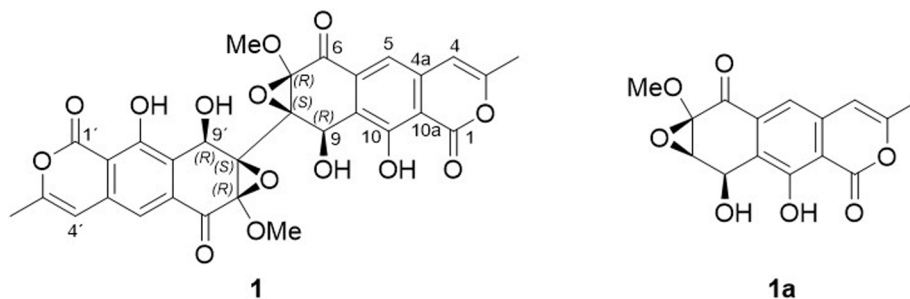


Fig. 1. Structure of xanthoepocin (1) and its monomeric unit (1a).

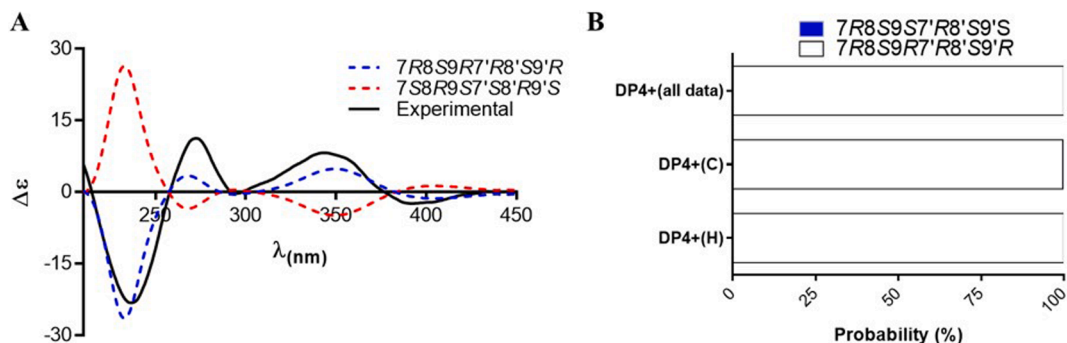


Fig. 2. (A) Experimental ECD spectrum for xanthoepocin (1, black line), calculated ECD spectra for 7R8S9R7'R8'S9'R (blue dashed line) and its enantiomer 7S8R9S7'S8'R9'S (red dashed line). (B) Plot of DP4 + probabilities generated by correlating the experimental 1D-NMR data for 1 with the calculated chemical shifts for diastereoisomers 7R8S9S7'R8'S9'S (blue) and 7R8S9R7'R8'S9'R (white).

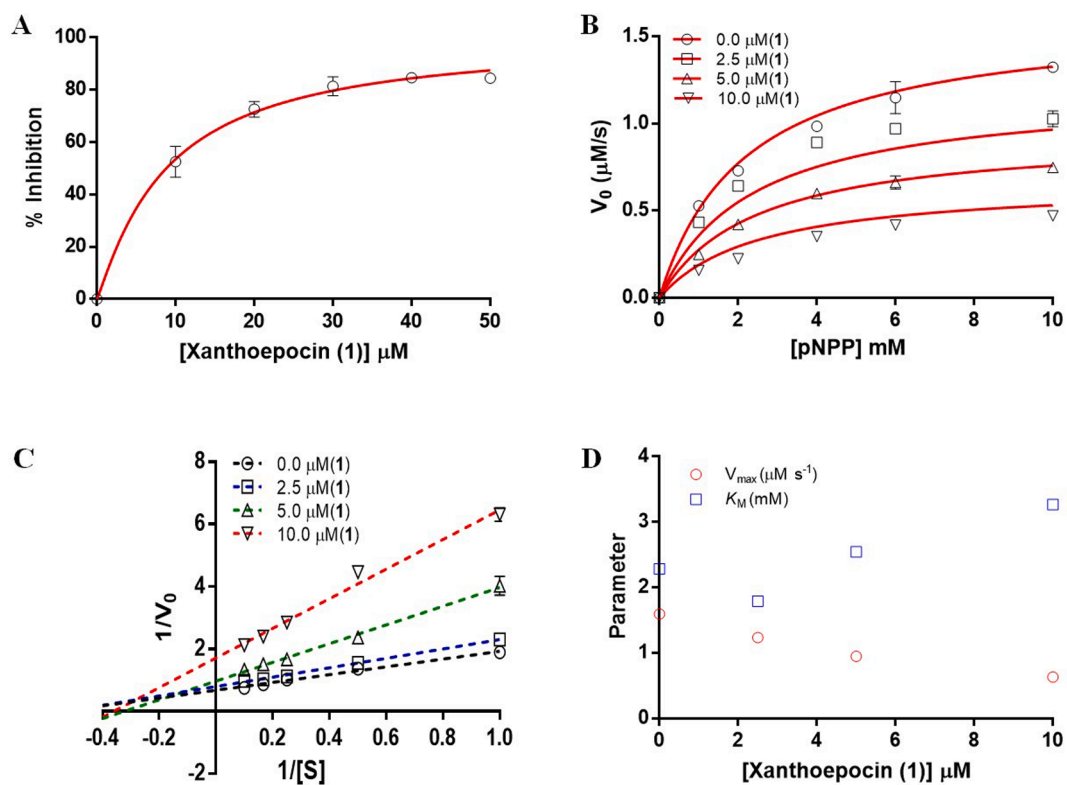


Fig. 3. (A) Concentration-response curve of xanthoepocin (1) against hPTP1B<sub>1-400</sub>. (B) Reaction rate vs substrate concentration graph showing the relative rate of hPTP1B<sub>1-400</sub> in the absence and increasing concentrations of 1. (C) Lineweaver-Burk plot of hPTP1B<sub>1-400</sub> inhibition at different concentrations of substrate and 1. The figure describes a family of lines that intersect at a single point to the left of the vertical axis, the typical pattern of a mixed-type inhibition, as supported by increasing  $K_M$  and decreasing  $V_{max}$  values (D). In all cases the data correspond to three independent experiments.

$\mu\text{M}$ ), respectively. Notably, the value of  $\alpha$  close to one shows that xanthoepocin (**1**) has an equal affinity for the free *h*PTP1B<sub>1-400</sub> and the complex *h*PTP1B<sub>1-400</sub>-pNPP, and can inhibit its activity via a putative allosteric mechanism [24].

### 2.3. Molecular docking

To predict the presumptive binding pocket for xanthoepocin (**1**) onto *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, molecular docking studies were executed in AutoDock, using a validated protocol with a homologated model of the protein [13]. Results from this prediction indicated that **1** binds to *h*PTP1B<sub>1-400</sub> in a predominantly hydrophobic pocket, showing well-established interactions with amino acids of the C-terminal domain (Asp<sub>265</sub>, Gln<sub>332</sub>, Trp<sub>333</sub>, Ser<sub>386</sub>, Pro<sub>387</sub>, Ala<sub>388</sub>, Lys<sub>389</sub>, Gly<sub>390</sub>, Glu<sub>391</sub>, Pro<sub>392</sub>, and Pro<sub>395</sub>), and one amino acid of the N-terminal domain (Trp<sub>16</sub>) (Fig. 4). This molecule's contacts with residues of the C-terminus of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> suggest that xanthoepocin (**1**) may induce conformational changes onto the protein, locking the enzyme in a conformation unable to perform catalysis. The forces that governed the interactions were mainly hydrophobic (Van der Waals and CH- $\pi$ ) and hydrogen bonding.

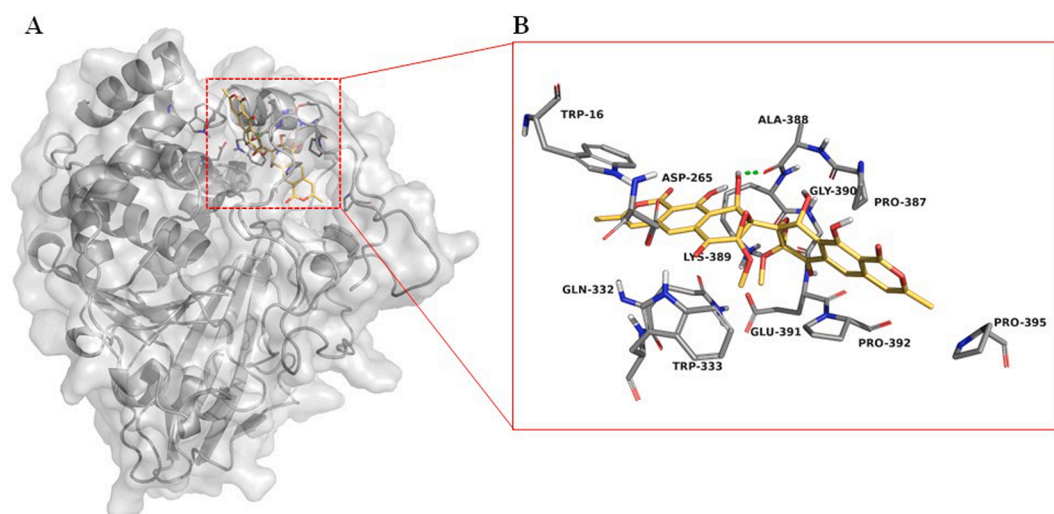
### 2.4. Molecular dynamics (MD) simulations

In PTP1B, substrate binding is attended by the WPD loop dynamics, from an open (hydrolysis incompetent) to a closed (hydrolysis competent) conformation, and it is the rate-limiting step for hydrolysis [2,5–7]. After substrate recognition and binding, this loop closes, and Arg<sub>221</sub> (located at the PTP loop) rotates around its  $\gamma$ -carbon, establishing a salt bridge with the phosphate group of the substrate [5]. These conformational changes then position Asp<sub>181</sub> in a proper conformation for catalysis. Furthermore, the WPD loop dynamics is also modulated by a complex network involving Pro<sub>185</sub>, which forms a CH- $\pi$  interaction with Phe<sub>269</sub> and a hydrophobic contact with Pro<sub>180</sub> when open [5]. Conversely, in the closed state, Pro<sub>180</sub> rotates down towards Arg<sub>221</sub> and breaks the hydrophobic contact with Pro<sub>185</sub> [5]. This transition allows the formation of a new CH- $\pi$  interaction with Trp<sub>179</sub>, triggering several conformational changes concerning Ser<sub>187</sub>, Ser<sub>190</sub>, Phe<sub>191</sub>, and Phe<sub>269</sub>, allowing the closure of the WPD-loop [5]. Hitherto, four different types of PTP1B inhibitors have been generated: i) charged substrate analogs that bind to the catalytic domain in a substrate-like fashion, ii) molecules that bind to the active site in a non-substrate-like manner, iii) molecules that disturb the dynamics of the WPD-loop by binding to the allosteric pocket of the protein [7,8], located  $\sim 20$  Å away from the

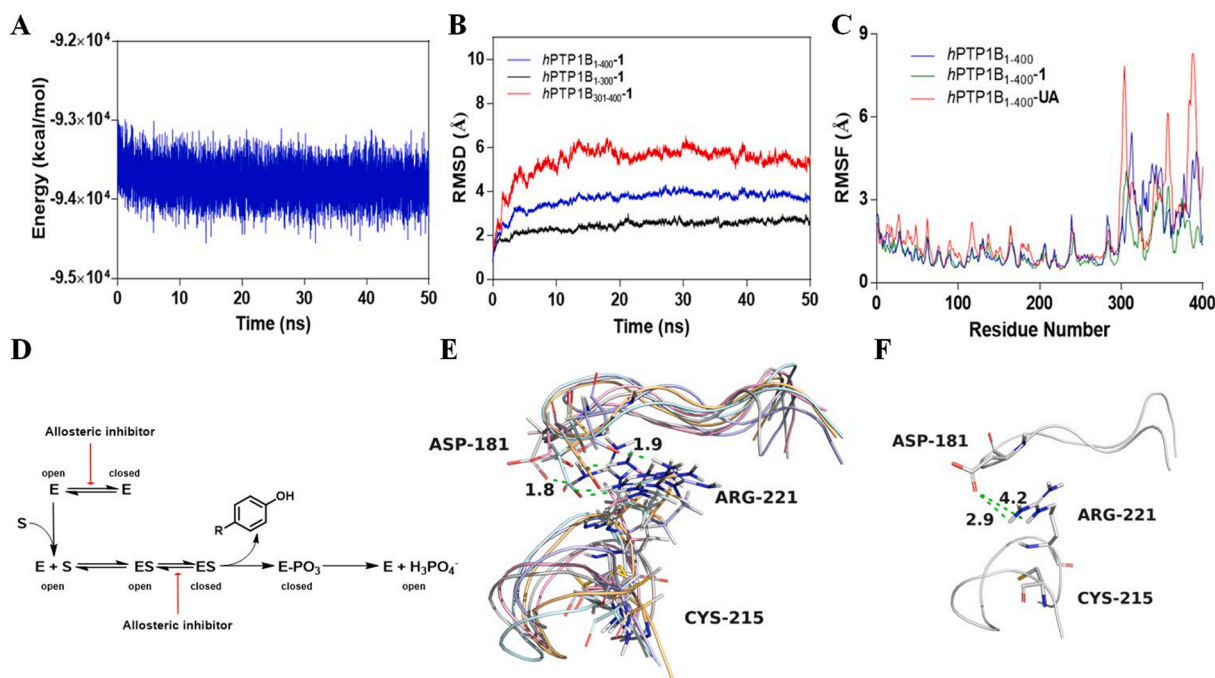
catalytic site at the joint of helices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -6, and  $\alpha$ -7, and iv) ligands that interact with the intrinsically disordered C-terminal domain of the full-length PTP1B [11], locking the protein in an inactive state, via a cooperative mechanism involving the C-terminal domain and a second binding site close to the catalytic domain (N-terminal).

Thus, to get more information about the C-terminal domain disorder (residues 301–400) and its relation with the dynamics of the WPD loop of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> in complex with compound **1**, as insight onto the molecular mechanism of inhibition, MD simulations were carried out using the docking predicted model as the starting point. Interestingly, after equilibrating the system for MD simulation, the predicted binding pocket for **1** was slightly modified, incorporating residues Pro<sub>180</sub>, Phe<sub>182</sub> (WPD-loop), and Thr<sub>263</sub> (P-loop). The preliminary results from MD for the protein clearly showed that the system was stable over the 50 ns simulation (Fig. 5A), reaching the equilibrium after 5 ns. Remarkably, the calculated RMSD for residues 1–300 of the 1-*h*PTP1B<sub>1-400</sub> complex was on average 2.4 Å. However, for residues 301–400, the RMSD was on average 5.4 Å (Fig. 5B), significantly lower than the RMSD (6.8 Å) reported for the non-complexed *h*PTP1B<sub>1-400</sub> [13]. These results combined with an analysis of the root-mean-square-fluctuation (RMSF, Fig. 5C) of residues involved in the C-terminal domain of *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, indicate that xanthoepocin (**1**) decreases the overall dynamics of the system, in contrast with ursolic acid, which significantly increases it [13]. Furthermore, close inspection of amino acids involved in the binding pocket of **1** with *h*PTP1B<sub>1-400</sub> over the trajectory (Fig. 5E), particularly Pro<sub>180</sub> and Phe<sub>182</sub>, show that xanthoepocin (**1**) significantly affects the dynamics and function of the WPD loop, locking it in a closed conformation (Fig. 5D). The molecular interactions involve the establishment of intramolecular hydrogen bonds and salt bridges ( $\sim 1.8$  Å) between the side chains of Asp<sub>181</sub> and Arg<sub>221</sub> (residues involved in the catalytic triad), which are typically 2.9 and 4.2 Å away in the *apo*-close (active form) conformation of the enzyme (PDB entry 1SUG, Fig. 5F). Interestingly, the allosteric modulation of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> by **1** is associated with changes in the dynamics and large-scale conformational movements of the WPD-loop and the intrinsically disordered C-terminal domain.

Based on MD results, we hypothesize that the allosteric modulation of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> by **1** is driven by its interaction with Pro<sub>180</sub> and Phe<sub>182</sub>, disabling the CH- $\pi$  switch (involving Pro<sub>185</sub>) [5], next favoring the formation of hydrogen bonds and salt bridges between Asp<sub>181</sub> and Arg<sub>221</sub>, and locking the WPD loop in a close conformation, as when bonded to a competitive inhibitor such as TCS401 [25], resulting on disabling recognition, binding, and substrate release, as well as catalysis.



**Fig. 4.** (A) Structural model of the complex xanthoepocin (**1**)-*h*PTP1B<sub>1-400</sub> (yellow sticks). 3D representation of the interaction of the complex xanthoepocin (**1**)-*h*PTP1B<sub>1-400</sub>. Graphics generated with PyMol.



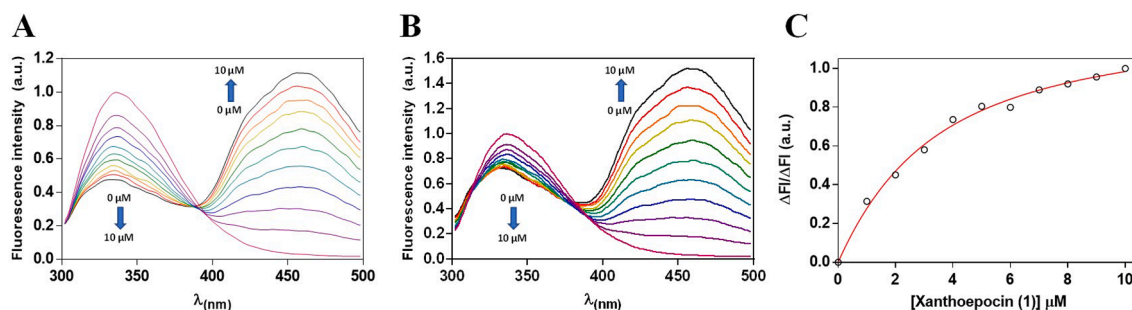
**Fig. 5.** (A) Energy profile of the 1-*hPTP1B*<sub>1-400</sub> complex over 50 ns simulation. (B) RMSD of 1-*hPTP1B*<sub>1-400</sub> (navy), 1-*hPTP1B*<sub>1-300</sub> (black), and 1-*hPTP1B*<sub>301-400</sub> (red). (C) Root-mean-square-fluctuation (RMSF) values for the backbone atoms are shown as a function of residue number. The RMSF values for *hPTP1B*<sub>1-400</sub>, 1-*hPTP1B*<sub>1-400</sub>, and UA-*hPTP1B*<sub>1-400</sub> are shown in navy, green, and red. (E and F) PTP and WPD loops of the 1-*hPTP1B*<sub>1-400</sub> complex throughout 50 ns trajectory. The figure displays the hydrogen bond interactions established between Asp<sub>181</sub> and Arg<sub>221</sub> along the trajectory. (D) Proposed allosteric inhibition mechanism of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> by 1. Xanthoepocin (1) induces dynamic and large-scale conformational changes by locking the WPD loop in a closed conformation and increasing its dynamics, avoiding substrate recognition, binding, catalysis, and substrate release. Panel E shows the average distance between Asp<sub>181</sub> and Arg<sub>221</sub> at 0, 20, 30, 40, and 50 ns (gray, pink, purple, cyan, and orange, respectively). Panel F shows the average distance between Asp<sub>181</sub> and Arg<sub>221</sub> in the *apo*-close conformation of a truncated PTP1B model (PDB: 1SUG). All models were generated with PyMol.

### 2.5. Steady-state quenching fluorescence experiments of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> with xanthoepocin (1)

To confirm xanthoepocin (1) interaction with *hPTP1B*<sub>1-400</sub> and support the results from molecular docking and dynamics studies, quenching fluorescence experiments were carried out [26,27]. Titration of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> with cumulative concentrations of 1 quenched the protein's intrinsic fluorescence *via* a static mechanism [28,29], meaning that the fluorophore (tryptophans in *hPTP1B*<sub>1-400</sub>) and 1 form a non-fluorescent complex in the ground state, which increases its population at growing concentrations of xanthoepocin (1) [28]. The calculated Stern-Volmer constant ( $K_{SV}$ ) for 1 was determined to be  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , two orders of magnitude higher than that obtained for ursolic acid ( $K_{SV} = 4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ), also a static quencher of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> (Supporting

Information, Figure S12). These outcomes illustrate that 1 induces larger scale conformational changes than ursolic acid, and interfere with the PTP and WPD loops dynamics, resulting in inhibition of the catalytic activity of *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

Remarkably, xanthoepocin (1) displayed a substantial inner filter effect by absorbing energy at the excitation and emission wavelengths (280, 300–400 nm), subsequently decreasing the energy reaching the intrinsic fluorophores within the protein and the fluorescence intensity of the 1-*hPTP1B*<sub>1-400</sub> complex [26,30,31]. The corrected and uncorrected emission spectra (Fig. 6A and 6B, respectively) of the complex show that the fluorescence quenching is substantially lower after the filter inner effect correction, reducing it from 53.2% to 28.8% [26,27,30]. The calculated affinity constant ( $k_a$ ) for the complex upon the correction was  $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (Fig. 6C). Thus far, xanthoepocin (1) is the fungal



**Fig. 6.** (A) Fluorescence spectra of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> (0.5  $\mu\text{M}$ ) with increasing concentrations of xanthoepocin (1) (0–10  $\mu\text{M}$ ) before inner effect correction. (B) Fluorescence spectra of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> (0.5  $\mu\text{M}$ ) with increasing concentrations of xanthoepocin (1) (0–10  $\mu\text{M}$ ) upon inner filter effect correction. (C) Titration curve of *hPTP1B*<sub>1-400</sub> (0.5  $\mu\text{M}$ ) with increasing concentrations of xanthoepocin (1) (0–10  $\mu\text{M}$ ) after inner effect correction. Samples were excited at 280 nm, and the emission spectra were recorded from 300 to 500 nm. The maximal fluorescence emission changes were corrected for light scattering and plotted against the total concentration of protein. The red line comes from fitting the data to the binding model (Eq. (3)) to obtain the  $k_a$  ( $1/k_d$ ). Experiments were carried out in HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, and DTT 1.5 mM at pH 6.8.

metabolite with stronger affinity towards the full-length PTP1B. Its magnitude is comparable with those reported for trodusquemine, an aminosterol that binds to the protein with stoichiometry 2:1 (ligand–protein), and affinity constants of  $3.3 \times 10^6$ , and  $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [11], and one order of magnitude higher than that of ursolic acid  $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  [16].

## 2.6. In silico ADME predictions

Assessment of pharmacokinetics (absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME)) and drug-likeness properties of new drug candidates in the early stages of the discovery process is mandatory [32]. However, most of the time, the availability of sample to determine such parameters is limited. In this scenario, computational tools offer an alternative to achieve these goals [32]. Accordingly, to predict the physicochemical properties, pharmacokinetics, drug-likeness, and medicinal chemistry friendliness of xanthoepocin (**1**), the SwissADME free web tool (<http://www.swissadme.ch/>) was used [32]. Unfortunately, compound **1** was predicted to have poor ADME properties, as it is not a good candidate to be orally bioavailable and absorbable through the gastrointestinal tract. Furthermore, the size and polarity of **1** violate either the Lipinski [33], Ghose [34], Veber [35], Egan [36] or Muegge [37] rules.

To probe the accessibility of the monomeric unit of xanthoepocin (**1a**) its ADME and drug-likeness properties were predicted. Notably, the monomer exhibits better properties than **1**. For example, **1a** is projected to be an available oral drug candidate with a bioavailability score of 0.55. Furthermore, **1a** is forecasted to be absorbed in the gastrointestinal tract and to have worthy drug-likeness properties. Moreover, from the point of view of toxicological properties, **1a** does not inhibit the main cytochromes of the P450 superfamily, which play an essential role in drug metabolism. Remarkably, **1a** is structurally related to rubrofusarin B, a naphtho- $\gamma$ -pyrone that exhibits strong PTP1B inhibitory activity ( $\text{IC}_{50} = 6.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ) [38]. All predicted values for compounds **1**, **1a**, and rubrofusarin B are provided in the Supporting Information file.

## 3. Conclusion

Chemical investigation of the bioactive extract of *Penicillium* sp. IQ-429 led to the isolation of xanthoepocin (**1**). The absolute configuration of **1** was established comparing its experimental and calculated ECD spectra and corroborated using DP4 + statistical analysis. Xanthoepocin (**1**) inhibited the phosphatase activity of *h*PTP1B<sub>1-400</sub> *in vitro*, with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $8.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$ . The putative binding site of **1** with the enzyme was established by molecular docking and dynamics, which predicted that this molecule mainly interacts with residues of the C-terminal domain and Pro<sub>180</sub> and Phe<sub>182</sub>. Molecular dynamics indicated that compound **1** modifies the PTP and WPD loops' dynamics, suggesting an allosteric inhibition triggered by large-scale conformational changes. Fluorescence quenching experiments confirmed that xanthoepocin (**1**) binds to *h*PTP1B<sub>1-400</sub> and quenches its intrinsic fluorescence by a static mechanism, inducing conformational changes that translate into the inhibition of the phosphatase activity of the enzyme. Furthermore, xanthoepocin (**1**) was determined to be the fungal metabolite with the highest binding affinity to *h*PTP1B<sub>1-400</sub> reported hitherto.

Moreover, we suggest that xanthoepocin (**1**) inhibits *h*PTP1B<sub>1-400</sub> *via* different allosteric inhibition mechanism that targets the C-terminal domain of the full-length PTP1B, and disables the WPD loop dynamics in the *apo-h*PTP1B<sub>1-400</sub>.

## 4. Experimental section

### 4.1. General experimental procedures

NMR experiments were conducted in  $\text{CDCl}_3$ . NMR instrumentation was a Bruker Ascend III 700 MHz NMR spectrometer equipped with a

cryoprobe, operating at 700 MHz for  $^1\text{H}$  and 175 MHz for  $^{13}\text{C}$ , or a Bruker Avance III 400 MHz. Chemical shifts are reported in ppm and are referenced to the residual solvent resonances ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  7.26/77.16 ppm for  $\text{CDCl}_3$ ). HRESIMS data were obtained in a Thermo QExactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) coupled to a Waters Acquity Ultraperformance Liquid Chromatography (UPLC) system (Waters Corp.). Optical rotation was measured on a Perkin-Elmer 323 polarimeter. The UV spectra was recorded on a Shimadzu UV 160U spectrophotometer. HPLC separations were performed using a Waters system (2535 quaternary pump) connected to a 2707 autosampler and a 2998 PDA detector [13,14]. Data acquisition and analysis were made with the Empower 3 software (Waters). Flash column chromatography was carried out on a Buchi C-605-C-605-C-610 system. Analytical and semipreparative HPLC were performed on Gemini-NX 5  $\mu\text{m}$  particle size  $\text{C}_{18}$  columns ( $4.6 \times 250 \text{ mm}$ , and  $10.0 \times 250 \text{ mm}$  for analytical and semipreparative runs, respectively; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

### 4.2. Fungal strain isolation and molecular identification

IQ-429 was isolated from a semi-desert soil sample collected in San Luis Potosí, Mexico. The strain IQ-429 was identified using the sequence of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions of the rDNA. ITS regions were amplified using the primers ITS1 (5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3') by PCR [39,40]. Final concentrations for 25  $\mu\text{L}$  PCR reactions were as follows: 10 ng of fungal genomic DNA, 0.8  $\mu\text{M}$  of each primer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 U of Taq polymerase, and 1  $\times$  Taq polymerase buffer (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil). The reaction conditions were 94  $^\circ\text{C}$  for 10 min; 35 cycles of 45 s at 94  $^\circ\text{C}$ , 45 s at 58  $^\circ\text{C}$ , and 60 s at 72  $^\circ\text{C}$ ; and a final extension at 72  $^\circ\text{C}$  for 10 min. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and sequenced in an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the ITS1 primer.

The sequence from ITS regions of the fungal isolate IQ-429 was compared with the GenBank library using BLAST search [41]. A collection of taxonomically related sequences was obtained from the National Center for Biotechnology Information Taxonomy Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>). DNA sequences were aligned using CLUSTAL X [42], edited and confirmed visually in BIOEDIT [43]. Maximum likelihood analyses were performed using PhyML (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>) [44]. The automatic model selection (SMS) using Akaike Information Criterion was completed to select the best substitution model for the sequences [45]. The GTR + I model ( $I = 0.797$  for the proportion of invariant sites;  $A = 0.20$ ,  $C = 0.29$ ,  $G = 0.27$ ,  $T = 0.24$ ) was selected for the tree search. The confidence at each node was assessed by 1000 bootstrap replicates. *Haplographium penicillioides* was used as an outgroup. The sequence of ITS regions from the fungal isolate IQ-429 was deposited in the GenBank database under the accession number MW561669.

### 4.3. Fermentation, extraction, and isolation

A starting culture of the fungal strain IQ-429 was grown on potato-dextrose-agar (PDA). Then, the mycelium transferred into potato-dextrose-broth (PDB, 15 mL  $\times$  8), and incubated for seven days at rt with agitation at 100 rpm. Each starting culture was then moved into an E-flask (250 mL) containing 12 g of autoclaved cereal [46]. All flasks were incubated at rt for 28 days. To the large scale, solid fermentation of IQ-429, 500 mL of 1:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH mixture was added and shaken for 24 h at 100 rpm [13,14,47]. Next, the solution was filtered, and 750 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  were added to a final volume of 2 L. The mixture was stirred for 30 min and partitioned in a separatory funnel. The bottom layer was drawn off and evaporated to dryness. The solid was resuspended in 300 mL of 1:1 MeOH- $\text{CH}_3\text{CN}$  mixture and partitioned with 300 mL of hexane in a separatory funnel. The MeOH- $\text{CH}_3\text{CN}$  layer was

evaporated to dryness [47]. The extract (3.0 g) was adsorbed onto a minimal amount of silica gel. This material was fractionated by flash chromatography, using 25 g of silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel), and a gradient solvent system of hexane-EtOAc 100:0 → 0:100, to afford nine fractions (F<sub>1</sub>-F<sub>9</sub>). Fraction 7 (16 mg) was subsequently resolved by semi-preparative HPLC, using an isocratic elution system of 65:35 MeOH in H<sub>2</sub>O, both with 0.1% formic acid at a flow rate of 4.6 mL/min. This procedure afforded 3.0 mg of xanthoepocin (**1**).

**Xanthoepocin (1).**  $[\alpha]_D^{25} = -13.8$  ( $c = 0.0016$ , acetone). UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 246 (4.22), 270 (3.97), 281 (3.80), 306 (3.41), 393 (3.46). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 700 MHz)  $\delta$ : 11.92 (2H, s, 10-OH, 10'-OH) 7.52, (2H, s, H-5, H-5'), 6.38 (2H, s, H-4, H-4'), 5.47 (2H, s, H-9, H-9'), 4.43 (2H, s, 9-OH, 9'-OH), 3.80 (6H, s, 7-OMe, 7'-OMe), 2.33 (6H, s, 3-Me, 3'-Me). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz)  $\delta$ : 188.3 (C-6, C-6'), 166.6 (C-1, C-1'), 160.7 (C-10, C-10'), 155.5 (C-3, C-3'), 137.5 (C-4a, C-4a'), 134.8 (C-5a, C-5a'), 124.7 (C-9a, C-9a'), 114.2 (C-5, C-5'), 109.0 (C-10a, C-10a'), 104.7 (C-4, C-4'), 83.0 (C-7, C-7'), 68.1 (C-8, C-8'), 62.7 (C-9, C-9'), 57.2 (7-OMe, 7'-OMe), 19.6 (3-Me, 3'-Me); HR-ESI-MS,  $m/z$  605.0942 [M-H]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>30</sub>H<sub>21</sub>O<sub>14</sub>, 605.0937).

#### 4.4. hPTP1B<sub>1-400</sub>, expression, and purification

*Homo sapiens* wild-type PTP1B (hPTP1B<sub>1-400</sub>, residues 1–400) was obtained as previously reported. Briefly, hPTP1B<sub>1-400</sub> gene containing an N-terminal 6 × His tag was cloned into a pET28 vector. The plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain and grown using LB media. Protein expression was induced using 1 mM IPTG at 20 °C for 16 h. Purification of hPTP1B<sub>1-400</sub> was carried out following the procedure previously described by Jiménez-Arreola, et al. 2020 [13]. Shortly, cells were resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 2 mM TCEP) and sonicated in an ice bath (4 °C). Lysates were then centrifuged and purified using affinity chromatography, by 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM imidazole and 1.5 mM DTT, with subsequent buffer exchange using 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1.5 mM DTT. The protein was used immediately or stored at –20 °C in 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, and 4% glycerol [13,14].

#### 4.5. hPTP1B<sub>1-400</sub> inhibition assay

Xanthoepocin (**1**) and ursolic acid (positive control) were dissolved in DMSO. Aliquots of 0–10  $\mu$ L of testing materials (in triplicate) were incubated for 10 min with 5  $\mu$ L of enzyme stock solution (3  $\mu$ M) in 50 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT. After incubation, 10  $\mu$ L of the substrate (pNPP 30 mM, Sigma-Aldrich) was added and incubated for 20 min at 37 °C, and the absorbance at 405 nm was determined. All assays were performed in a final volume of 100  $\mu$ L. The IC<sub>50</sub> values were calculated by regression analysis using Eq. (1), with GraphPad Prism [14].

$$\%Inh = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^S} \quad (1)$$

#### 4.6. Kinetic studies

The inhibition mode of **1** over the activity of hPTP1B<sub>1-400</sub> was determined using multiple inhibitor and substrate concentrations. The corresponding inhibition constant ( $k_i$ ) value was calculated by a non-linear regression analysis (GraphPad Prism 6.0 software) using Eq. (2) [13].

$$v = \frac{V_{\max}S}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + S \left(1 + \frac{[I]}{a k_i}\right)} \quad (2)$$

where  $v$  is the velocity of the reaction,  $V_{\max}$  is the maximum velocity;  $S$  and  $I$  are the substrate and inhibitor concentrations, respectively;  $K_M$  is the Michaelis constant;  $k_i$  is the competitive inhibition constant, and  $a k_i$  is the non-competitive inhibition constant. Doble reciprocal plots (Lineweaver-Burk) were performed to visualize the mode of inhibition of compound **1** towards hPTP1B<sub>1-400</sub>.

#### 4.7. Computational details

##### 4.7.1. ECD and chemical shifts calculations

Compound **1** was built and geometry optimized with a PM3 semi-empirical method, as implemented in Spartan'10. Conformational analysis was performed using the same software and force field. Conformers were manually checked and filtered for redundancy. The conformers were geometrically optimized and minimized with Gaussian 09 under a DFT force field at the B3LYP/DGDZVP level of theory for ECD, or B3LYP/6-31G(d) for NMR calculations [16].

ECD calculations in MeOH solution were carried out using a TD-SCF force field at the B3LYP/6-31G(d), with the default solvent model. The computed excitation energy (nm) and rotatory strength ( $R$ ) in dipole velocity ( $R_{vel}$ ) form were simulated into an ECD curve with Eq. (3) as implemented in SpecDis [48,49]. Where  $E_k$  and  $R_k$  are the transition energy and rotatory strength of the  $k^{\text{th}}$  electronic transition, respectively, and  $\sigma$  is the exponential half-width.

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \frac{1}{2.296 \times 10^{-39}} \times \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \sum_k E_{0k} R_{0k} e \left[ - \left\{ \frac{E - E_{0k}}{\sigma} \right\}^2 \right] \quad (3)$$

The NMR shielding constants of **1** in CHCl<sub>3</sub> were calculated with the GIAO method at the B3LYP/6-31G(d) level of theory, using the PCM solvent model [20]. The experimental and calculated data were analyzed by the DP4 + probability method.

All calculations were performed on the HP Cluster Platform 3000SL "Miztli," a parallel supercomputer with a Linux operating system containing 25,312 cores and a total of 15,000 GB of RAM.

**4.7.1.1. Proteins and ligands.** Polar hydrogens and charges (Kollman) were assigned to the homologated model for hPTP1B<sub>1-400</sub> using AutoDockTools (ADT) 1.5.6. The files were saved in an appropriate format for their use in AutoGrid 4.0 and AutoDock 4.0 interfaces. Xanthoepocin (**1**) was built and preliminary energy-optimized using Spartan'10 with a semi-empiric method (PM3). After that, the resulting model was optimized using DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory. The ligand was prepared in ADT 1.5.6 [14].

**4.7.1.2. Molecular docking.** Simulations were performed using AutoDock 4.0 with a previously validated protocol. Initially, a blind docking was performed with the validated model. The protein interface was used as the first ligand binding position in a grid box with dimensions of 126 × 126 × 126 Å. Docking simulations were performed with Lamarckian Genetic Algorithm calculations of 100 runs. The obtained poses were then analyzed using ADT 1.5.6 using cluster analysis and PyMOL [14].

**4.7.1.3. Molecular dynamics simulations.** MD simulation was carried out with the AMBER 16 suite of MD with the FF14SB force field [50,51]. The coordinates of the homology model generated for hPTP1B<sub>1-400</sub> and the coordinates for **1** obtained from docking studies were processed with Antechamber, to generate the topologies suitable for the LEaP module. Subsequently, LEaP was used to reduce, neutralize (by randomly adding 11Na<sup>+</sup> counterions) and include the system in a water-filled truncated octahedral box (TIP3P solvent model) with a leg on each side of 10 Å. The simulations were performed under periodic boundary conditions. Conjugate gradient minimization followed by NVT heating and NPT equilibration using Langevin dynamics were carried out to relax the structure and equilibrate the solvent. The MD production was run for 50 ns at 300 K. Frames were saved at four ps intervals for subsequent

analysis. RMSD and RMSF analyses were conducted with CPPTRAJ on the trajectory [52].

#### 4.8. Steady-state fluorescence quenching experiments

All measurements were carried out in an Agilent Cary Eclipse spectrometer with continuous stirring at 20 °C. A 0.5 μM hPTP1B<sub>1-400</sub> solution was incubated in buffer (50 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT) [14,16]. The sample was excited at 280 nm, and the emission recorded from 300 to 500 nm. The inner filter effect due to xanthoepocin (1) was corrected by treating the emission spectra according to Eq. (4). “Where  $F_{cor}$  and  $F_{obs}$  are the corrected and measured fluorescence intensities, respectively, and  $A_{ex}$  and  $A_{em}$  are the differences in the absorbance values of the sample upon the addition of the ligand at the excitation (280 nm) and emission (300–400 nm) wavelengths, respectively.” [30]

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{\frac{(A_{ex} + A_{em})}{2}} \quad (4)$$

The  $k_a$  for the 1-hPTP1B<sub>1-400</sub> complex was obtained by non-linear regression utilizing Eq. (5), where  $F$  is the measured fluorescence, and  $F_0$  and  $F_c$  are the fluorescence in the absence of the ligand and fully saturated.  $[P]_t$  and  $[L]_t$  are the total protein and total ligand concentration, and  $k_d = (1/k_a)$  is the dissociation constant [30].

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t + [L]_t + k_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + k_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[P]_t} \quad (5)$$

#### Funding

This work was supported by a grant from DGAPA, PAPIIT, UNAM (IA203220), and CONACyT CF-2019-263977.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

We thank Dr. Beatriz Quiroz-García and Dr. María del Carmen García-González (Instituto de Química, UNAM) for the collection of spectroscopic and spectrometric data. Dr. Patricia Cano-Sánchez (Instituto de Química, UNAM) for her assistance in protein expression and purification. We are grateful to Dirección General de Computo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC, LANCAD-UNAM-DGTIC-374), UNAM, for providing the resources to carry out ECD, NMR-GIAO calculations, and molecular dynamics simulations through the Miztli System. This study made use of the instrumentation acquired through the BGSII-Q node. I. Y. M-A. would like to thank CONACyT for the fellowship provided to pursue graduate studies (CONACyT N° 620953).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105166>.

#### References

- [1] M. Feldhammer, N. Uetani, D. Miranda-Saavedra, M.L. Tremblay, PTP1B: A simple enzyme for a complex world, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48 (5) (2013) 430–445.
- [2] Q. Wang, X.-Q. Fu, Q.-C. Zheng, Exploring the allosteric mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B by molecular dynamics simulations, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38 (13) (2020) 4040–4047.
- [3] N.K. Tonks, PTP1B: From the sidelines to the front lines!, *FEBS Lett.* 546 (2003) 140–148.
- [4] S.K. Baskaran, N. Goswami, S. Selvaraj, V.S. Muthusamy, B.S. Lakshmi, Molecular dynamics approach to probe the allosteric inhibition of PTP1B by chlorogenic and cichoric Acid, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (8) (2012) 2004–2012.
- [5] M.S. Choy, Y. Li, L.E.S.F. Machado, M.B.A. Kunze, C.R. Connors, X. Wei, K. Lindorff-Larsen, R. Page, W. Peti, Conformational rigidity and protein dynamics at distinct timescales regulate PTP1B activity and allostery, *Mol. Cell* 65 (4) (2017) 644–658.e5.
- [6] B. Sharma, L. Xie, F. Yang, W. Wang, Q. Zhou, M. Xiang, S. Zhou, W. Lv, Y. Jia, L. Pokhrel, J. Shen, Q. Xiao, L. Gao, W. Deng, Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications, *Eur. J. Med. Chem.* 199 (2020) 112376.
- [7] C. Wiesmann, K.J. Barr, J. Kung, J. Zhu, D.A. Erlanson, W. Shen, B.J. Fahr, M. Zhong, L. Taylor, M. Randal, R.S. McDowell, S.K. Hansen, Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B, *Nat. Struct. Mol.* 11 (8) (2004) 730–737.
- [8] M.K. Hjortness, L. Riccardi, A. Hongdusit, A. Ruppe, M. Zhao, E.Y. Kim, P.H. Zwart, B. Sankaran, H. Arthanari, M.C. Sousa, M. De Vivo, J.M. Fox, Abietane-type diterpenoids inhibit protein tyrosine phosphatases by stabilizing an inactive enzyme conformation, *Biochemistry* 57 (40) (2018) 5886–5896.
- [9] A.K. Tamrakar, C.K. Maurya, A.K. Rai, PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011–2014), *Expert Opin. Therpat* 24 (10) (2014) 1101–1115.
- [10] B.T. Zhao, D.H. Nguyen, D.D. Le, J.S. Choi, B.S. Min, M.H. Woo, Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources, *Arch. Pharm. Res.* 41 (2) (2018) 130–161.
- [11] N. Krishnan, D. Koveal, D.H. Miller, B. Xue, S.D. Akshinthala, J. Kragelj, M. R. Jensen, C.-M. Gauss, R. Page, M. Blackledge, S.K. Muthuswamy, W. Peti, N. K. Tonks, Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor, *Nat. Chem. Biol.* 10 (7) (2014) 558–566.
- [12] M. Díaz-Rojas, H. Raja, M. González-Andrade, J. Rivera-Chávez, M. Rangel-Grimaldo, I. Rivero-Cruz, R. Mata, Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*, *Phytochemistry* 184 (2021) 112664.
- [13] B.S. Jiménez-Arreola, E. Aguilar-Ramírez, P. Cano-Sánchez, J. Morales-Jiménez, M. González-Andrade, J.L. Medina-Franco, J. Rivera-Chávez, Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B<sub>1-400</sub>: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies, *Bioorg. Chem.* 101 (2020) 103893.
- [14] J. Rivera-Chávez, D. Coporo-Blancas, J. Morales-Jiménez, One-step partial synthesis of (±)-asparteretone B and related hPTP1B<sub>1-400</sub> inhibitors from butyrolactone I, *Bioorg. Med. Chem.* 28 (24) (2020) 115817.
- [15] W. Zhang, D.i. Hong, Y. Zhou, Y. Zhang, Q. Shen, J.-y. Li, L.-H. Hu, J. Li, Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (10) (2006) 1505–1512.
- [16] J. Rivera-Chávez, C. Bustos-Brito, E. Aguilar-Ramírez, D. Martínez-Otero, L. D. Rosales-Vázquez, A. Dorazco-González, P. Cano-Sánchez, Hydroxy-neo-Clerodanes and 5,10-seco-neo-Clerodanes from *Salvia decora*, *J. Nat. Prod.* 83 (7) (2020) 2212–2220.
- [17] G.S. Kumar, R. Page, W. Peti, M. Massiah, The mode of action of the protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor Ertiprotafib, *PLoS One* 15 (10) (2020) e0240044.
- [18] Y. Igarashi, Y. Kuwamori, K. Takagi, T. Ando, R. Fudou, T. Furumai, T. Oki, Xanthoepocin, a new antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IFO5762, *J. Antibiot.* 53 (9) (2000) 928–933.
- [19] G. Pescitelli, T. Bruhn, Good computational practice in the assignment of absolute configurations by TDDFT calculations of ECD spectra, *Chirality* 28 (6) (2016) 466–474.
- [20] N. Grimblat, M.M. Zanardi, A.M. Sarotti, Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts, *J. Org. Chem.* 80 (24) (2015) 12526–12534.
- [21] M. Rangel-Grimaldo, M.L. Macías-Rubalcava, M. González-Andrade, H. Raja, M. Figueroa, R. Mata, α-Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*, *J. Nat. Prod.* 83 (3) (2020) 675–683.
- [22] M. Nazir, M. Saleem, I. Ali, G. Abbas, N.U. Rehman, I.R. Green, W. Hussain, S. Khan, H. Hussain, Fungal metabolites as anti-diabetic agents: emphasis on PTP1B inhibitors, *Phytochem. Rev.* 20 (1) (2021) 119–143.
- [23] G.A. Holdgate, T.D. Meek, R.L. Grimley, Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 17 (2) (2018) 115–132.
- [24] J. Strelow, W. Dewe, P.W. Iversen, H.B. Brooks, J.A. Radding, J. McGee, J. Weidner, S. Markossian, G.S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe, A. Arkin, D. Auld, C.P. Austin, J. Baell, J.M.M. Caaveiro, T.D.Y. Chung, N. P. Coussens, J.L. Dahlin, V. Devanaryan, T.L. Foley, M. Glicksman, M.D. Hall, J. V. Haas, S.R.J. Hoare, J. Inglese, P.W. Iversen, S.D. Kahl, S.C. Kales, S. Kirshner, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, O.J. Trask Jr., J. R. Weidner, M.J. Wildey, M. Xia, X. Xu. Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2004.
- [25] L.F. Iversen, H.S. Andersen, S. Branner, S.B. Mortensen, G.H. Peters, K. Norris, O. H. Olsen, C.B. Jeppesen, B.F. Lundt, W. Ripka, K.B. Møller, N.P.H. Møller, Structure-based design of a low molecular weight, nonphosphorus, nonpeptide, and highly selective inhibitor of protein-tyrosine phosphatase 1B\*, *J. Biol. Chem.* 275 (14) (2000) 10300–10307.
- [26] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer Science & Business Media, 2013.
- [27] S.M.D. Akbar, K. Sreeramulu, H.C. Sharma, Tryptophan fluorescence quenching as a binding assay to monitor protein conformation changes in the membrane of intact mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.* 48 (3) (2016) 241–247.

- [28] U. Alexiev, D.L. Farrens, Fluorescence spectroscopy of rhodopsins: Insights and approaches, *Biochim et Biophys Acta Bioenerg.* 1837 (5) (2014) 694–709.
- [29] L. Mátyus, J. Szöllösi, A. Jenei, Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 83 (2006) 223–236.
- [30] K.A. Bakar, S.R. Feroz, A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity, *Spectrochim. Acta A* 223 (2019) 117337.
- [31] A.V. Fonin, A.I. Sulatskaya, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, E.A. Permyakov, Fluorescence of dyes in Solutions with high absorbance, Inner filter effect correction, *PLOS ONE* 9 (7) (2014) e103878.
- [32] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42717.
- [33] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1-3) (1997) 3–25.
- [34] A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski, A Knowledge-Based Approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases, *J. Comb. Chem.* 1 (1) (1999) 55–68.
- [35] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (12) (2002) 2615–2623.
- [36] W.J. Egan, K.M. Merz, J.J. Baldwin, Prediction of drug absorption using multivariate statistics, *J. Med. Chem.* 43 (21) (2000) 3867–3877.
- [37] I. Muegge, S.L. Heald, D. Brittelli, Simple selection criteria for drug-like chemical matter, *J. Med. Chem.* 44 (12) (2001) 1841–1846.
- [38] D.-C. Kim, T. Minh Ha, J.H. Sohn, J.H. Yim, H. Oh, Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from a marine-derived fungal strain *Aspergillus* sp. SF-5929, *Nat. Prod. Res.* 34 (5) (2020) 675–682.
- [39] M. Gardes, T.D. Bruns, ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.* 2 (2) (1993) 113–118.
- [40] M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic press, 2012.
- [41] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [42] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4876–4882.
- [43] T. Hall, Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95–98.
- [44] S. Guindon, J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (2010) 307–321.
- [45] V. Lefort, J.E. Longueville, O.SMS Gascuel, Smart model selection in PhyML, *Mol. Biol. Evol.* 34 (2017) 2422–2424.
- [46] J. Rivera-Chávez, H.A. Raja, T.N. Graf, J.E. Burdette, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, Biosynthesis of fluorinated peptaibols using a site-directed building block incorporation approach, *J. Nat. Prod.* 80 (6) (2017) 1883–1892.
- [47] J. Rivera-Chávez, J. Zacatenco-Abarca, J. Morales-Jiménez, B. Martínez-Aviña, S. Hernández-Ortega, E. Aguilar-Ramírez, Cuautepestalorin, a 7,8-dihydrochromene–oxoisochromane adduct bearing a hexacyclic scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011, *Org. Lett.* 21 (10) (2019) 3558–3562.
- [48] J. Rivera-Chávez, M. Figueroa, M.C. González, E.A. Glenn, R. Mata,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from a *Xylaria feejeensis* associated with *Hintonia latiflora*, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 730–735.
- [49] T. Bruhn, A. Schaumlöffel, Y. Hemberger, G. Bringmann, SpecDis: Quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra, *Chirality* 25 (4) (2013) 243–249.
- [50] J.A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (8) (2015) 3696–3713.
- [51] R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker, An overview of the Amber biomolecular simulation package, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 3 (2) (2013) 198–210.
- [52] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (7) (2013) 3084–3095.

## **CAPÍTULO II**

**Diversidad química y taxonómica de ascomicetos de manglares para el descubrimiento de inhibidores de la *hPTPIB*<sub>1-400</sub> o del crecimiento de bacterias intrahospitalarias.**



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gráficos circulares representando la distribución taxonómica de los productos naturales de origen fúngico depositados en el DPN® ..... 78
- Figura 2.** Árbol filogenético a nivel de orden para los microorganismos productores de metabolitos secundarios. El árbol se construyó con secuencias de ADN de la subunidad ribosomal pequeña (SSU), a través de un análisis de máxima verosimilitud (100 réplicas) e incluye 80 de los 90 órdenes que contribuyen al espacio químico conocido producido por hongos..... 79
- Figura 3.** Ejemplos selectos de estructuras químicas de fármacos desarrollados o inspirados en PNs fúngicos..... 80
- Figura 4.** Representación gráfica del proceso de creación de una red molecular a partir de espectros de masas en tándem (espectros EM<sup>2</sup>) de metabolitos presentes en mezclas complejas. Tomado y editado de Aron, *et al.*<sup>39</sup> ..... 84
- Figura 5.** Número de nuevos PNs aislados en hongos de manglar anualmente durante treinta años. Tomado y editado de Devadatha, *et al.*<sup>54</sup> ..... 88
- Figura 6.** Distribución de metabolitos secundarios producidos por hongos de manglares. Tomado y editado de Devadatha, *et al.*<sup>54</sup> ..... 88
- Figura 7.** Ejemplos selectos de PNs aislados en hongos de manglar.<sup>54</sup> ..... 89
- Figura 8.** Lista de patógenos prioritarios para los cuales se necesitan el desarrollo de nuevos antibióticos. Tomado y editado de Walesch, *et al.*<sup>60</sup> \* Las enterobacteriaceas incluyen: *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* y *Providencia spp.*, *Morganella spp.*..... 92
- Figura 9.** Ubicación geográfica de la zona de muestreo. .... 95
- Figura 10.** A) *Scytalidium* sp. (IQ-074) cultivado en ADP y B) en cereal Cheerios®..... 98
- Figura 11.** A) Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF del extracto de *Scytalidium* sp. (IQ-074C). B) continuación del sistema de elución..... 99
- Figura 12.** Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF de la fracción primaria 01002-144-2. .... 100
- Figura 13.** Cromatograma (235 nm) por CLAE en modo semipreparativo de la fracción 01002-149-2..... 100
- Figura 14.** Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF de la fracción primaria 01002-144-7. .... 102
- Figura 15.** Cromatograma (213 nm) por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-147-8..... 102
- Figura 16.** Cromatograma (222 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo semipreparativo de la fracción secundaria 01002-147-9. .... 103



<b>Figura 17.</b> Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF de la fracción primaria 01002-144-8. ....	104
<b>Figura 18.</b> Cromatograma (206 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo semipreparativo de la fracción secundaria 01002-152-5. ....	104
<b>Figura 19.</b> A) <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053) cultivado en ADP y B) en arroz. ....	105
<b>Figura 20.</b> Cromatograma (280 nm) obtenido del fraccionamiento por CF en fase normal del extracto de <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053). ....	106
<b>Figura 21.</b> Cromatograma (254 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-4. ....	107
<b>Figura 22.</b> Cromatograma (235 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-5. ....	107
<b>Figura 23.</b> Cromatograma (254 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-6. ....	107
<b>Figura 24.</b> Cromatograma (254 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-7. ....	108
<b>Figura 25.</b> Árbol circular de máxima parsimonia (1000 pseudoreplicas de bootstrap) de la región ITS de los aislamientos fúngicos de las cepas aisladas. La secuencia ITS de <i>Geoglossum sphagnophilum</i> se usó como grupo externo. Las etiquetas de colores describen a los hongos a nivel de orden. El árbol fue editado con el servidor web Tree of Life (iTOL). <sup>70</sup> Se muestran fotografías selectas de los microorganismos correspondientes a cada orden taxonómico. ....	116
<b>Figura 26.</b> A) Incidencia taxonómica de ordenes identificados en manglares de la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz (expresados como porcentaje del total [43]). B) Relación del número de cepas fúngicas aisladas por género. ....	119
<b>Figura 27.</b> Redes moleculares de 83 extractos de la colección de hongos cultivados en medios sólidos de arroz y cereal Cheerios® generados a partir de datos de EM <sup>2</sup> en GNPS y usando el algoritmo MolNetEnhancer. ....	121
<b>Figura 28.</b> Estructuras químicas de los compuestos identificados presuntivamente utilizando la herramienta web GNPS. ....	125
<b>Figura 29.</b> Ejemplos selectos de redes moleculares (RMs) con los respectivos compuestos fúngicos identificados presuntivamente utilizando la plataforma web GNPS. ....	127
<b>Figura 30.</b> Redes moleculares clásicas de 83 extractos de la colección de hongos cultivados en medios sólidos de arroz y cereal Cheerios® generados en GNPS a partir de datos de EM <sup>2</sup> , las RMs fueron clasificadas de acuerdo con su clase taxonómica. ....	128
<b>Figura 31.</b> Análisis de mapa de calor de la actividad biológica de los extractos fúngicos (20 µg/mL) contra la hPTPIB <sub>1-400</sub> . Cada celda coloreada del mapa corresponde al porcentaje de actividad de cada extracto. Las letras R y C indican el medio de cultivo del cual se deriva	

el extracto fúngico, arroz y cereal Cheerios®, respectivamente. El gráfico se realizó en el programa OriginPro 2023b. .... 130

**Figura 32.** Análisis de conglomerados jerárquico con mapa de calor de la actividad biológica de los extractos fúngicos (200 µg/mL) contra bacterias de aislamiento hospitalario. Cada celda coloreada del mapa corresponde al porcentaje de actividad de cada extracto. La técnica de agrupamiento utilizada fue el método de Ward utilizando una escala de distancia euclidiana. El gráfico se realizó en el programa OriginPro 2023b. .... 131



**Figura 33.** Gráfico circular que esquematiza la incidencia de PNs reportados en los géneros fúngicos aislados en este estudio de acuerdo con las bases de datos NP Atlas<sup>122</sup> y DPN®. .... 134

**Figura 34.** Estructura química de los compuestos aislados de *Scytalidium sp* (IQ-074).. 135



**Figura 35.** Correlaciones de HMBC (  ) y COSY (  ) del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21**)..... 136

**Figura 36.** A) Comparación entre los espectros de DCE experimentales (línea roja) y calculados (línea azul) para una mezcla 1:1 de los diastereoisómeros 4R6S7R (**21a**) y 4S6S7R (**21b**). Las líneas discontinuas verde y rosa representan los espectros de DCE calculados para **21a** y **21b**, respectivamente. B) Estructuras optimizadas (DFT-B3LYP/6-31G\*) para los compuestos **21a** y **21b**. .... 138

**Figura 37.** A) Correlaciones espectroscópicas bidimensionales (HMBC, NOE y COSY) claves para el compuesto **22**. B) Rotámero de los centros asimétricos C-4 y C-5, esquematizando las correlaciones NOE..... 140

**Figura 38.** Correlaciones claves de HMBC (  ) y COSY (  ) del scytalpoliol B (**23**). .... 142

**Figura 39.** Derivatización de scytalpoliol A (**22**) con *p*-bromoanilina..... 143

**Figura 40.** Correlaciones de HMBC (  ) y COSY (  ) del scytalminol A (**26**). .... 144

**Figura 41.** Redes moleculares del extracto orgánico de *Scytalidium sp*. (IQ-074)..... 144

**Figura 42.** Compuestos aislados del extracto orgánico del cultivo sólido en arroz de *Diaporthe sp*. (IQ-053)..... 145

**Figura 43.** Redes moleculares del extracto orgánico de *Diaporthe sp*. (IQ-053). Todos los nodos anotados representan el ion de la molécula protonada [M + H]<sup>+</sup>. .... 146

**Figura 44.** A) Curva concentración-respuesta de scytalpoliol B (**23**) y B) scytalminol A (**26**) frente a *h*PTPI B<sub>1-400</sub>. Los datos corresponden a tres experimentos independientes..... 147

**Figura 45.** Inhibición del crecimiento de las bacterias A) *S. aureus* y B) *S. epidermidis* 42R por la citosporona B (0.1 a 100 µg/mL). Los valores corresponden a tres experimentos independientes. Las líneas verticales indican los valores de CMI determinados por la función Gompertz modificada. .... 149

**Figura 46.** Comparación estructural de tres policétidos aislados de *Diaporthe sp*. (IQ-053). A medida que la cadena lateral se vuelve más hidrofóbica, el compuesto experimenta una

mejora significativa en su actividad como inhibidor del crecimiento bacteriano en las cepas de estudio..... 150

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Sistemas de elución utilizados en la purificación de los compuestos aislados de <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053).....	106
<b>Tabla 2.</b> Lista de hongos aislados del manglar ubicado en la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz, México.....	115
<b>Tabla 3.</b> Lista de hongos aislados de muestras de manglar de la Laguna de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México. ....	117
<b>Tabla 4.</b> Relación de compuestos desreplicados usando GNPS.....	122
<b>Tabla 5.</b> Datos espectroscópicos de RMN registrados en CDCl <sub>3</sub> <sup>1</sup> H (700 MHz) y <sup>13</sup> C (175 MHz), para los diastereómeros del ácido 7-desoxipapiracílico A ( <b>21a</b> y <b>21b</b> ).....	137
<b>Tabla 6.</b> Datos espectroscópicos de RMN <sup>13</sup> C para los compuestos <b>22</b> , <b>23</b> , <b>24</b> , <b>25</b> y <b>26</b> . .....	140
<b>Tabla 7.</b> Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H para los compuestos <b>22</b> , <b>23</b> , <b>24</b> , <b>25</b> y <b>26</b> . .....	141
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios aislados de <i>Scytalidium</i> sp. (IQ-074) frente a la enzima hPTPIB <sub>1-400</sub> . ....	147
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de <i>Diaporthe</i> sp. (IQ-053).....	148

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
Acetona- $d_6$	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APD	Agar papa dextrosa
ARN	Ácido ribonucleico
BGC	Clúster de genes biosintéticos
brt	Triplete ancho
CF	Cromatografía tipo FLASH
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
C	Carbono
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
$CH_2Cl_2$	Cloruro de metileno
$CI_{50}$	Concentración inhibitoria cincuenta
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
Da	Dalton
DAD	Detector de arreglo de diodos
DART	Direct Analysis in Real Time (Espectrometría de masas mediante Análisis Directo en Tiempo Real)
DCE	Dicroísmo circular electrónico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPN®	Diccionario de productos naturales
EM	Espectrometría de masas
$EM^2$	Espectrometría de masas en tándem
EM-AR	Espectrometría de masas de alta resolución
EM-AR-DART	Espectrometría de masas de alta resolución utilizando DART como modo de ionización
EtOH	Etanol

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ESKAPE	Acrónimo para patógenos de interés clínico: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y especies de <i>Enterobacter</i> .
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Gramos
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
<i>h</i> PTPIB <sub>1-400</sub>	Proteína tirosina fosfatasa IB de cadena completa de humano
H	Hidrógeno
Hex	Hexano
Hz	Hertz
H <sub>2</sub> O	Agua
IDSA	Infectious Diseases Society of America (Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América)
ITS	Región espaciadora interna transcrita
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
IDH	Índice de deficiencia de hidrógenos
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i> (Una cepa, muchos compuestos)
PN	Producto natural
ppm	Partes por millón
q	Señal cuádruple

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
RM	Red molecular
qd	Cuarteto de dobles
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RO	Rotación óptica
SST3	Sistema de Secreción Tipo 3
SSU	Subunidad ribosomal pequeña
t	Señal triple
td	Triplete de dobles
s	Señal simple
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Espectroscopia de ultravioleta
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda_{\max}$	Longitud de onda máxima
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{M}$	Micromolar



## I. ANTECEDENTES

### I.1 Distribución taxonómica de PNs (productos naturales) de origen fúngico

Desde el punto de vista filogenético, el reino fúngico es uno de los más diversos del árbol de la vida. Estimaciones indican que existen entre 2.2 y 3.8 millones de especies que se encuentran desempeñando funciones vitales tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos.<sup>1</sup> Sin embargo, sólo se han identificado cerca de 150,000 especies fúngicas, una pequeña fracción del total estimado.<sup>2</sup> La diversidad taxonómica de estos microorganismos se distribuye en 200 órdenes, clasificados en 12 filos que se agrupan en seis principales grupos: el subreino Dikarya que incluye a los filos Ascomycota, Basidiomycota y Entorrhizomycota; el subreino Chytridiomyceta que incluye los filos Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, y Neocallimastigomycota; los filos Mucoromycota, Zoopagomycota, y Blastocladiomycota y el grupo Opisthosporidia que incluye los filos Aphelidiomycota, Cryptomycota/Rozellomycota y Microsporidia.<sup>3</sup>

Los hongos representan una fuente potencial para el descubrimiento de entidades químicas con aplicación en diversas áreas de la ciencia, tales como la medicina, la química y la biología, por tan solo mencionar algunas. El reino Fungi es considerado como uno de los mayores productores de metabolitos secundarios o metabolitos especializados. Desde un punto de vista químico, los hongos son capaces de producir terpenoides, alcaloides, productos naturales aromáticos, péptidos no ribosomales, benzofuranoides, derivados de carbohidratos, compuestos policíclicos, y en general policétidos. Esta diversidad química se ve reflejada en el abanico de propiedades farmacológicas desplegadas por estas moléculas.

En este sentido, con la finalidad de tener un panorama sobre la distribución taxonómica de los productos naturales (PNs) producidos por este recurso natural, se realizó un análisis de los PNs de origen fúngico encontrados en el Diccionario de Productos Naturales® (DPN) hasta noviembre de 2020. En la revisión se analizaron 17,742 PNs, sin embargo, 1,099 no fueron identificados en ningún grupo taxonómico, razón por la cual sólo fueron consideradas 16643 moléculas. Los resultados se analizaron en gráficos circulares. Como se muestra en la **Figura 1**, el 77.4% de los productos reportados pertenecen al filo Ascomycota, 22.1% al Basidiomycota y tan sólo un 0.5% a los Mucoromycota y Zoopagomycota. Dentro del filo Ascomycota, el subfilo Pezizomycotina es el más grande

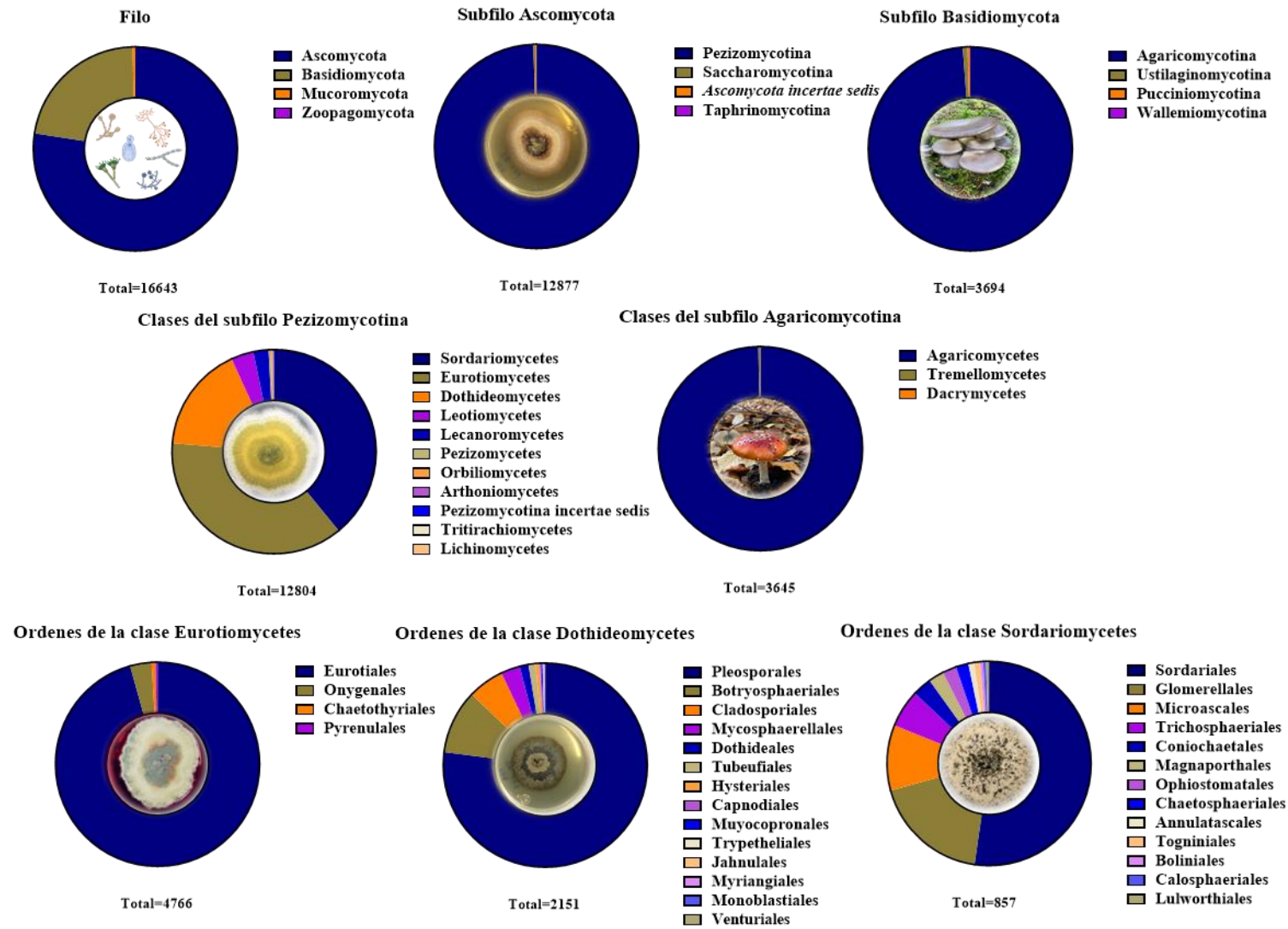
productores de metabolitos fúngicos; siendo las clases Eurotiomycetes, Sordariomycetes y Dothideomycetes las más prolíficas; de estas clases, en los órdenes Eurotiales, Hipocreales y Pleosporales se han reportado la mayor cantidad de PNs. En relación con el filo Basidiomycota, el subfilo con mayores reportes de PNs en el DPN es el Agaricomycotina; dentro de éste, el orden Agaricomycetes es el más prolífero. Finalmente, en la **Figura 2** se muestra un análisis de la filogenia de los hongos productores de metabolitos secundarios.

## 1.2 Metabolitos fúngicos de importancia médica

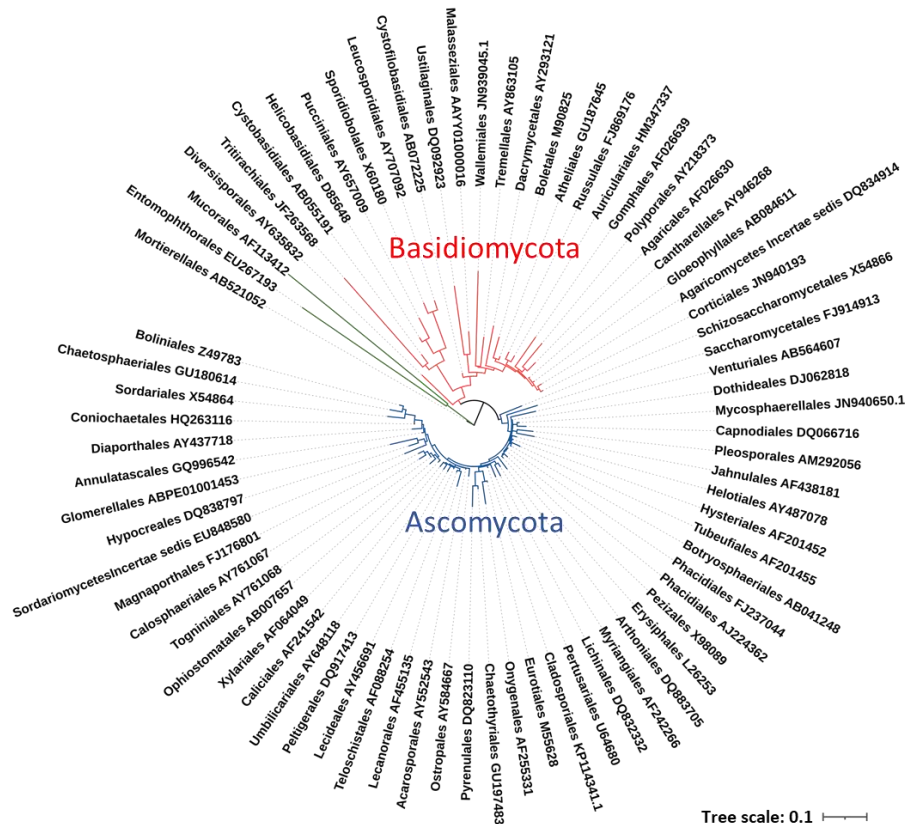
Los hongos son productores de una amplia gama de moléculas orgánicas que presentan propiedades similares a los de fármacos aprobados por la FDA; tienen menos de cinco donadores y menos de diez aceptores de enlaces de hidrogeno, además, su peso molecular es en promedio inferior a 500 uma, cumpliendo así con tres de las propiedades indicadas en las “Reglas de Lipinski” usadas para predecir la disponibilidad oral de un fármaco.<sup>4, 5</sup> De esta manera, los hongos filamentosos han aportado al cuidado de la salud humana fármacos (**Figura 3**) como la penicilina G, el primer antibiótico  $\beta$ -lactámico de amplio espectro, aislado del microorganismo *Penicillium rubens*.<sup>6</sup> De este PN se derivó como un producto de semisíntesis, la amoxicilina, que junto con el ácido clavulánico (metabolito secundario aislado en especies de *Actinomyces*) son un exitoso medicamento usado para tratar infecciones bacterianas.<sup>7</sup> Otro grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos desarrollado gracias a los ascomicetos son los análogos de cefalosporina, de los cuales existen varias generaciones, cada una con una actividad antibiótica mejorada.<sup>8</sup> Un tercer antibiótico producido por hongos es el esteroide ácido fusídico, compuesto producido por el hongo *Fusidium coccineum* y usado clínicamente para tratar infecciones ocasionadas por bacterias grampositivas.<sup>9</sup>

Otros ejemplos de fármacos desarrollados o inspirados por PNs de origen fúngico son: la ergotamina, un vasoconstrictor utilizado para tratar la migraña, aislado de *Claviceps purpurea*;<sup>10</sup> la ciclosporina A, un inmunosupresor, utilizado en los trasplantes de órganos para superar los riesgos de rechazo por el huésped, descrito por primera vez en *Tolyocladium inflatum*;<sup>11, 12</sup> la estatina, lovastatina (mevinolina) aislada de *Aspergillus terreus*, usado clínicamente como hipocolesterolemizante;<sup>13</sup> el antifúngico caspofungina, un derivado semisintético de la neumocandina B<sub>0</sub>, aislado del hongo *Glarea lozoyensis*;<sup>14</sup> y el último

fármaco aprobado por la FDA (fingolimod) hasta el momento es inspirado en la miriocina, un metabolito aislado de *Isaria sinclairii*.<sup>15</sup>

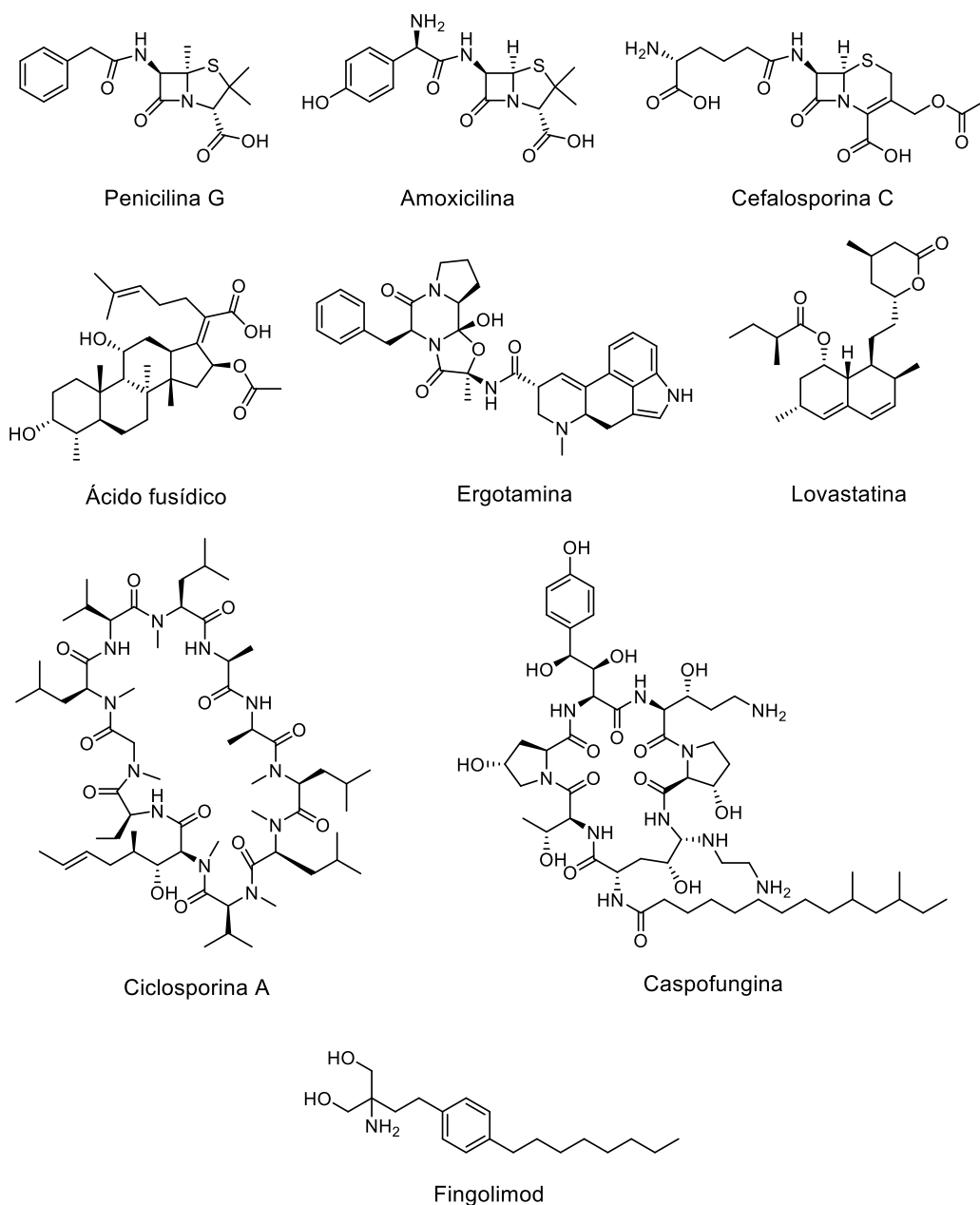


**Figura I.** Gráficos circulares representando la distribución taxonómica de los productos naturales de origen fúngico depositados en el DPN®.



**Figura 2.** Árbol filogenético a nivel de orden para los microorganismos productores de metabolitos secundarios. El árbol se construyó con secuencias de ADN de la subunidad ribosomal pequeña (SSU), a través de un análisis de máxima verosimilitud (100 réplicas) e incluye 80 de los 90 órdenes que contribuyen al espacio químico conocido producido por hongos.

Aunado a que los ascomicetos representan una fuente notable para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, el espacio químico fúngico conocido es significativamente inferior en comparación con el potencial biosintético que poseen. Lo anterior de acuerdo a un análisis de 1,037 genomas fúngicos, donde se identificaron 37,000 grupos de genes biosintéticos (BGC; agrupación de genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios) que no han sido relacionado con sus metabolitos codificados (PNs desconocidos).<sup>4, 16</sup> Adicionalmente, los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos presentan una diversidad estructural compleja.<sup>17</sup> Siguiendo este orden de ideas, los hongos filamentosos son un recurso valioso para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas.



**Figura 3.** Ejemplos selectos de estructuras químicas de fármacos desarrollados o inspirados en PNs fúngicos.

### 1.3 Nuevas estrategias para el descubrimiento de PNs (productos naturales)

Tradicionalmente, el descubrimiento de PNs se ha realizado mediante ensayos bio-dirigidos; metodología que consiste en la evaluación biológica del extracto y las fracciones derivadas del mismo para dirigir el aislamiento de PNs bioactivos.<sup>18</sup> Este enfoque ha conducido al descubrimiento de fármacos valiosos como el taxol, artemisina, ciclosporina A, penicilinas, cefalosporinas, por mencionar algunos.<sup>19-21</sup> Sin embargo, a pesar del éxito

obtenido con esta metodología, en los últimos años la tasa elevada en el redescubrimiento de PNs ha representado un desafío en esta área. No obstante, la implementación de nuevas estrategias junto con el desarrollo tecnológico está cambiando este panorama.

En el caso particular de los productos naturales (PNs) de origen microbiano, el escenario actual para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas incluye: la metodología “*One Strain Many Compounds*” (OSMAC), término establecido por Zeck y colaboradores, la cual consiste en alterar sistemáticamente las condiciones prácticas de cultivo, con el objetivo de incrementar el número de PNs producidos por una cepa microbiana;<sup>22</sup> la activación o expresión de BGCs silenciados mediante la adición de modificadores epigenéticos a los cultivos fúngicos y co-cultivos hongo-hongo o a través de ingeniería genética realizando la expresión heteróloga de los BGCs;<sup>23, 24</sup> las ciencias ómicas como la genómica (y la minería genómica), metabolómica y metabologenómica,<sup>17, 18, 25</sup> y las estrategias multi-informativas que incluyen datos de metabolómica, taxonomía y de actividad biológica.<sup>26, 27</sup>

En los microorganismos productores de metabolitos secundarios, la genómica estudia los perfiles genotípicos de microbios para identificar sus BGCs y escrudiñar su potencial biosintético global. La minería genómica se basa en la predicción de BGCs que no han sido caracterizados previamente, el análisis de enzimas codificadas por estos clústeres y en la identificación experimental de los metabolitos secundarios codificados por esos BGCs.<sup>28, 29</sup> Con esta información, las herramientas bioinformáticas actuales pueden ayudar a priorizar el estudio de BGCs que podrían codificar nuevos esqueletos químicos, metodología conocida como desreplicación; que se basa en reconocer y excluir de estudios posteriores las muestras que contienen o codifican (en el caso de estudios genómicos) moléculas conocidas.<sup>4, 18</sup> En la actualidad existen plataformas de acceso público que permiten realizar este tipo de estudios, por ejemplo; AntiSMASH, BAGEL, PRISM, RiPPER y TOUCAN, estas herramientas son útiles para el análisis de un solo genoma.<sup>30</sup> Asimismo, se han desarrollado herramientas que permiten el análisis de grupos de genomas, como BiG-SCAPE y CORASON.<sup>31</sup>

Mientras que las herramientas genómicas proporcionan información sobre el potencial biosintético de los microorganismos, la metabolómica es una lectura directa de la

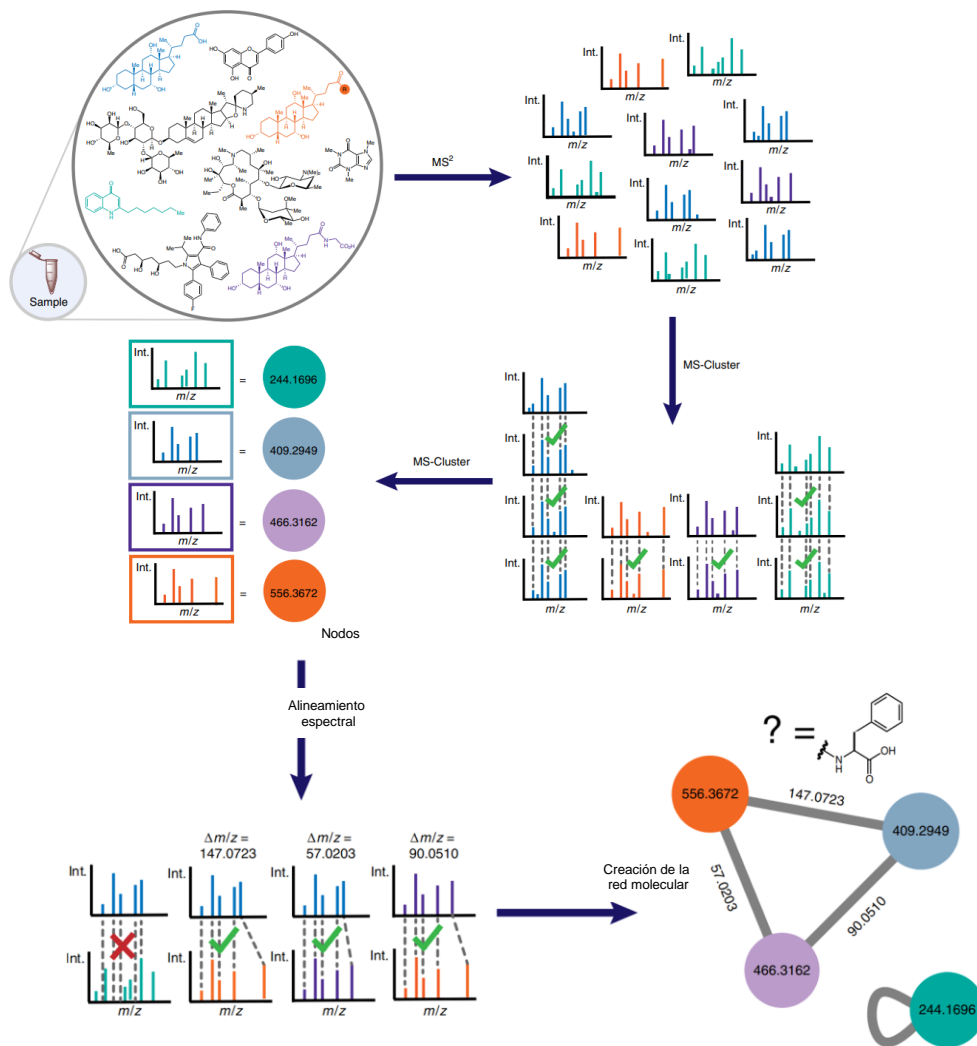
función del sistema, mediante el estudio exhaustivo de los metabolitos secundarios que son expresados. A través de estos análisis se identifican y/o cuantifican moléculas pequeñas producidas por un sistema biológico en un momento específico, analizable mediante la técnica analítica elegida.<sup>32-35</sup> Estos estudios se clasifican en dos categorías; la metabolómica dirigida y no dirigida, la primera se basa en el análisis de grupos definidos de metabolitos conocidos, mientras que los estudios no dirigidos analizan de manera exhaustiva todos los PNs en una muestra, incluidos los compuestos desconocidos.<sup>36</sup> Las herramientas analíticas más utilizadas en estos estudios son la espectrometría de masas (EM) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN).<sup>18</sup> Entre estas dos, la EM es la herramienta más usada y presenta ventajas en comparación con la RMN por ejemplo: sensibilidad, el volumen de muestra utilizado es pequeño y la posibilidad de acoplamiento con una técnica cromatográfica.<sup>32</sup> Además, cuando se realizan análisis de fragmentación en tándem (espectros de fragmentación; EM<sup>2</sup>) se obtiene información útil para la elucidación estructural y anotación (identificación) mediante la comparación de los espectros obtenidos con aquellos depositados en bases de datos.<sup>37</sup>

Los estudios de metabolómica proporcionan información sobre la composición química de mezclas complejas, ayudando así a priorizar el aislamiento de PNs, acelerar la desrepleción y anotar análogos desconocidos.<sup>18</sup> En este sentido, la plataforma de redes moleculares “Global Natural Products Social Molecular Networking” (GNPS), se presenta como una herramienta valiosa para el descubrimiento de nuevos metabolitos.<sup>37, 38</sup> GNPS es una infraestructura interactiva en línea, se utiliza para el análisis y curación de datos de espectrometría de masas en tándem (EM<sup>2</sup>). Su objetivo es proporcionar el máximo conocimiento químico posible de un conjunto de datos de EM<sup>2</sup> y conectarlos con las preguntas biológicas del usuario, se puede alimentar con un solo dato o un set de datos derivados de experimentos de cromatografía líquida o cromatografía de gases acoplados a espectrómetros de masas.<sup>39</sup> La base de esta plataforma es la creación de redes moleculares (MN, por sus siglas en inglés), un enfoque computacional que organiza los espectros EM<sup>2</sup> en función de la similitud espectral, a partir de la cual se hacen inferencias de la relación de los analitos como grupos de moléculas estructuralmente relacionadas.<sup>37</sup> Lo cual mejora la eficiencia de la desrepleción al permitir la anotación de isómeros y análogos de un metabolito dado en un clúster.<sup>40</sup>



El protocolo general para la creación de las redes moleculares en GNPS inicia con la obtención de los espectros  $EM^2$  de las moléculas ionizables de la muestra.<sup>39</sup> Los espectros  $EM^2$  se alinean de acuerdo con su similitud espectral, usando el algoritmo MS-Cluster (que agrupa espectros  $EM^2$  casi idénticos en un único espectro consenso, éstos contienen la misma relación  $m/z$  del ion molecular). Después, los espectros idénticos se integran en un solo nodo o en un grupo consenso.<sup>41</sup> Posteriormente, se lleva a cabo otro alineamiento espectral para buscar espectros similares, incluso cuando las masas de los iones moleculares no son idénticas. Las moléculas estructuralmente relacionadas producen espectros  $EM^2$  similares y se representan mediante nodos separados que se conectan en una red a través de líneas. A continuación, cada nodo se compara con bibliotecas espectrales para anotar las moléculas conocidas dentro de las redes moleculares (RM). En la **Figura 4** se muestra esquemáticamente el proceso descrito anteriormente. De modo ilustrativo, el nodo azul y púrpura están formados por espectros  $EM^2$  de los ácidos cólico ( $m/z$  409.2949) y glicocólico ( $m/z$  466.3162), respectivamente, el nodo naranja corresponde a una molécula desconocida, sin embargo, tiene una diferencia de masa de 147.0723 Da en comparación con el ácido cólico. La diferencia coincide con la masa de un residuo de fenilalanina, por lo tanto, se puede inferir que se trata de un conjugado de fenilalanina del ácido cólico. En último lugar, el nodo turquesa que no se encuentra en una RM ( $m/z$  244,1696) se atribuye a una molécula única en el extracto.<sup>39</sup>

Continuando con las estrategias para el descubrimiento de PNs de origen microbiano, la más actual es la metabologenómica, término introducido oficialmente en 2016. Esta metodología describe las correlaciones entre BGCs y PNs mediante el análisis conjunto de los resultados de minería genómica y los de metabolómica.<sup>25, 38</sup> Los análisis metabologenómicos han ayudado al descubrimiento de PNs novedosos en bacterias.<sup>29</sup> Sin embargo, en hongos, este enfoque se encuentra en sus inicios.<sup>17</sup> Recientemente se ha puesto en marcha una iniciativa que busca facilitar la implementación de esta estrategia, la Paired Omics Data Platform, la cual tiene como objetivo vincular sistemáticamente los datos genómicos y metabolómicos en un formato legible por una computadora.<sup>42</sup>



**Figura 4.** Representación gráfica del proceso de creación de una red molecular a partir de espectros de masas en tándem (espectros EM<sup>2</sup>) de metabolitos presentes en mezclas complejas. Tomado y editado de Aron, *et al.*<sup>39</sup>

Consecutivamente, las estrategias multi-informativas que integran información química, biológica y taxonómica se han mostrado prometedoras para priorizar el descubriendo de nuevos PNs biactivos.<sup>26, 27</sup> Un enfoque presentado por Olivon y colaboradores propone el uso de RM masivas que incorporan varios niveles de información (bioactividad y datos taxonómicos) para generar mapas moleculares multi-informativos, que permitan guiar inteligentemente el aislamiento de PNs nuevos y bioactivos a partir de extractos.<sup>26</sup> Esta metodología necesita la intervención del usuario. No obstante, actualmente, se ha desarrollado la plataforma NP Analyst, una herramienta web que integra

esta información de forma automatizada, sin embargo, no considera los datos taxonómicos.<sup>43</sup>

#### **1.4 Hongos de manglares**

Cuando se realizan estudios de biosprospección de microorganismos para buscar aquellos que tengan el potencial de producir PNs con importancia farmacéutica, un punto importante a tomar en cuenta es el lugar de muestreo. Para este propósito, se considera como sitios idóneos, zonas que presentan condiciones climáticas extremas, paisajes inusuales y los nichos ecológicos que se encuentra en ubicaciones geográficas particulares que dan lugar a que los microorganismos que lo habiten se encuentren sujetos a presiones adaptativas.<sup>44</sup> En este sentido, los bosques de manglares, constituidos por: mangles (especies vegetales arbóreas o arbustivas tolerantes a la sal que crecen en regiones tropicales y subtropicales, en la interfaz entre la tierra y el mar), animales, microorganismos asociados y factores abióticos; representan un nicho ecológico único, ya que se desarrollan en condiciones ambientales particulares como altas temperaturas, suelo lodoso anaeróbico, mareas periódicas que dan lugar a factores ambientales cambiantes como la salinidad y la disposición de nutrientes, fuertes vientos, además, están influenciados por agua dulce provenientes del escurrimiento de ríos, arroyos y afluentes de agua subterránea.<sup>45, 46</sup>

Los manglares se ubican a lo largo de costas, lagunas de aguas poco profundas, estuarios y ríos; crecen principalmente en sustratos blandos y fangosos.<sup>47</sup> Se distribuyen a lo largo del ecuador, abarcando los océanos Atlántico, Índico y Pacífico. Los países con mayor superficie de manglar a nivel mundial son en orden decreciente; Indonesia, Brasil, Australia y México. Particularmente, en nuestro país este importante ecosistema ocupa una extensión de 905,086 hectáreas, que se distribuye en 17 estados y corresponde al 6.7% de la cobertura global de manglares.<sup>46</sup> De las 80 especies de mangles conocidas, en México sólo se cuenta con el registro de seis y una variedad; *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Avicennia germinans* (mangle negro), *Conocarpus erectus* (mangle botoncillo), *Conocarpus erectus var. sericeus*, *Laguncularia racemosa* (mangle blanco), *Avicennia bicolor* y *Rhizophora harrisonii* (las dos últimas especies sólo se han registrado en las costas de Chiapas).<sup>46, 48, 49</sup>

Inmersos en las condiciones ecológicas altamente cambiantes de los manglares, se ha desarrollado una comunidad microbiana activa; constituida en su gran mayoría por

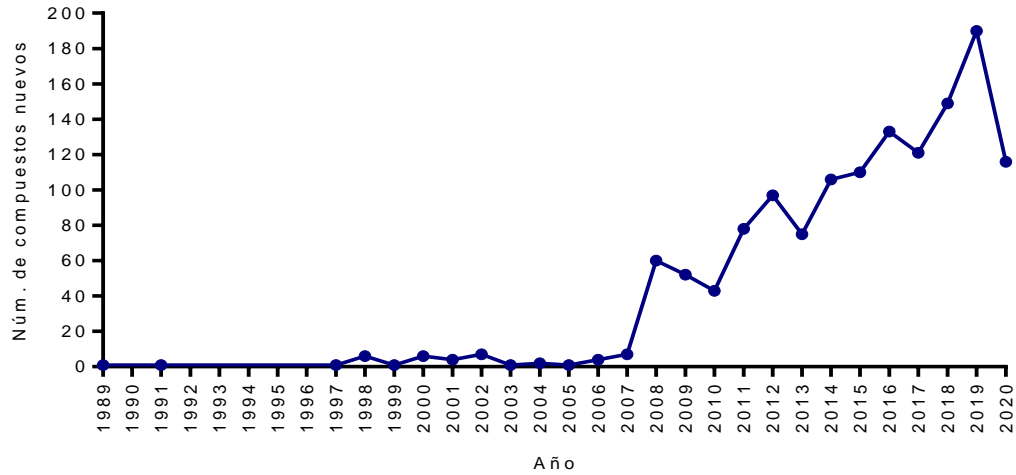
hongos y bacterias (91%) y por una pequeña población de algas (7%) y protozoos (2%).<sup>50</sup> En relación con las especies fúngicas que lo habitan, este ecosistema tiene la peculiaridad de albergar hongos marinos y terrestres. Los primeros se encuentran en los neumatóforos y en el sedimento, mientras que las hojas y frutos hospedan hongos terrestres.<sup>51, 52</sup> Además, debido a que cada parte del mangle desempeña funciones distintas (por ejemplo, los neumatóforos permiten el intercambio gaseoso en el sedimento anaeróbico, los frutos son estructuras reproductivas y las hojas son el sitio de la fotosíntesis), se espera una comunidad fúngica diferente en cada estructura.<sup>52</sup>

Los hongos de manglares se conocen desde 1920, cuando se describió el aislamiento de *Anthostomella rhizomorphae* (Ktz.) aislada en *Rhizophora mangle*.<sup>53</sup> No obstante, el estudio de estos microorganismos ha tenido su mayor auge en los últimos 25 años.<sup>54</sup> De acuerdo con una revisión realizada por Devadatha y colaboradores, se han identificado 850 hongos de manglar entre los años 1950 y 2020.<sup>54</sup> Este conjunto de microorganismos ha sido aislado de diferentes sustratos como: algas, corales, animales muertos, madera a la deriva, hojas vivas y en descomposición, raíces y ramas sumergidas, madera de manglar, suelo o sedimentos y agua.<sup>54</sup> Taxonómicamente, estos hongos fueron clasificados en 413 géneros que pertenecen a 161 familias agrupadas en 68 órdenes y en 17 clases. En orden superior, el filo Ascomycota lidera el número de aislamientos, representando el 90.9% (773 especies) de los taxones listados, secundado por una minoría de 6.8% (58 especies) de Basidiomycetes, mientras que los filos menos representados son en orden decreciente; Mucoromycota (1.5%), Chytridiomycota (0.6) y Blastocladiomycota (0.1%). Dentro del filo dominante (Ascomycota), las clases que contienen el mayor número de géneros son los Sordariomycetes albergando el 39.6% de los hongos de manglares, los Dothideomycetes son la segunda clase más numerosa, con un 23.6% de las especies, seguido de los Eurotiomycetes (10.8%), entre otros. De estos grupos, los órdenes más especiosos fueron los Pleosporales, con 133 especies, seguido por los Microascales (101), Eurotiales (87), Hypocreales (60) y Xylariales (54). Mientras que los géneros más especiosos fueron *Aspergillus* con el mayor número de especies reportadas (53), seguido de *Penicillium*, *Corollospora*, *Talaromyces* y *Trichoderma*, por mencionar los principales.

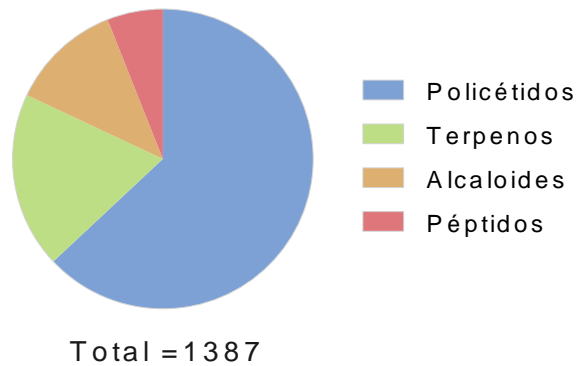
#### **1.4.1 Productos naturales (PNs) de hongos de manglares**

Debido a las condiciones ambientales particulares en que se desarrollan los manglares, la comunidad microbiana que habita en ellos desarrolla mecanismo de adaptación mediante la expresión de rutas metabólicas que resultan en la biosíntesis de metabolitos funcionales diversos y estructuralmente únicos, que podrían utilizarse en el descubrimiento de nuevos fármacos.<sup>55, 56</sup> El estudio de la química de estos microorganismos ha sido el objetivo de muchos grupos de investigación alrededor del mundo. Hasta finales del 2020 se habían descrito al menos 1387 PNs en hongos de manglares (hongos endófitos derivados de muestras de mangles y hongos ambientales aislados de muestras de suelo, sedimentos, agua de mar y madera a la deriva). El descubrimiento de nuevos PNs en hongos de manglares entró en una etapa de rápido crecimiento a partir del 2008 (**Figura 5**).<sup>54</sup>

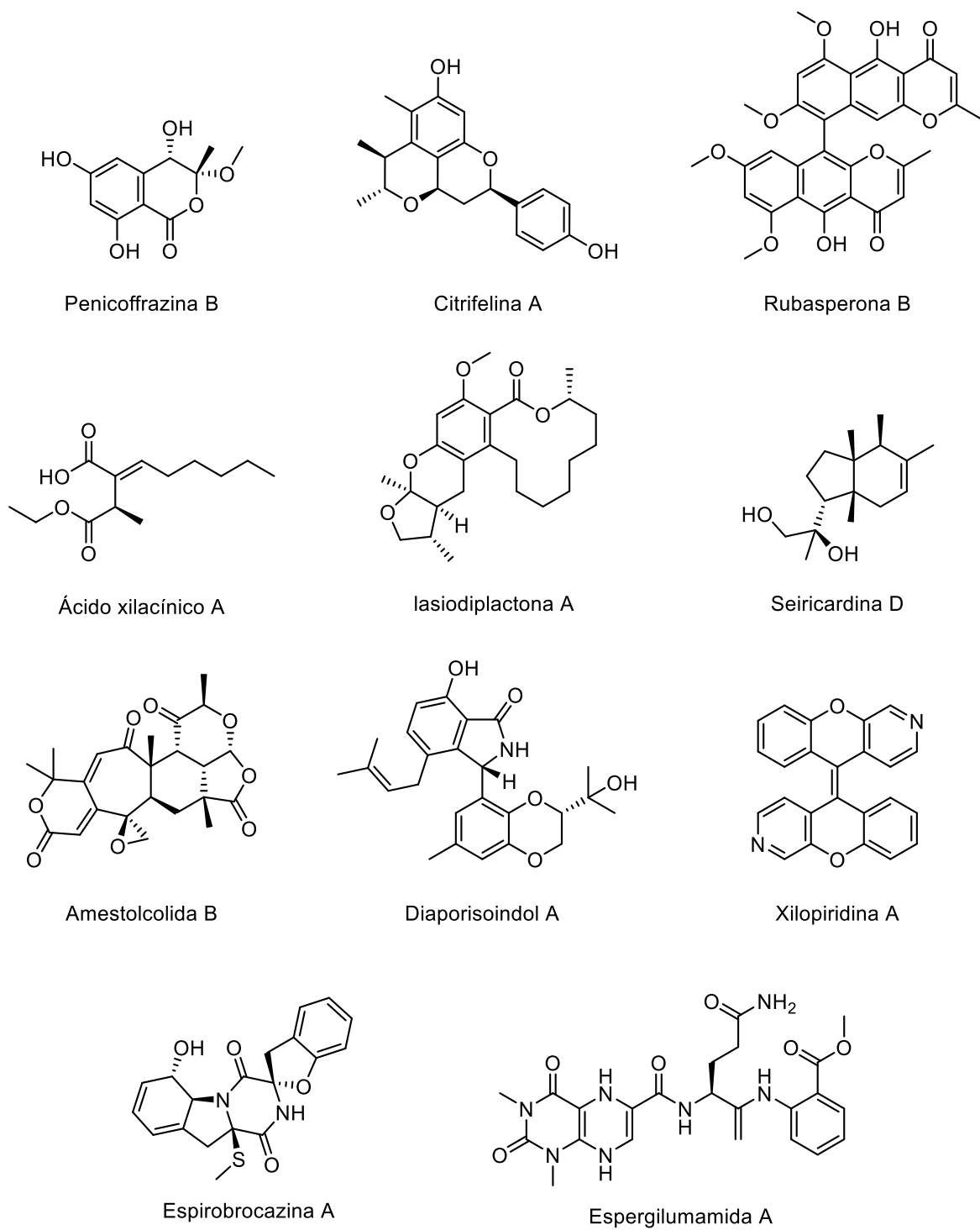
La diversidad estructural de los metabolitos secundarios producidos por los hongos de manglares se divide en cuatro grupos de acuerdo con sus rutas metabólicas: policétidos (63%), terpenos (19%), alcaloides (12%) y péptidos (6%) (**Figura 6**). Dentro de los policétidos que se han aislado en estos microorganismos se encuentran las siguientes clases estructurales: azafilonas, cumarinas e isocumarinas, cromonas, ácidos grasos, lactonas, xantonas y benzofenonas, quinonas y naftalenos, fenoles y ácidos fenólicos, entre otros. Los terpenos aislados se agrupan en: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, meroterpenos y esteroides. Los alcaloides aislados pertenecen a los siguientes grupos estructurales: citocalasinas, indoles e isoindoles, piridinas, pirroles y pirrolidinas, quinazolinas, quinolinas e isoquinolinas, entre otros. Los péptidos se agrupan en cíclicos, lineales y dicetopiperazinas, entre otros.<sup>54</sup> En la **Figura 7** se muestran ejemplos selectos de los PNs aislados en hongos de manglar.



**Figura 5.** Número de nuevos PNs aislados en hongos de manglar anualmente durante treinta años. Tomado y editado de Devadatha, *et al.*<sup>54</sup>



**Figura 6.** Distribución de metabolitos secundarios producidos por hongos de manglares. Tomado y editado de Devadatha, *et al.*<sup>54</sup>



**Figura 7.** Ejemplos selectos de PNs aislados en hongos de manglar.<sup>54</sup>

Las cepas fúngicas de manglares de donde se han obtenido la mayor cantidad de nuevos PNs son: *Penicillium* (283), *Aspergillus* (246) y *Pestalotiopsis* (88), con más del 45% del total de moléculas reportadas. Un 33% de los PNs nuevos fueron producidos por los siguientes géneros: *Phomopsis* (70), *Diaporthe* (55), *Fusarium* (50), *Cladosporium* (36), *Xylaria* (29), *Trichoderma* (25), *Talaromyces* (25), *Pseudolagarobasidium* (23), *Daldinia* (22), *Eurotium* (21), *Alternaria* (19), *Pseudopestalotiopsis* (18), *Acremonium* (17), *Rhytidhysterium* (17), *Phoma* (16), *Stemphylium* (15), *Hypoxyton* (14) y *Epicoccum* (14). Consecutivamente, un 16% de PNs fueron reportados en 49 géneros fúngicos adicionales y el 6% restante en cepas no identificadas.<sup>54</sup>

En relación a las propiedades farmacológicas de los PNs de hongos de manglar, 530 metabolitos han mostrado tener una amplia gama de actividades como: citotóxicos (196), antibacterianos (122), inhibidores de enzimas (81), antiinflamatorios (41), antioxidantes (27), antifúngicos (25), tóxicos letales (22), antivirales (18), e insecticidas (17), entre otras.<sup>54</sup>

### **1.5 Problemas de salud pública**

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la resistencia a los antibióticos son dos problemas de salud pública que comprometen la salud pública del siglo XXI y que requieren atención inmediata.<sup>57, 58</sup> Por ello, es necesario establecer campañas de prevención y buscar nuevos agentes terapéuticos que ayuden a hacer frente a estos padecimientos. En este trabajo, se aborda la búsqueda de moléculas en ascomicetos que puedan servir como nuevos antidiabéticos o antibióticos (según sea el caso). Para cumplir este propósito se estudiaron dos dianas terapéuticas: la Proteína Tirosina Fosfatasa IB (*hPTPIB<sub>1-400</sub>*), un regulador negativo de la vía de señalización de la insulina que se ha posicionado como uno de los blancos moleculares promisorios en la búsqueda de moléculas útiles para el tratamiento de la DMT2 y las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Staphylococcus epidermidis* 42R, y gramnegativas *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* A564 aisladas en ambientes intrahospitalarios; con excepción de *S. epidermidis* 42R, estas bacterias son consideradas como blancos prioritarios en la búsqueda de nuevos antibióticos.<sup>59, 60</sup>



### **1.5.1 Generalidades de la hPTPIB<sub>1-400</sub>**

La información sobre la hPTPIB<sub>1-400</sub> se presentó en los antecedentes del primer capítulo de este documento.

### **1.5.2 Resistencia a los antimicrobianos (RAM)-ESKAPE**

Los fármacos antimicrobianos son medicamentos activos contra una serie de infecciones, como las causadas por bacterias (antibióticos), virus (antivirales), hongos (antifúngicos) y parásitos (incluidos los antimaláricos).<sup>58</sup> No obstante, en los últimos años, la eficacia de estos medicamentos se ha visto comprometida por el aumento de patógenos resistentes a los antimicrobianos (RAM), fenómeno que surge cuando los microorganismos sobreviven a la exposición de un medicamento que normalmente los mataría o detendría su crecimiento, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones y favorece la propagación de la infección cuando existe un potencial de transmisión.<sup>58, 61</sup>

De acuerdo con una estimación realizada por Jim O’Neill en 2016, se predijo que para el año 2050 el número de muertes asociadas a la RAM será de 10 millones, liderando de esta manera el número de muertes asociadas con un problema de salud.<sup>58</sup> Sin embargo, si no se toman medidas adecuadas, este número podría incrementar alarmantemente, considerando que de acuerdo con un estudio reciente, la RAM ocasionó 4.95 de defunciones en 2019; 1.27 millones fueron atribuidas a la resistencia bacteriana.<sup>62</sup> En nuestro mundo interconectado, la RAM no tiene fronteras, afecta a todas las zonas y poblaciones, con consecuencias críticas en los países de ingresos bajos y medios, los cuales de acuerdo a las estimaciones previstas para el 2050 representarán el 80% de los 10 millones de defunciones estimadas.<sup>61</sup>

Dentro de la RAM, el inminente potencial de las bacterias en el desarrollo de mecanismos de resistencia sumado al poco avance farmacéutico en la creación nuevas clases de antibióticos representan dos graves problemas que deben ser atendidos de inmediato.<sup>63</sup> En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció oficialmente a la RAM como un problema de salud mundial y publicó una lista con los patógenos prioritarios en la búsqueda de nuevos antibióticos (**Figura 8**); clasificando el nivel de prioridad como “crítico”, “alto” y “medio”. Este listado contiene patógenos que desempeñan un papel

fundamental en las infecciones intrahospitalarias que presentan un desarrollo de resistencia crítico y para las cuales los tratamientos disponibles son limitados.<sup>60</sup> La categoría "prioridad crítica" y "prioridad alta" incluyen patógenos gramnegativos y grampositivos del grupo ESKAPE, acrónimo establecido por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, por sus siglas en inglés) para destacar las bacterias que causan la mayoría de las infecciones hospitalarias estadounidenses y "escapan" eficazmente a los efectos de los fármacos antibacterianos. Este conjunto de bacterias está compuesto por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*.<sup>64</sup>

Prioridad crítica	Prioridad alta	Prioridad media
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Resistente a carbapenémicos)	<i>Enterococcus faecium</i> (Resistente a vancomicina)	<i>Haemophilus influenzae</i> (Resistente a ampicilina)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Resistente a carbapenémicos)	<i>Helicobacter pylori</i> (Resistente a claritromicina)	<i>Shigella</i> spp. (Resistente a fluoroquinolona)
* <i>Enterobacteriaceae</i> (Resistente a carbapenémicos y a cefalosporinas de 3ra generación)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Resistente a metilicina y carbapenémicos)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (No susceptible a penicilina)
	<i>Campylobacter</i> spp. (Resistente a fluoroquinolona)	
	<i>Salmonella</i> spp. (Resistente a fluoroquinolona)	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Resistente a cefalosporinas de 3ra. generación y a fluoroquinolona)	

**Figura 8.** Lista de patógenos prioritarios para los cuales se necesitan el desarrollo de nuevos antibióticos. Tomado y editado de Walesch, et al.<sup>60</sup> \* Las enterobacteriaceas incluyen: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp. y *Providencia* spp., *Morganella* spp.

De acuerdo con un análisis sistemático realizado por Murray y colaboradores, el listado de patógenos prioritarios publicado por la OMS está faltó de información debido a la ausencia de una evaluación global exhaustiva.<sup>62</sup> De acuerdo con sus estimaciones, la tuberculosis multirresistente y *Escherichia coli* resistente a las fluoroquinolonas deberían ser incluidas en esta lista, ya que en 2019 estas bacterias fueron responsables de un número significativo de defunciones relacionadas con la resistencia bacteriana. Es interesante

destacar que *S. aureus* resistente a la meticilina encabezó este grupo, lo que plantea la pregunta de si esta combinación de patógeno y fármaco debería ser considerada como "prioridad crítica" en lugar de "prioridad alta" en los esfuerzos de búsqueda de nuevos antibióticos.

## 2. HIPÓTESIS

El análisis integrativo de la información taxonómica, estudios de metabolómica no dirigida y cribado biológico de un conjunto de microorganismos fúngicos permitirá seleccionar las cepas más convenientes para descubrir nuevos metabolitos bioactivos o realizar el reposicionamiento de productos naturales.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la diversidad química y taxonómica de ascomicetos asociados a manglares en México con el fin de identificar los taxones más convenientes que puedan conducir al aislamiento de nuevos inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa IB (*hPTPIB<sub>1-400</sub>*) o del crecimiento bacteriano de cepas intrahospitalarias.

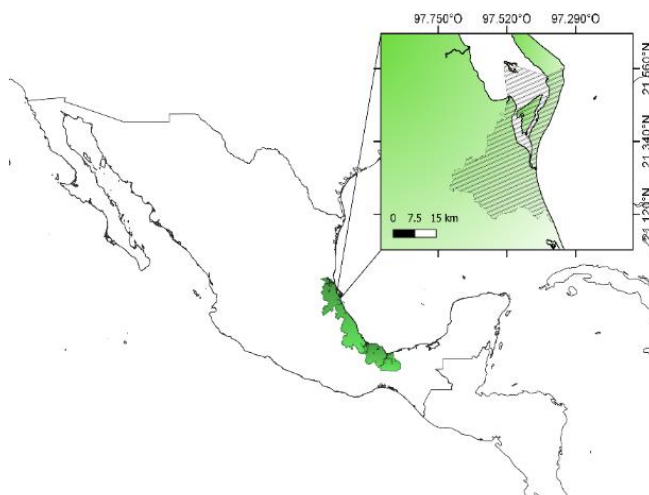
#### 3.1.2 Objetivos específicos

- Obtener una colección de microorganismos fúngicos aislados en muestras colectadas en manglares de la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz.
- Realizar el análisis filogenético de la colección de microorganismos empleando métodos bioinformáticos.
- Hacer una librería de extractos orgánicos a partir del cultivo de las cepas fúngicas en medios sólidos basados en cereales.
- Cribar los extractos fúngicos según su capacidad de inhibir la actividad de la enzima *hPTPIB<sub>1-400</sub>* y el crecimiento de bacterias intrahospitalarias.
- Analizar el perfil metabólico de los extractos orgánicos utilizando estudios de metabolómica no dirigida.
- Seleccionar las especies fúngicas más adecuadas con fines de bioprospección con base en los resultados de identidad taxonómica, actividad biológica y estudios de metabolómica no dirigida.
- Aislar y caracterizar estructuralmente los productos naturales presentes en las especies fúngicas seleccionadas.
- Evaluar los compuestos puros en los ensayos de actividad.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Aislamiento de las cepas fúngicas de estudio

Las cepas de estudio se aislaron a partir de diversos sustratos; material vegetal de mangle rojo y negro (*Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans*, respectivamente), sedimento de manglar, suelo de hormiguero y caparazones de animales pequeños (ostiones y cangrejos) del manglar situado en la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz ubicada en la zona del Golfo de México (**Figura 9**). Se aislaron hongos endófitos siguiendo la metodología descrita por Leyte-Lugo y colaboradores, con algunas modificaciones.<sup>65</sup> Brevemente, el material vegetal se sumergió en una solución de EtOH al 70% durante 1 minuto y después en agua destilada estéril. El material desinfectado se depositó en cajas Petri con agar papa dextrosa (APD) suplementado con ampicilina (1000 µg/mL). Los cultivos axénicos se obtuvieron después de una serie de transferencias del micelio emergente en cajas con APD. Por su parte, el aislamiento de los microorganismos fúngicos encontrados en las muestras de caparazones, suelo de hormiguero y sedimento de manglar se realizó mediante la técnica de diluciones seriadas descrita en la sección “aislamiento de los microorganismos fúngicos” del capítulo I de este documento. Para las muestras de caparazón, se llevó a cabo un protocolo de desinfección previo, utilizando una solución de EtOH al 70%, seguido de la pulverización de los caparazones en un mortero y pistilo estériles.



**Figura 9.** Ubicación geográfica de la zona de muestreo.

#### **4.1.2 Caracterización taxonómica de las cepas fúngicas**

Los microorganismos aislados en cultivo axénico se identificaron taxonómicamente mediante el análisis de sus secuencias ITS. El procedimiento comenzó amplificando la región ITS de todas las cepas siguiendo el protocolo que se menciona en el apartado “Identificación taxonómica de la cepa IQ-429”. Las secuencias obtenidas se sometieron a una búsqueda de secuencias similares en el GenBank por medio del programa BLASTN en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).<sup>66</sup> Una vez determinada la identidad, las secuencias relacionadas se seleccionaron considerando los niveles jerárquicos y linaje taxonómico descrito en la base de datos Taxonomy browser del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>). Para obtener el mejor alineamiento, se aplicaron de forma iterativa algoritmos de alineamiento múltiples de las secuencias con el programa CLUSTAL X versión 2.0,<sup>67</sup> posteriormente, se editaron manualmente en el programa “Seaview”.<sup>68</sup> El árbol filogenético se construyó utilizando el software MEGA 6 por el método de máxima parsimonia y para darle soporte a los nodos se emplearon 1000 pseudoreplicas de bootstrap.<sup>69</sup> Finalmente, el árbol obtenido se editó en la herramienta web iTOL (<https://itol.embl.de>).<sup>70</sup> La identificación taxonómica de los microorganismos fúngicos se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Israel Morales Jiménez adscrito al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

#### **4.2 Extractos fúngicos**

Los extractos orgánicos se obtuvieron a partir de 43 aislamientos fúngicos sembrados en medios sólidos de cereal Cheerios® y de arroz, respectivamente. Este proceso se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección “Obtención de extractos fúngicos” del capítulo I. De esta manera se obtuvieron 83 extractos orgánicos. Adicionalmente, se prepararon los extractos-blanco de los medios de cultivos siguiendo la misma metodología, pero sin agregar el inóculo fúngico.<sup>71-74</sup>

#### **4.3 Procedimientos generales**

##### **4.3.1 Análisis cromatográficos**

El aislamiento de los productos naturales a partir de las cepas fúngicas seleccionadas se realizó empleando técnicas cromatográficas convencionales. Para el fraccionamiento

primario y secundario (en algunos casos) de los extractos fúngicos se utilizó cromatografía tipo FLASH (CF). La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se empleó para reducir la complejidad de las fracciones orgánicas y obtener los compuestos puros. Las separaciones por CF se llevaron a cabo en un sistema BUCHI Pure C-810 equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD 200-800 nm). Para los análisis en fase normal se utilizó como fase estacionaria gel de sílice (malla 230-400, Macherey-Nagel) y como fase móvil mezclas binarias de Hex, AcOEt y MeOH. Las separaciones en fase reversa se realizaron usando C<sub>18</sub> (RediSep Rf Gold) y mezclas de ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico). Los análisis por CLAE se realizaron en un cromatógrafo marca Waters, equipado con los siguientes módulos: una bomba cuaternaria (2535), un inyector automático (2707), dos detectores; uno de arreglo de fotodiodos (PDA; 2998) y el otro de dispersión de luz evaporativo (ELSD; 2424), junto con un colector de fracciones. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el software Empower® 3 (Waters). Los fraccionamientos por CLAE se llevaron a cabo en modo semipreparativo y preparativo utilizando columnas fase reversa Gemini-NX C<sub>18</sub> (5 µm, 10.0 × 250 mm y 5µm, 21.20 × 250 mm para las series semipreparativa y preparativa, respectivamente; Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Como sistema de elución se utilizaron mezclas binarias de ACN o MeOH con H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico) empleando métodos en gradiente o isocráticos. Las velocidades de flujo de la fase móvil fueron 4.6 mL/min para el sistema semipreparativo y 15 mL/min en el caso de los análisis preparativos.

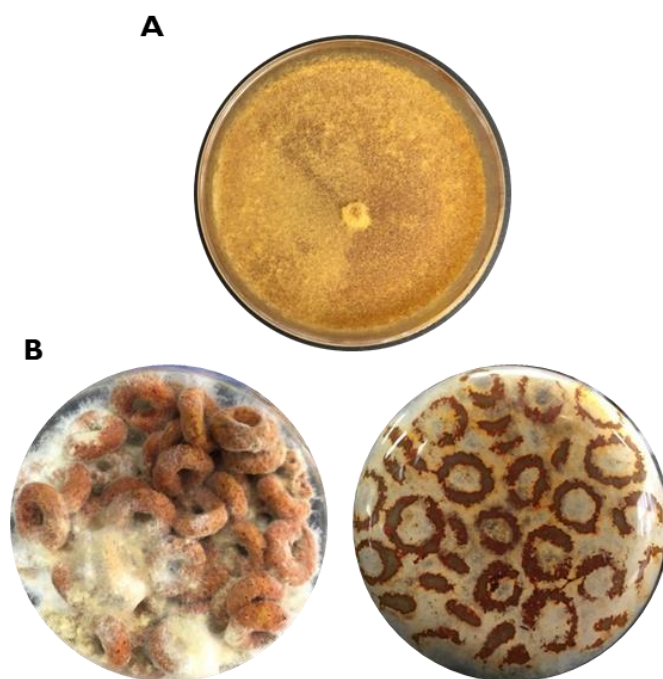
#### **4.3.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas**

La caracterización estructural de los productos aislados se realizó mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de ultravioleta (UV) se registraron en un espectrofotómetro Agilent Cary modelo 100 empleando MeOH como disolvente. Los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bidimensionales fueron realizados en los equipos Bruker Ascend III equipado con una criosonda y operando a 700 MHz (<sup>1</sup>H) o 175 MHz (<sup>13</sup>C), Bruker Avance III 500 MHz (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz) o en un Bruker Avance III 400 MHz (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz) utilizando como disolventes CDCl<sub>3</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub>, o Acetona-*d*<sub>6</sub>. Como estándar interno se utilizaron las resonancias residuales de los solventes. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ )

se reportan en ppm. Los espectros de masas de alta resolución (EM-AR) se adquirieron en un espectrofotómetro JEOL AccuTOF-DART JMST100LC.

#### 4.4 Estudio químico del microorganismo *Scytalidium* sp. (IQ-074)

Para obtener material suficiente, se escaló el cultivo sólido de este hongo en cereal Cheerios® (15×) (**Figura 10**). El extracto orgánico se preparó de la misma manera que como se menciona en la sección “extractos fúngicos” de este documento. De esta manera se obtuvieron 4.5 g de extracto seco.

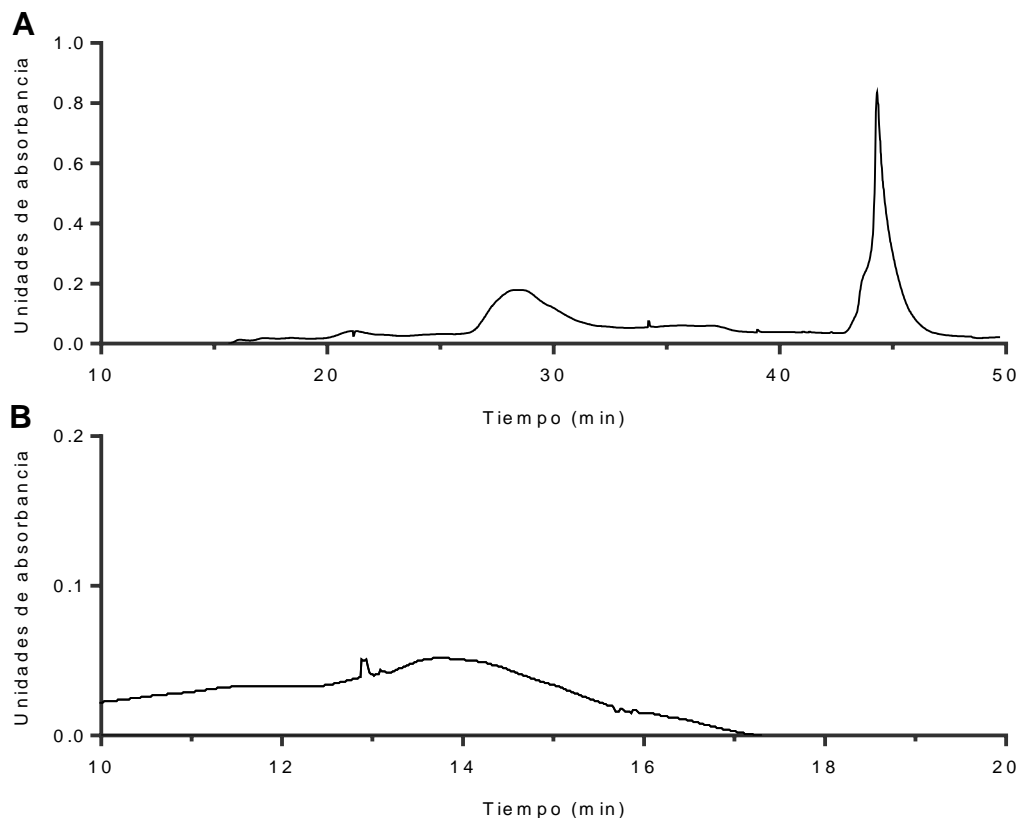


**Figura 10.** A) *Scytalidium* sp. (IQ-074) cultivado en ADP y B) en cereal Cheerios®.

##### 4.4.1 Fraccionamiento primario

El extracto orgánico (2.1 g) de *Scytalidium* sp. (IQ-074C) se fraccionó mediante CF utilizando gel de sílice como fase estacionaria (50 g) y un sistema de elución en gradiente de polaridad creciente, compuesto por Hex-AcOEt 100:00 → 00:100 durante 30 min, manteniendo la proporción final por 5 min; continuando con un gradiente de AcOEt-MeOH 100:00 → 00:100 durante 5 min, manteniendo la relación final por 30 min (**Figura 11**). La velocidad de flujo utilizada fue de 25 mL/min. Derivado de este procedimiento se obtuvieron ocho fracciones primarias (01002-144-1 → 01002-144-8).



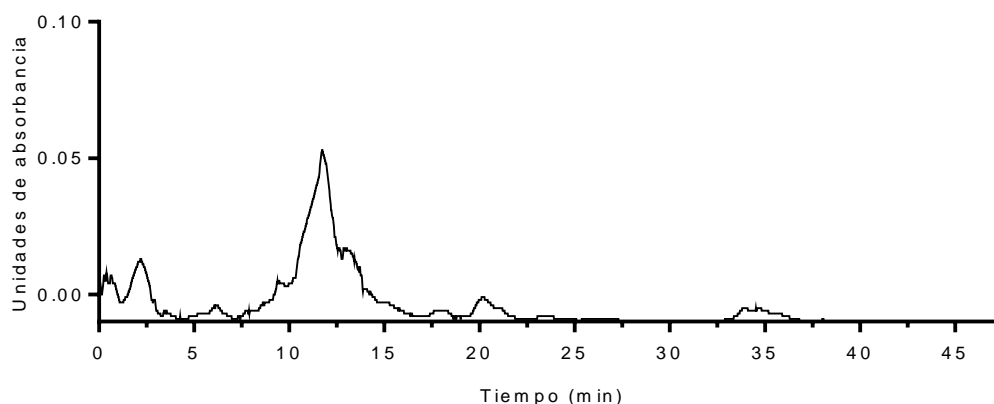


**Figura 11.** A) Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF del extracto de *Scytalidium* sp. (IQ-074C). B) continuación del sistema de elución.

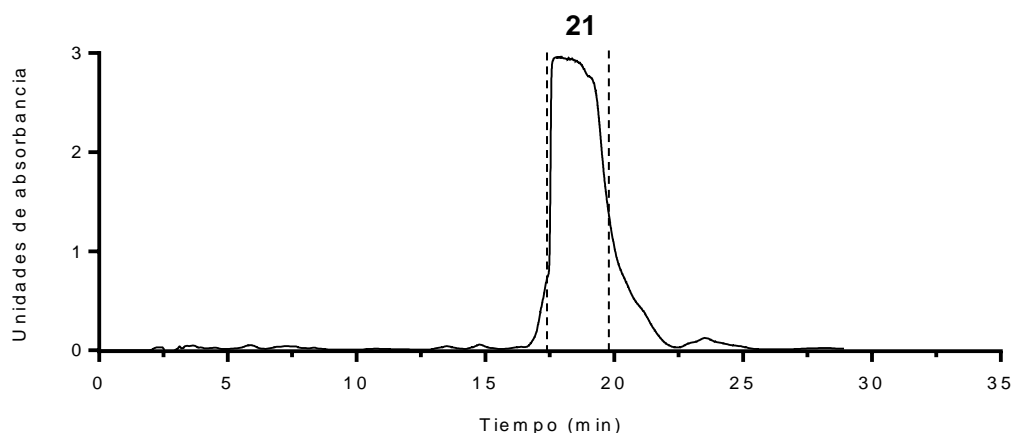
#### 4.4.1.1 Aislamiento del ácido 7-desoxipapiracílico A (21)

La fracción primaria 01002-144-2 (81.5 mg) se sometió a un segundo fraccionamiento por CF en fase reversa, empleando un soporte  $C_{18}$  (12 g) y un gradiente de elución de ACN- $H_2O$  (0.1% ácido fórmico) con las siguientes proporciones 30:70 a 50:50 en 12 min, 50:50 a 80:20 en 16 min, 100:00 durante 20 min a una velocidad de flujo de 6 mL/min (**Figura 12**). De esta operación se obtuvieron cinco fracciones (01002-149-1 → 01002-149-5).

Posteriormente, la resolución cromatográfica por CLAE en modo semipreparativo de la fracción 01002-149-2 (11.9 mg), permitió el aislamiento y purificación del PN nuevo, ácido 7-desoxipapiracílico A (**21**; 4.7 mg). Para ello, se empleó un gradiente de elución de ACN- $H_2O$  (0.1% ácido fórmico) comenzando con una proporción de 20:80 hasta 100:00 en 30 minutos (**Figura 13**).



**Figura 12.** Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF de la fracción primaria 01002-144-2.



**Figura 13.** Cromatograma (235 nm) por CLAE en modo semipreparativo de la fracción 01002-149-2.

**Ácido 7-desoxipapiracílico A (21a y 21b).** Sólido vítreo. IR  $\nu_{max}$ ; 2976, 1767, 1644, 1366, 1207, 1020, 924, 890  $\text{cm}^{-1}$ . EM-AR-DART,  $m/z$  211.0965  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4$  211.0970).

#### 4.4.1.1.1 Cálculos de dicroísmo circular electrónico (DCE) y desplazamientos químicos para 21a y 21b

Los compuestos **21a** y **21b** se construyeron y optimizaron geoméricamente utilizando el método semiempírico PM3, implementado en Spartan'10. Posteriormente, se realizó un análisis conformacional utilizando el mismo software y campo de fuerza. Los conformeros generados se sometieron a optimización geométrica y minimización utilizando

Gaussian 09. Para los cálculos de DCE, se empleó un campo de fuerzas DFT con un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d).<sup>74</sup>

Los cálculos de DCE en solución de MeOH se realizaron con un campo de fuerza TD-SCF en el nivel teórico B3LYP/6-31G(d), con el modelo de disolvente por defecto. La energía de excitación calculada (nm) y la fuerza rotatoria (R) en forma de velocidad dipolar ( $R_{vel}$ ) se simularon en una curva de DCE con la **Ecuación I** implementada en SpecDis. Donde  $E_k$  y  $R_k$  son la energía de transición y la fuerza rotatoria de la transición electrónica  $k^{th}$ , respectivamente, y  $\sigma$  es la semiamplitud exponencial.<sup>75, 76</sup>

$$\Delta\varepsilon(\lambda) = \frac{1}{2.296 \times 10^{-39}} \times \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \sum_k E_{0k} R_{0k} e \left[ - \left\{ \frac{E - E_{0k}}{\sigma} \right\}^2 \right] \quad \text{Ecuación I}$$

#### 4.4.1.2 Aislamiento del ácido papiracílico A (20a - 20d).

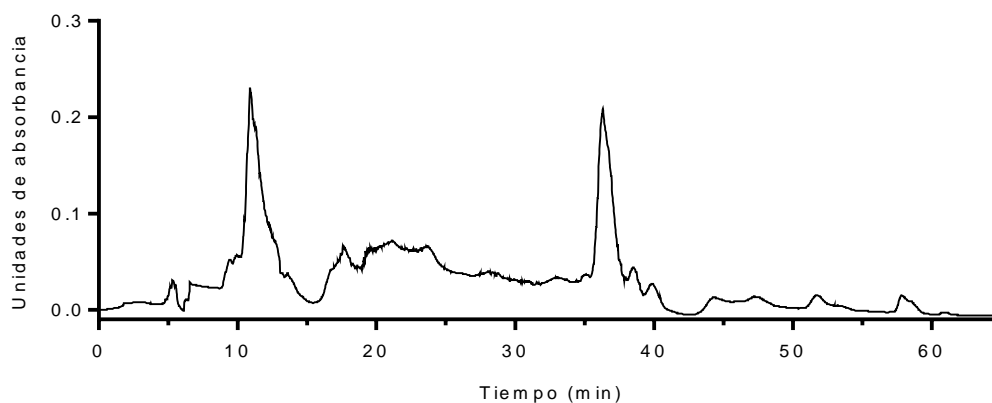
La fracción 01002-144-4 se cristalizó en frío usando una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O para obtener el ácido papiracílico A (**20a – 20d**; lg).

**Ácido papiracílico A (20a – 20d)**. Sólido cristalino. IR  $\nu_{max}$ ; 3373, 1733, 1633, 1357, 1268, 1128, 933, 864 cm<sup>-1</sup>. EM-AR-DART, m/z 227.0917 [M + H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub> 227.0919). Los datos espectroscópicos se detallan para el diastereoisómero más abundante **20a**. RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  (ppm); 5.08 (1H, s, CH-2), 2.73 (1H, m, CH-7), 1.59 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 5.29 (1H, dd,  $J = 3.5, 1.4$  Hz, CH<sub>2</sub>-9), 5.25 (1H, dd,  $J = 3.5, 1.4$  Hz, CH<sub>2</sub>-9), 1.20 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-10), 3.87 (3H, s, CH<sub>3</sub>-11). RMN-<sup>13</sup>C ( $\delta_C$  ppm): 169.9 (C-1), 88.8 (CH-2), 178.0 (C-3), 107.3 (C-4), 148.3 (C-5), 47.6 (CH-6), 107.3 (C-7), 24.6 (CH<sub>3</sub>-8), 111.7 (CH<sub>2</sub>-9), 11.2 (CH<sub>3</sub>-10), 59.9 (CH<sub>3</sub>-11).

#### 4.4.1.3 Aislamiento de los scytalpolioles A al D (22-25)

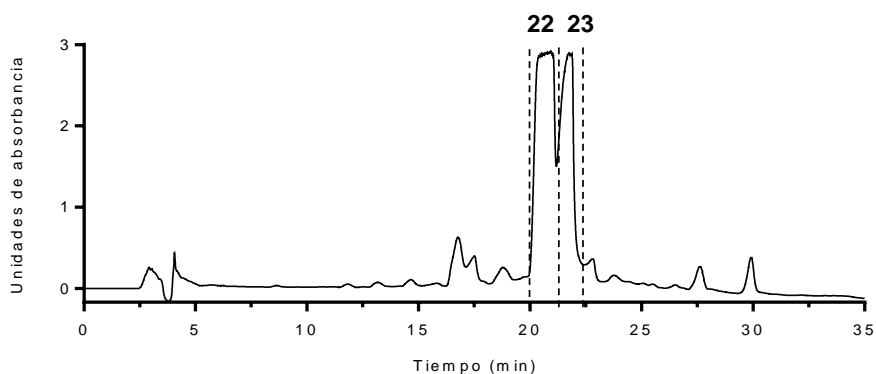
La muestra 01002-144-7 (323 mg) se sometió a un segundo fraccionamiento mediante CF en fase reversa C<sub>18</sub> (60 g) y un gradiente de elución empleando las siguientes proporciones 30:70 a 50:50 en 12 min, 50:50 a 80:20 en 16 min, 100:00 durante 20 min a una velocidad de flujo de 30 mL/min de ACN-H<sub>2</sub>O (B; 0.1% ácido fórmico) a una velocidad

de flujo de 30 mL/min (**Figura 14**). Este procedimiento generó nueve fracciones (01002-147-1 → 01002-147-9).



**Figura 14.** Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF de la fracción primaria 01002-144-7.

Consecutivamente, la fracción secundaria 01002-147-8 (40 mg) se resolvió mediante CLAE en modo preparativo para obtener los scytalpoliols A (**22**; 16 mg) y B (**23**; 4.6 mg). El sistema de elución consistió en un gradiente de ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico) con una proporción de 45:55 → 90:00 en 30 minutos (**Figura 15**).



**Figura 15.** Cromatograma (213 nm) por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-147-8.

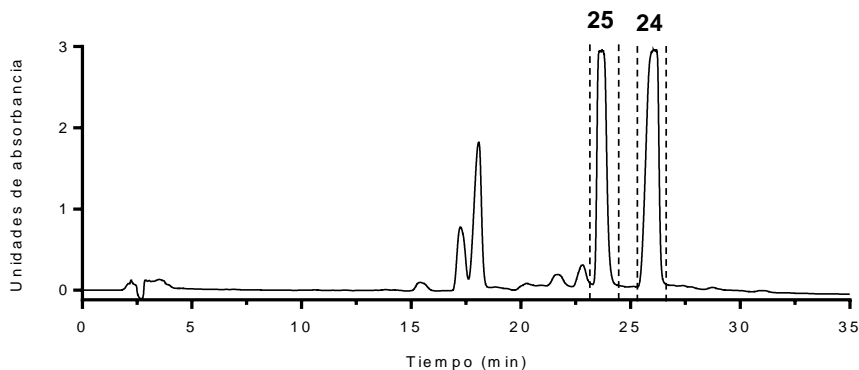
**Scytalpoliol A (22).** Polvo blanco. UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 202 (3.99) nm; IR  $\nu_{max}$  3383, 2965, 2993, 2874, 1669, 1643, 1454, 1374, 997  $cm^{-1}$ . EM-AR-DART,  $m/z$  398.3266 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub> 398.3270).

**Scyaltpoliol B (23).** Polvo blanco. UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 201 (3.82), 231 (3.82) nm; IR  $\nu_{\max}$  3405, 2961, 2926 2872, 1689, 1453, 1375, 1018  $\text{cm}^{-1}$ . EM-AR-DART,  $m/z$  440.3723  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{N}_1\text{O}_4$  440.3739).

Los scyaltpolioles C (**24**; 2.9 mg) y D (**26**; 3.6 mg) se obtuvieron tras la resolución cromatográfica por CLAE de la fracción 01002-147-9 en modo semipreparativo (7 mg  $\times$ 3). El sistema de elución consistió en un gradiente de ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% ácido fórmico) con una proporción de 45:55  $\rightarrow$  100:00 en 30 minutos (**Figura 16**).

**Scyaltpoliol C (24).** Polvo blanco. UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 202 (4.04), 231 (4.05) nm; IR  $\nu_{\max}$  3379, 2964, 2929, 2874, 1688, 1642, 1453, 1373, 1018  $\text{cm}^{-1}$ . EM-AR-DART,  $m/z$  439.3421  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{O}_5$  439.3423).

**Scyaltpoliol D (25).** Polvo ligeramente amarillo. UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 231 (4.23) nm; IR  $\nu_{\max}$  3387, 2962, 2928, 2873, 1686, 1460, 1378, 1275, 1260, 749  $\text{cm}^{-1}$ . EM-AR-DART,  $m/z$  425.36118  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{O}_4$  425.3630).

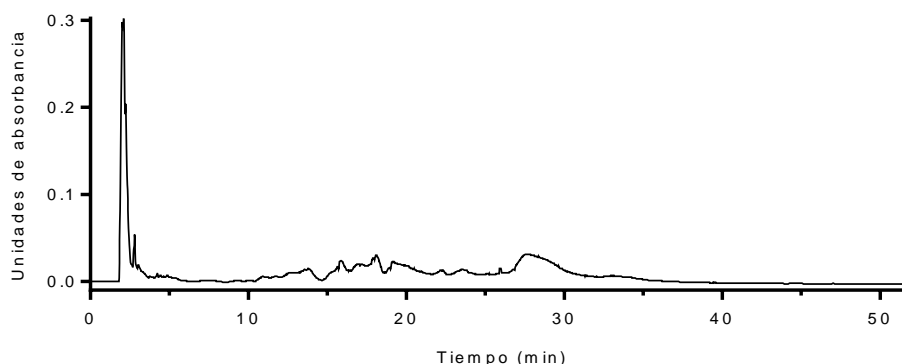


**Figura 16.** Cromatograma (222 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo semipreparativo de la fracción secundaria 01002-147-9.

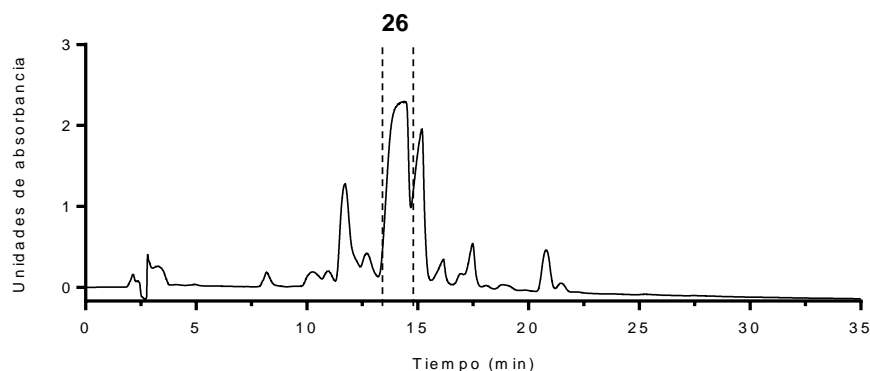
#### 4.4.1.4 Aislamiento del scyaltminol A (26).

El scyaltminol A (**26**) fue el último compuesto obtenido del extracto orgánico de *Scytalidium* sp. (IQ-074C). El aislamiento comenzó con el fraccionamiento secundario de la fracción 01002-144-8 (127 mg) mediante CF en fase reversa, con un gradiente de elución de ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% ácido fórmico) iniciando una proporción 10:90 hasta 100:00 a un flujo de 6.0 mL/min (**Figura 17**). De este procedimiento se obtuvieron siete fracciones

secundarias (01002-152-1 → 01002-152-7). La resolución cromatográfica por CLAE en modo semipreparativo de la fracción 01002-152-5 (5 mg x3 inyecciones) usando un sistema de elución en gradiente de ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico) comenzando con una proporción de 40:60 hasta 90:10 en 30 minutos (**Figura 18**) condujo al aislamiento y purificación del scytalminol A (**26**; 3.6 mg).



**Figura 17.** Cromatograma (254 nm) obtenido del fraccionamiento por CF de la fracción primaria 01002-144-8.



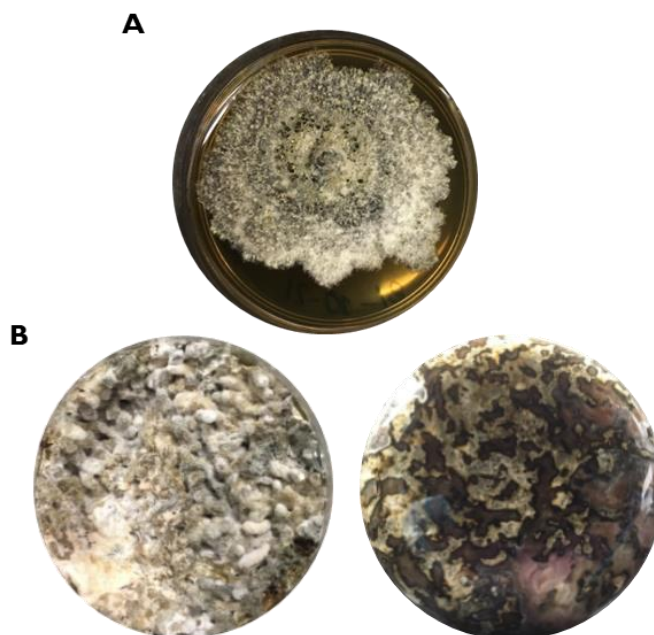
**Figura 18.** Cromatograma (206 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo semipreparativo de la fracción secundaria 01002-152-5.

**Scytalminol A (26).** UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (4.10) nm; IR  $\nu_{\max}$  3387, 2962, 2929, 2871, 1717, 1590, 1454, 1373, 1260, 1015, 863  $\text{cm}^{-1}$ . EM-AR-DART,  $m/z$  398.3268 [ $M + H$ ]<sup>+</sup> (calcd. para  $C_{23}H_{44}NO_4^+$  398.3270).

#### 4.5 Estudio químico del microorganismo *Diaporthe* sp. (IQ-053)

La segunda cepa fúngica estudiada químicamente en este trabajo fue el microorganismo *Diaporthe* sp. (IQ-053). El cultivo sólido de este hongo fue escalado en

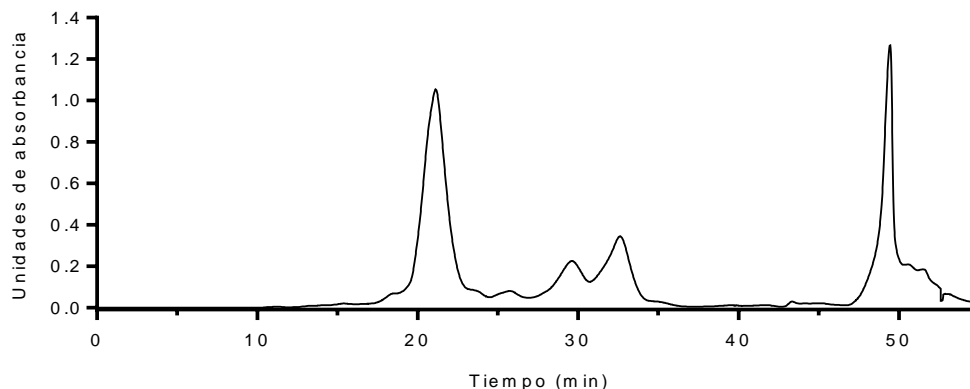
arroz (15 x) (**Figura 19**). El extracto orgánico (998.9 mg) se obtuvo como se indica en la sección “extractos fúngicos” de este documento.



**Figura 19.** A) *Diaporthe* sp. (IQ-053) cultivado en ADP y B) en arroz.

#### 4.5.1 Fraccionamiento primario

El extracto orgánico (998.9 mg) de *Diaporthe* sp. (IQ-053) se fraccionó mediante CF en fase normal, utilizando gel de sílice como fase estacionaria (50 g) y un sistema de elución en gradiente de polaridad creciente, compuesto por Hex-AcOEt 90:10 → 00:100 durante 36 min, manteniendo la proporción final por 5 min; continuando con un gradiente de AcOEt-MeOH 100:00 → 00:100 durante 7 min, manteniendo la relación final por 10 min (**Figura 20**). La velocidad de flujo utilizada fue de 25 mL/min. Este fraccionamiento resultó en 11 fracciones primarias (01002-156-I → 01002-156-II).



**Figura 20.** Cromatograma (280 nm) obtenido del fraccionamiento por CF en fase normal del extracto de *Diaporthe* sp. (IQ-053).

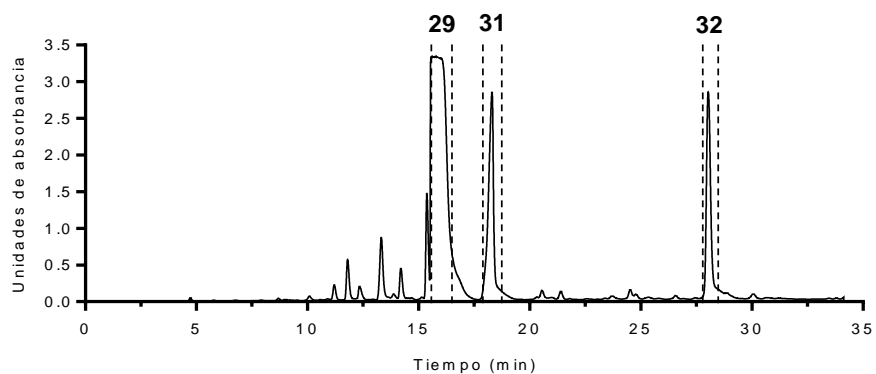
#### 4.5.1.2 Aislamiento de los metabolitos secundarios del extracto orgánico de *Diaporthe* sp. (IQ-053).

Los compuestos aislados a partir del extracto fúngico de *Diaporthe* sp. (IQ-053) se obtuvieron mediante la resolución cromatográfica por CLAE en modo preparativo de cuatro fracciones primarias. Las condiciones de análisis y los productos obtenidos de cada fracción se presentan en la **Tabla I**.

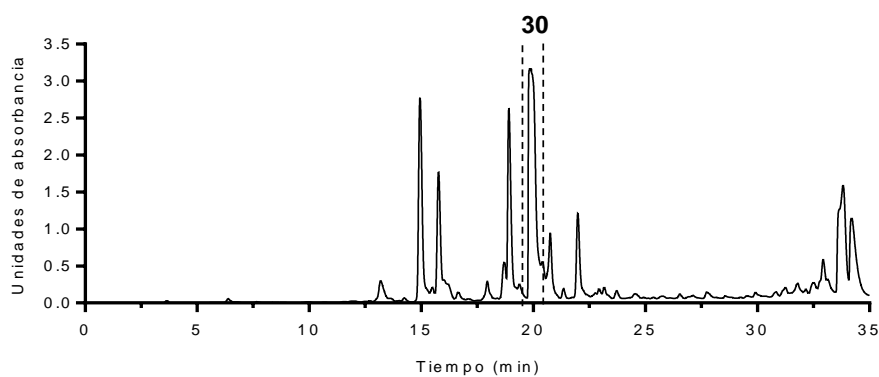
**Tabla I.** Sistemas de elución utilizados en la purificación de los compuestos aislados de *Diaporthe* sp. (IQ-053).

Fracción primaria	Sistema de elución	Compuesto
01002-156-4 (38 mg)	Gradiente lineal de ACN-H <sub>2</sub> O (0.1% ácido fórmico) 45:55 → 100:00 en 30 min ( <b>Figura 21</b> ).	Citosporona B ( <b>29</b> ; 14.5 mg) Pestalotiopsona B ( <b>31</b> ; 3.0 mg) Diaportalasina ( <b>32</b> ; 2.7 mg)
01002-156-5 (30 mg)	Gradiente lineal de ACN-H <sub>2</sub> O (0.1% ácido fórmico) 20:80 → 100:00 en 30 min ( <b>Figura 22</b> ).	Citosporona C ( <b>30</b> ; 6.7 mg)
01002-156-6 (25 mg)	Gradiente lineal de ACN-H <sub>2</sub> O (0.1% ácido fórmico) 30:70 → 75:25 en 30 min ( <b>Figura 23</b> ).	Dotiorelona I ( <b>28</b> ; 10.5 mg)
01002-156-7 (21 mg)	Gradiente lineal de ACN-H <sub>2</sub> O (0.1% ácido fórmico) 20:80 → 35:65 en 30 min ( <b>Figura 24</b> ).	Dotiorelona A ( <b>27</b> ; 16.4 mg)

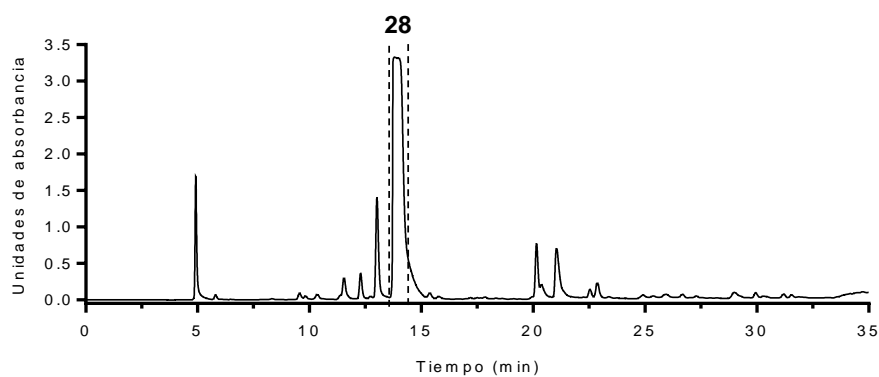




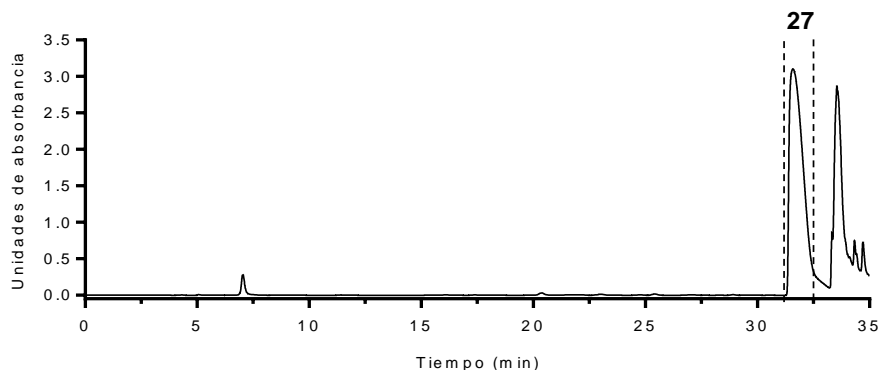
**Figura 21.** Cromatograma (254 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-4.



**Figura 22.** Cromatograma (235 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-5.



**Figura 23.** Cromatograma (254 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-6.



**Figura 24.** Cromatograma (254 nm) obtenido de la resolución por CLAE en modo preparativo de la fracción 01002-156-7.

**Dotiorelona A (27).** Sólido cristalino; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (4.02), 220 (3.98), 268 (3.68), 299 (3.55) nm; IR  $\nu_{\max}$ ; 3258, 2928, 1682, 1588, 1268, 1163, 1017, 844  $\text{cm}^{-1}$ ; EM-AR-DART,  $m/z$  339.1805  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{O}_6$  339.1807). RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3.67 (2H, s,  $\text{CH}_2$ -2), 6.31 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, CH-4), 6.36 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, CH-6), 2.90 (2H, t,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ -10), 1.64 (2H, p,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ -11), 1.36 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -12), 1.43 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -13), 1.35 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -13), 1.39 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -14), 3.70 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -15), 1.10 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -16), 4.08 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ -17), 1.21 (3H, t,  $J = 7.2$ ,  $\text{CH}_3$ -18); RMN- $^{13}\text{C}$   $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 171.7 (C-1), 40.2 ( $\text{CH}_2$ -2), 137.3 (C-3), 111.9 (CH-4), 160.8 (C-5), 102.8 (CH-6), 159.9 (C-7), 121.0 (C-8), 206.5 (C-9), 44.6 (C-10), 25.2 ( $\text{CH}_2$ -11), 30.3 ( $\text{CH}_2$ -12), 26.6 ( $\text{CH}_2$ -13), 40.3 ( $\text{CH}_2$ -14), 67.6 ( $\text{CH}_2$ -15), 24.1 ( $\text{CH}_3$ -16), 61.1 (C-17), 14.6 (C-18).

**Dotiorelona I (28).** Polvo café. UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (3.99), 220 (3.95), 268 (3.66), 298 (3.53) nm; IR  $\nu_{\max}$ ; 3346, 2936, 2866, 1703, 1610, 1464, 1368, 1274, 1162, 1028, 749  $\text{cm}^{-1}$ ; EM-AR-DART,  $m/z$  337.1647  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_6$  337.1651). RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3.78 (2H, s,  $\text{CH}_2$ -2), 6.26 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, CH-4), 6.27 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, CH-6), 2.84 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ -10), 1.70 (2H, p,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ -11), 1.32 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -11), 1.59 (2H, p,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ -13), 2.44 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ -14), 2.14 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -16), 4.18 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ -17), 1.20 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -18), 11.6 (H, brs, 7-OH); RMN- $^{13}\text{C}$   $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 171.7 (C-1), 41.8 ( $\text{CH}_2$ -2), 136.7 (C-3), 112.8 (CH-4), 160.5 (C-5), 103.3 (CH-6), 164.0 (C-7), 117.0 (C-8), 206.5 (C-9), 43.1 ( $\text{CH}_2$ -10), 24.6 ( $\text{CH}_2$ -

11), 28.7 (CH<sub>2</sub>-12), 23.6 (CH<sub>2</sub>-13), 43.6 (CH<sub>2</sub>-14), 210.1 (C-15), 30.1 (CH<sub>3</sub>-16), 61.7 (CH<sub>2</sub>-17), 14.3 (CH<sub>3</sub>-18).

**Citosporona B (29).** Sólido cristalino; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 202 (3.99), 220 (3.96), 268 (3.65), 302 (3.52) nm; IR  $\nu_{\max}$  3300, 2927, 1708, 1611, 1466, 1370, 1162 cm<sup>-1</sup>. EM-AR-DART,  $m/z$  323.1864 [M + H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub> 323.1858). RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3.83 (2H, s, CH<sub>2</sub>-2), 6.25 (1H, d,  $J$  = 2.3 Hz, CH-4), 6.28 (1H, d,  $J$  = 2.7 Hz, CH-6), 2.82 (2H, t,  $J$  = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>-10), 1.73 (2H, m, CH<sub>2</sub>-11), 1.31 (2H, m, CH<sub>2</sub>-12), 1.31 (2H, m, CH<sub>2</sub>-13), 2.27 (2H, m, CH<sub>2</sub>-14), 1.29 (2H, m, CH<sub>2</sub>-15), 0.87 (3H, brt,  $J$  = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>-16), 4.19 (2H, q,  $J$  = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-17), 1.27 (3H, t,  $J$  = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-18), 6.02 (H, s, 5-OH), 12.10 (H, s, 7-OH); RMN-<sup>13</sup>C  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 171.5 (C-1), 41.9 (CH<sub>2</sub>-2), 136.8 (C-3), 112.7 (CH-4), 160.4 (C-5), 103.4 (CH-6), 164.6 (C-7), 116.7 (C-8), 206.9 (C-9), 43.5 (CH<sub>2</sub>-10), 25.1 (C-11), 29.3 (C-12), 29.2 (C-13), 31.8 (C-14), 22.7 (C-15), 14.3 (C-11), 61.8 (CH<sub>2</sub>-17), 14.2 (CH<sub>3</sub>-18).

**Citosporona C (30).** Sólido cristalino; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (4.11), 280 (2.94) nm; IR  $\nu_{\max}$  3382, 2914.31, 2847, 1715, 1668, 1608, 1468, 1393, 1265, 1146, 1050, 825, 721, 561 cm<sup>-1</sup>; EM-AR-DART,  $m/z$  279.1589 [M + H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub> 279.1596). RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3.79 (2H, dd,  $J$  = 19.2, 0.9 Hz, CH<sub>2</sub>-2), 3.46 (2H, d,  $J$  = 19.3 Hz, CH<sub>2</sub>-2), 6.24 (2H, brm, CH<sub>2</sub>-4), 6.35 (1H, dd,  $J$  = 2.3, 0.9 Hz, CH-6), 5.56 (1H, dd,  $J$  = 8.9, 5.0 Hz, CH-9), 1.88 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10), 1.79 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10), 1.55 (2H, m, CH<sub>2</sub>-11), 1.42 (2H, m, CH<sub>2</sub>-11), 1.30 (2H, m, superpuesto, CH<sub>2</sub>-12), 1.30 (2H, m, superpuesto, CH<sub>2</sub>-13), 1.29 (2H, m, CH<sub>2</sub>-14), 1.28 (2H, m, CH<sub>2</sub>-15), 0.87 (3H, t,  $J$  = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-16); RMN-<sup>13</sup>C  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 170.6 (C-1), 35.5 (CH<sub>2</sub>-2), 133.7 (C-3), 106.4 (CH<sub>2</sub>-4), 159.2 (C-5), 102.0 (C-6), 154.6 (C-7), 114.2 (C-8), 78.5 (CH-9), 36.6 (CH<sub>2</sub>-10), 26.5 (CH<sub>2</sub>-11), 29.8 (C H<sub>2</sub>-12), 29.8 (CH<sub>2</sub>-13), 23.4 (CH<sub>2</sub>-14), 32.7 (CH<sub>2</sub>-15), 14.4 (CH<sub>3</sub>-16).

**Pestalotiopsona B (31).** Sólido cristalino; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 216 (4.08), 242 (3.98), 249 (4.00), 290 (3.86) nm;  $\nu_{\max}$ ; 2918, 2850, 1737, 1641, 1563, 1483, 1397, 1271, 1175, 1156 cm<sup>-1</sup>; EM-AR-DART,  $m/z$  347.1848 [M + H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub> 347.1858). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 6.00 (3H, s, CH<sub>2</sub>-3), 6.58 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, CH-6), 6.65 (H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-8), 2.50 (2H, t,  $J$  = 7.6 Hz CH<sub>2</sub>-1'), 1.70 (2H, m, CH<sub>2</sub>-

2'), 1.40 (2H, m, CH<sub>2</sub>-3'), 1.40 (2H, m, CH<sub>2</sub>-4'), 1.30 (2H, m, CH<sub>2</sub>-5'), 1.30 (2H, m, CH<sub>2</sub>-6'), 0.87 (3H, brt, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-7'), 4.10 (2H, s, CH<sub>2</sub>-2''), 4.20 (2H, q, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-2''), 1.29 (3H, t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-2''); RMN-<sup>13</sup>C δ<sub>C</sub> (ppm): 168.5 (C-2), 110.1 (CH<sub>2</sub>-3), 179.8 (C-4), 137.0 (C-5), 118.6 (CH-6), 160.5 (C-7), 102.9 (C-8), 115.4 (C-9), 159.8 (C-10), 33.9 (CH<sub>2</sub>-1'), 26.9 (CH<sub>2</sub>-2'), 29.1 (CH<sub>2</sub>-3'), 29.1 (CH<sub>2</sub>-4'), 31.8 (CH<sub>2</sub>-5'), 22.7 (CH<sub>2</sub>-6'), 14.2 (CH<sub>3</sub>-7'), 41.5 (CH<sub>2</sub>-1''), 172.7 (C-2''), 61.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-2''), 14.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-2'').

**Diaportalasina (32).** Sólido ligeramente amarillo; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 202 (4.26), 227 (3.91), 276 (3.51) nm; *v*<sub>max</sub>; EM-AR-DART, *m/z* 486.3020 [M + H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>1</sub>O<sub>3</sub> 486.3008). RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 2.95 (1H, q, *J* = 7.1 Hz, CH-5), 5.27 (1H, s, CH-7), 3.63 (2H, s, CH<sub>2</sub>-10), 1.07 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>-11), 3.27 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, CH-13), 5.40 (1H, s, CH-15), 1.47 (2H, dd, *J* = 12.5, 2.5 Hz, CH<sub>2</sub>-17), 0.77 (2H, t, *J* = 12.5 Hz, CH<sub>2</sub>-17), 1.62 (2H, m, CH<sub>2</sub>-18), 1.76 (2H, superpuesto, CH<sub>2</sub>-19), 0.64 (2H, qd, *J* = 12.5, 4.2 Hz, CH<sub>2</sub>-19), 1.62 (1H, m, CH<sub>2</sub>-20), 1.20 (1H, m, CH<sub>2</sub>-20), 1.50 (1H, td, *J* = 12.6, 2.7 Hz, CH-21), 2.48 (1H, dd, *J* = 12.9, 8.5 Hz, CH-20), 1.22 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 1.86 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 0.82 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26), 0.83 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>-27), 7.08 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, CH-2', CH-6'), 6.76 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, CH-3', CH-5'); RMN-<sup>13</sup>C δ<sub>C</sub> (ppm): 176.8 (C-1), 134.3 (C-3), 118.2 (C-4), 32.7 (CH-5), 136.7 (C-6), 127.8 (CH-7), 48.2 (C-8), 71.5 (C-9), 30.9 (CH<sub>2</sub>-10), 19.9 (CH<sub>3</sub>-11), 21.6 (CH<sub>3</sub>-12), 49.1 (CH-13), 128.2 (C-14), 139.0 (CH-15), 36.3 (C-16), 48.4 (CH<sub>2</sub>-17), 27.4 (CH-18), 36.08 (CH<sub>2</sub>-19), 23.7 (CH<sub>2</sub>-20), 42.2 (CH-21), 49.6 (CH-22), 215.4 (C-23), 24.8 (CH<sub>3</sub>-24), 24.5 (CH<sub>3</sub>-25), 19.8 (CH<sub>3</sub>-26), 22.8 (CH<sub>3</sub>-27), 128.2 (C-1'), 129.8 (CH-2', CH-6'), 116.0 (CH-3', CH-5'), 155.0 (C-4').

#### 4.6 Análisis de redes moleculares utilizando la herramienta web GNPS

El análisis se realizó con 83 extractos fúngicos obtenidos del cultivo de la colección de ascomicetos sembrados en dos medios sólidos, cereal Cheerios® y arroz; tres extractos faltantes corresponden a los que debieron derivarse de los microorganismos etiquetados como IQ-045, IQ-046 e IQ-049 cultivados en cereal Cheerios® (IQ-045 e IQ-049) y en arroz (IQ-046), respectivamente, sin embargo, no se logró obtener una muestra adecuada para su análisis debido a que el rendimiento fue bajo.

Los extractos fúngicos se disolvieron en DMSO (4 mg/mL) y se analizaron en un equipo Agilent G6530AB CLAE-EM-SQ-TOF.<sup>77</sup> Para ello, se utilizó una columna de fase reversa Gemini-NX C<sub>18</sub> (3 µm, 2.0 x 75 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA) y como sistema de elución una mezcla binaria de ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico); comenzando con una proporción 15:85 hasta llegar a 100:0 en 8 min, manteniendo el sistema isocrático durante 1.5 min. La velocidad de flujo se mantuvo constante a 0.4 mL/min. Los parámetros para los análisis espectrométricos fueron los siguientes: modo de ionización positivo en un rango de 100 a 2500 m/z, seleccionando los iones más abundantes por ciclo para su fragmentación en modo automático (Auto EM<sup>2</sup>).

El análisis de redes moleculares (RM) se realizó siguiendo el flujo de trabajo para un análisis clásico en el sitio web Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS; <http://gnps.ucsd.edu>).<sup>39</sup> Los archivos crudos (.d) se convirtieron al formato de archivo mzML utilizando el programa MSConvert y se transfirieron al servidor de GNPS. El conjunto de datos está disponible en el repositorio público “entorno virtual interactivo de espectrometría de masas” (MassIVE, por sus siglas en inglés) con la clave de identificación MSV000091237. Los parámetros seleccionados para generar las RMs se mencionan a continuación. Los datos se filtraron para remover los iones fragmento EM<sup>2</sup> entre ±17 Da del precursor m/z, la tolerancia del ion precursor y de los fragmentos se ajustaron a un valor de 0.02 Da. El valor de las aristas que conectan los nodos fue de un puntaje de coseno superior a 0.7 y más de cinco picos alineados. A continuación, se compararon los espectros de las RMs con las bibliotecas espectrales de GNPS. Los espectros de la biblioteca se filtraron del mismo modo que los datos de entrada; la búsqueda se realizó con los valores de tolerancia de masa de los iones precursores y iones fragmento utilizados al crear las RM, es decir, una puntuación de coseno superior a 0.7 y al menos cinco picos coincidentes. Para facilitar el análisis, las RMs se crearon filtrando los iones fragmento correspondientes a los blancos de cultivos. La visualización y edición gráfica de las redes moleculares se realizó en el software Cytoscape (versión 3.9.1).<sup>78</sup>

Adicionalmente, con el objetivo de conocer la diversidad estructural presente en los microorganismos fúngicos, se incluyó un análisis *in silico* de tipo MolNetEnhancer, un algoritmo desarrollado por los creadores de GNPS que permite proporcionar una

descripción química más completa de los datos de metabolómica, iluminando detalles estructurales para cada espectro de fragmentación, y de esta manera clasificar las RMs en familias estructurales.<sup>79</sup> Este análisis fue complementado usando las funciones Network annotation propagation (NAP, por sus siglas en inglés) y MS2LDA, que sirven para mejorar las anotaciones *in silico* y para buscar subestructuras presentes en el conjunto de datos, respectivamente.<sup>80, 81</sup>

## 4.7 Evaluaciones biológicas

### 4.7.1 Ensayos de inhibición enzimática frente hPTPIB<sub>1-400</sub>

El cribado de los extractos y compuestos puros frente a hPTPIB<sub>1-400</sub> se evaluaron en las concentraciones finales de 20 µg/mL y 50 µM. Se siguió la metodología descrita en la sección “Ensayos de inhibición enzimática de la hPTPIB<sub>1-400</sub>” del capítulo I. Los valores CI<sub>50</sub> de las moléculas activas se calcularon mediante un análisis de regresión no lineal empleando la **Ecuación 2** en el programa GraphPad Prism.

$$\%Inh = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^S}$$

**Ecuación 2**

### 4.7.2 Ensayos antibacterianos

La búsqueda de extractos fúngicos con potencial antibacteriano se realizó frente a un conjunto de bacterias (gramnegativas y grampositivas). *Klebsiella pneumoniae* (906 y 1905) y *Pseudomonas aeruginosa* (5676 y 5687) proporcionadas por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez ubicado en la Ciudad de México; *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* 42R junto con la cepa panresistente (PDR) *Acinetobacter baumannii* A564<sup>82</sup> concedidas por el Dr. Rodolfo García Contreras, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los extractos orgánicos y compuestos puros se evaluaron *in vitro* empleando una versión ligeramente modificada del método de microdilución en caldo reportado en el protocolo M07-A10 "Métodos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias que crecen aeróbicamente" del Instituto de Estándares Clínicos y de

Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés)<sup>83</sup>. Brevemente, los extractos, compuestos puros y la gentamicina (GOLDBIO®) se disolvieron en DMSO y fueron evaluados en las concentraciones finales de 200 µg/mL (extractos) y 50 µg/mL (compuestos puros y gentamicina). Una alícuota de cada dilución se transfirió a una placa de 96 pozos que contenía caldo Müller Hinton. A continuación, se añadió una suspensión bacteriana ajustada ( $5 \times 10^8$  UFC/mL) y la placa se incubó a 35 °C durante 16 horas. La densidad óptica fue registrada a 600 nm al inicio y al término del periodo de incubación. Todas las determinaciones se hicieron en tres repeticiones biológicas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó utilizando la función modificada de Gompertz (**Ecuación 3**) en el programa GraphPad Prism.<sup>84</sup>

$$y = A + C e^{-e^{B(x-M)}}$$

### **Ecuación 3.**

donde  $A$  es la asíntota inferior de  $y$  (aproximadamente cero),  $B$  es un parámetro de pendiente,  $C$  es la distancia entre la asíntota superior y la inferior (aproximadamente 1) y  $M$  es la concentración logarítmica del punto de inflexión.<sup>84</sup>

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Microorganismos fúngicos aislados y su análisis taxonómico

Las muestras utilizadas para el aislamiento de las cepas fúngicas (material vegetal, sedimento de manglar, suelo de hormigueros y caparzones de cangrejos y ostión) corresponden a las usualmente colectadas para el aislamiento de hongos considerados de manglar, con excepción del suelo de hormiguero.<sup>54</sup> Siguiendo las técnicas de microbiología adecuadas, se logró el aislamiento de 43 cepas fúngicas a las cuales se les asignó una clave alfanumérica, incluyendo los códigos IQ-033 al IQ-080 (**Tabla 2**). No se consideraron a los microorganismos IQ-034, 038, 059, 061 y 075. La identidad taxonómica de los aislamientos fúngicos se estableció mediante el análisis de la región ITS de las cepas, secuencia de ADN que ha sido reconocida por micólogos como el código de barras oficial para la identificación de hongos.<sup>85</sup> El análisis filogenético de la región ITS permitió establecer la identidad taxonómica de los hongos a nivel de género. Para inferir relaciones filogenéticas precisas a nivel de especie se requiere el análisis adicional de marcadores que codifican para proteínas como la subunidad mayor (*RPB1*) y la segunda más grande (*RPB2*) de la ARN polimerasa,<sup>85-87</sup> el factor de elongación de la traducción I-alfa (*tef1*),<sup>88</sup> la beta-tubulina (*tub2/BenA*),<sup>89, 90</sup> la calmodulina (*CaM*)<sup>91</sup> y la proteína 7 de mantenimiento de mini-crosomas (*MCM7*).<sup>92, 93</sup>

En la **Figura 25** se muestra el árbol filogenético construido con las secuencias ITS de las cepas aisladas y las de referencia depositadas en el GenBank®. Trascendió que el 100% de los aislamientos pertenecen al filo Ascomycota (**Tabla 3**), grupo dominante aislado en muestras de manglares.<sup>54</sup> Los microorganismos se distribuyeron en cuatro clases taxonómicas (Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes y Leotiomycetes), 10 ordenes (Hypocreales, Glomerellales, Sordariales, Trichosphaeriales, Xylariales, Diaporthales, Helotiales, Pleosporales, Venturiales y Eurotiales) y en 14 géneros (*Geosmithia*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Gelasinospora*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Diaporthe*, *Scytalidium*, *Curvularia*, *Westerdykella*, *Scolecobasidium*, *Aspergillus* y *Penicillium*).

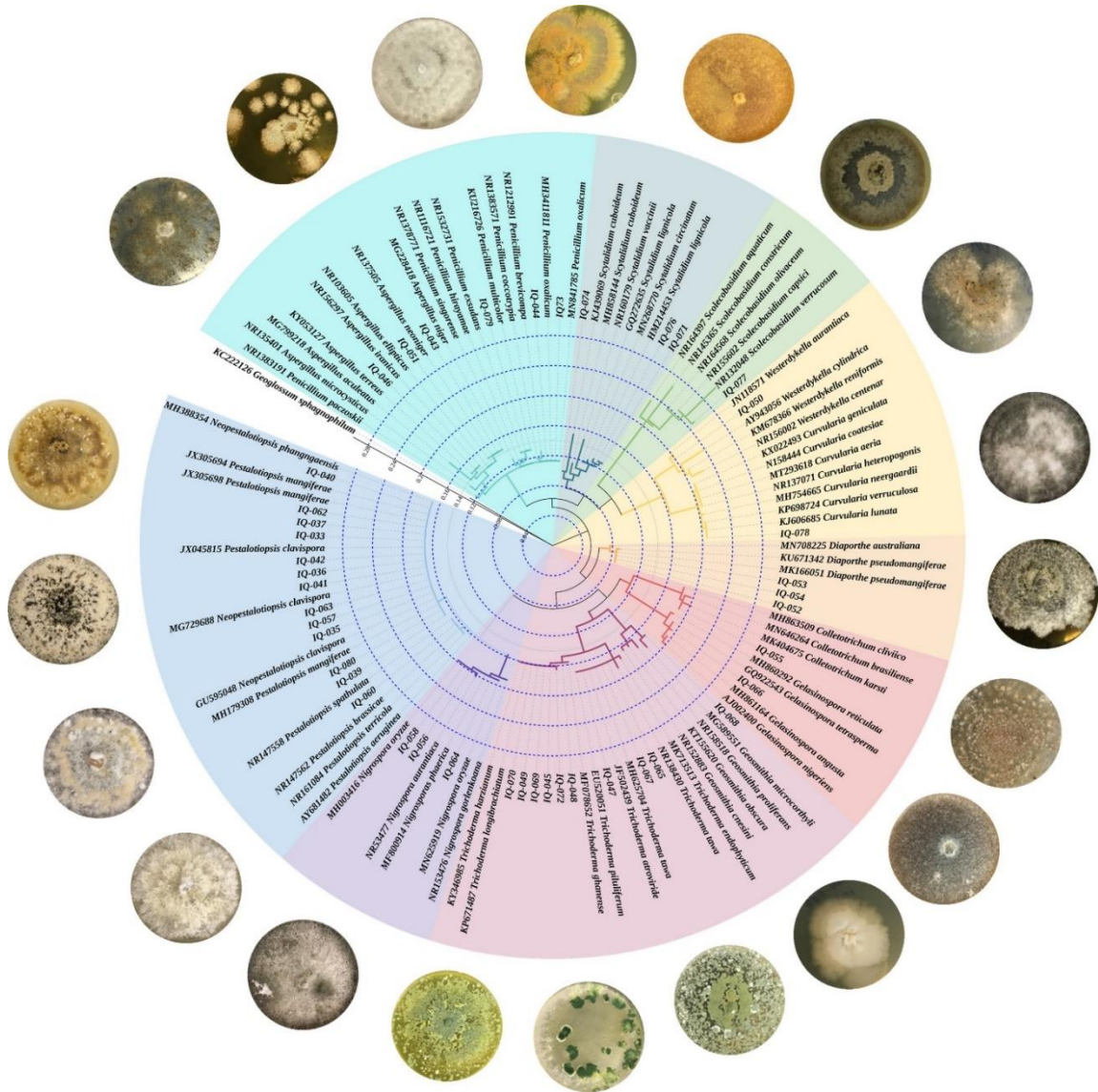


**Tabla 2.** Lista de hongos aislados del manglar ubicado en la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz, México.

Sustrato	Etiqueta del microorganismo
Tallo de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> )	IQ-033, IQ-035, IQ-036, IQ-037, IQ-039
Corteza de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> )	IQ-040, IQ-041
Ostión en tallo de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> )	IQ-042, IQ-043, IQ-044
Tallo de mangle negro ( <i>Avicennia germinans</i> )	IQ-057, IQ-058
Corteza de mangle negro ( <i>Avicennia germinans</i> )	IQ-060, IQ-062, IQ-063 IQ-064, IQ-065 IQ-066
Hojas de mangle negro ( <i>Avicennia germinans</i> )	IQ-052, IQ-053 IQ-054, IQ-055, IQ-056
Sedimento de manglar	IQ-045, IQ-046, IQ-047, IQ-048, IQ-049, IQ-050, IQ-051, IQ-067
Caparazón de cangrejo	IQ-068
Caparazón de ostión	IQ-069, IQ-70
Suelo de hormiguero	IQ-071, IQ-072, IQ-073, IQ-074, IQ-076, IQ-077, IQ-078, IQ-079, IQ-080

En relación con los hongos endófitos y aquellos aislados de sedimento de manglar, la clase con mayor número de aislamientos fúngicos fue Sordariomycetes, esta clase presenta el mayor registro de especies fúngicas que han sido aislados en manglares, de acuerdo con un trabajo que revisó la literatura reportada para estos microorganismos entre los años 1950 a 2020.<sup>54</sup> Consecutivamente, los órdenes que presentaron más registros fueron los Xylariales e Hypocreales (**Figura 26A**), y están incluidos entre los cinco ordenes donde se distribuye el mayor número de hongos de manglares.<sup>54</sup> *Trichoderma* fue el género más diverso (**Figura 26B**) y es uno de los ascomicetos más aislados en este tipo de muestras. Por otra parte, *Trichoderma* y *Geosmithia* fueron los géneros correspondientes a los hongos aislados en caparazones de ostión y cangrejo, respectivamente. La información disponible sobre la micobiota asociada a animales que habitan en manglares es escasa, no obstante, Ananda y colaboradores reportaron que *Corollospora intermedia* Schmidt y *Aspergillus* sp. fueron los hongos más aislados en caparazones de cangrejos colectados en humedales ubicados en Karnataka, India.<sup>94</sup> Finalmente, los registros fúngicos de la muestra de suelo de hormiguero fueron bastante diversos, se aislaron seis géneros, siendo *Scytalidium* el de

mayor incidencia. Hasta el momento, este trabajo representa el primer informe sobre hongos aislados en este tipo de muestras.



**Figura 25.** Árbol circular de máxima parsimonia (1000 pseudoreplicas de bootstrap) de la región ITS de los aislamientos fúngicos de las cepas aisladas. La secuencia ITS de *Geoglossum sphagnophilum* se usó como grupo externo. Las etiquetas de colores describen a los hongos a nivel de orden. El árbol fue editado con el servidor web Tree of Life (iTOL).<sup>70</sup> Se muestran fotografías selectas de los microorganismos correspondientes a cada orden taxonómico.

Cabe destacar que a partir de estas muestras se aisló un número importante de microorganismos de los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis*, sin embargo, la información obtenida de sus secuencias ITS no es concluyente, al agruparse todos en un

solo clado. Algunos autores reportan la distinción de estos dos géneros basándose en el color del pigmento conidial, los conidióforos y en análisis filogenéticos multilocus y por sus células medianas versicolares.<sup>95, 96</sup> Sin embargo, en este trabajo no se realizaron los análisis mencionados. No obstante, IQ-060 sí corresponde a una cepa del género *Pestalotiopsis* ya que se encuentra agrupado en un solo clado en el árbol filogenético. Interesantemente, este trabajo representa el primer reporte del aislamiento de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* en muestras de manglares de México.

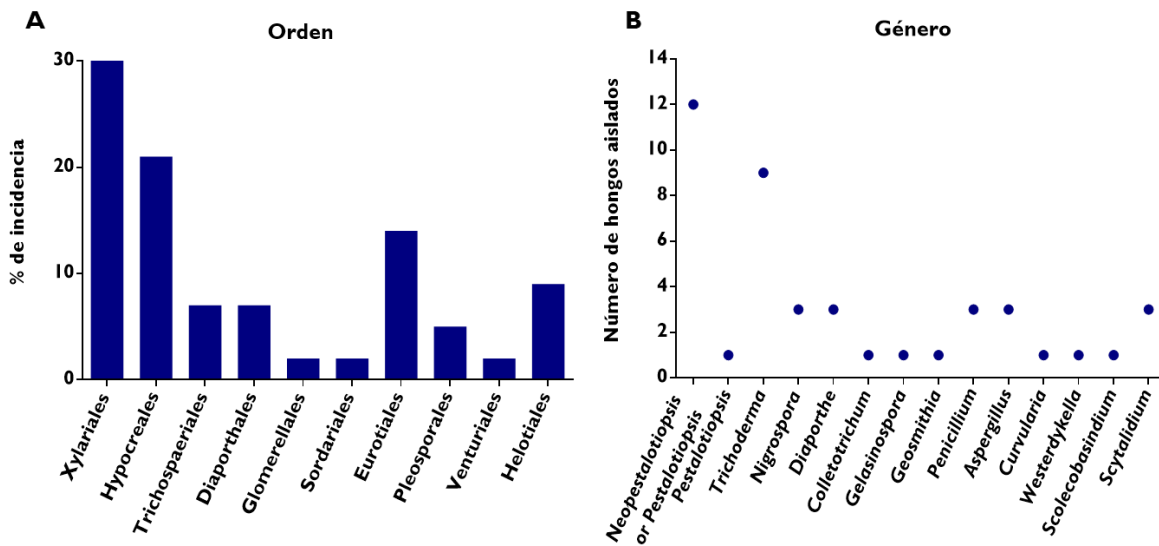
**Tabla 3.** Lista de hongos aislados de muestras de manglar de la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz, México.

Filo	Clase	Orden	Género	Clave alfanumérica	
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Geosmithia</i>	IQ-068	
			<i>Trichoderma</i>	IQ-045, IQ-047, IQ-048, IQ-049, IQ-065, IQ-067, IQ-069, IQ-070, IQ-072	
		Glomerellales	<i>Colletotrichum</i>	IQ-055	
		Sordariales	<i>Gelasinospora</i>	IQ-066	
		Trichosphaeriales	<i>Nigrospora</i>	IQ-056, IQ-058, IQ-064	
		Xylariales	<i>Pestalotiopsis</i>	IQ-060	
		Xylariales	<i>Pestalotiopsis</i> o <i>Neopestalotiopsis</i> *	IQ-037, IQ-062, IQ-033, IQ-035, IQ-036, IQ-039, IQ-040, IQ-041, IQ-042, IQ-057, IQ-063, IQ-080	
		Diaporthales	<i>Diaporthe</i>	IQ-052, IQ-053, IQ-054	
		Leotiomycetes	Helotiales	<i>Scytalidium</i>	IQ-071, IQ-074, IQ-076
		Dothideomycetes	Pleosporales	<i>Curvularia</i>	IQ-078
	<i>Westerdykella</i>			IQ-050	
	Venturiales		<i>Scolecobasidium</i>	IQ-077	
	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	IQ-043, IQ-046, IQ-051	
<i>Penicillium</i>			IQ-044, IQ-073, IQ-079		

\* Son necesarios análisis adicionales para poder especificar con certeza los microorganismos pertenecientes a los géneros *Pestalotiopsis* o *Neopestalotiopsis*, respectivamente.

De acuerdo con la literatura disponible, el primer estudio sobre la microbiota de manglares de México se realizó en 1968 por Kohlmeyer J.<sup>97</sup> En ese trabajo se describieron los hongos marinos aislados principalmente en México y Liberia, no obstante, la mayor cantidad de las cepas fueron obtenidas a partir de material vegetal de mangles. En relación con los hongos aislados de humedales de México, se describieron microorganismos fúngicos aislados a partir de sustratos de los mangles *Avicennia nitida* y *Rhizophora mangle* localizados

principalmente en manglares del golfo de México, distribuidos en el estado de Veracruz en los poblados de Alvarado, Boca del Rio, Casitas, San Agustín y una muestra más colectada en Puerto Arista, Chiapas. Se describieron nueve microorganismos, todos clasificados en el filo Ascomycota y distribuidos en dos clases principales, Sordariomycetes y Dothideomycetes, los microorganismos aislados fueron identificados como *Didymosphaeria*, *Keissleriella blepitarospora*, *Leptosphaeria avicenniae*, *Mycosphaerella pneumatophorae*, *Paraliomyces lentiferus*, *Cirrenalia pseudomacrocephala*, *Cirrenalia pygmaea*, *Calcialna achraspora* y *Phoma* sp. Desde entonces, hasta el año 2021 aproximadamente 59 taxones han sido reportados en nuestro País, principalmente en el Este de México y en el Caribe Mexicano.<sup>54, 97-104</sup> En su gran mayoría los microorganismos aislados corresponden al filo Ascomycota, una minoría al Basidiomycota (4 cepas) y sólo uno al Oomycota. Las clases más aisladas han sido Sordariomycetes, Dothideomycetes y Eurotiomycetes, consistente con nuestro estudio. Los órdenes Hypocreales, Glomerellales, Sordariales, Xylariales, Pleosporales y Eurotiales identificados en este estudio han sido previamente aislados en manglares mexicanos, no así, Trichosphaeriales, Diaporthales, Helotiales y Venturialeses. Esta investigación representa el primer reporte que describe la identificación de microorganismos de los géneros *Geosmithia*, *Gelasinospora*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Curvularia*, *Westerdykella*, y *Scolecobasidium* en muestras de manglares de México.<sup>28-35</sup> No obstante, existe un estudio sobre hongos cultivables presentes en sedimento de manglares de la Laguna Tampamachoco en Tuxpan-Veracruz,<sup>103</sup> los cuales correspondieron principalmente al filo Ascomycota, siendo aquellos del orden Hipocreales los que presentaron el mayor número de aislamientos, situación similar en nuestro estudio. Este escenario manifiesta la limitada investigación que se realiza en México sobre hongos de manglares, fuente potencial de PNs explotada alrededor del mundo.



**Figura 26.** A) Incidencia taxonómica de órdenes identificados en manglares de la Laguna de Tamiahua, El Ídolo, Veracruz (expresados como porcentaje del total [43]). B) Relación del número de cepas fúngicas aisladas por género.

## 5.2 Exploración de la diversidad química de los ascomicetos aislados

Los manglares son ecosistemas únicos y altamente biodiversos, ya que se encuentran en una zona de convergencia entre los ambientes terrestres y estuarinos costeros. El manglar es una importante fuente natural de alimentos y energía que alberga diversos microorganismos.<sup>105</sup> El 91% de esta biomasa microbiana está constituida por hongos y bacterias.<sup>50</sup> En particular, se considera que debido a los mecanismos de adaptación que desarrollan los hongos de manglares, éstos producen sustancias químicas únicas que podrían ser utilizadas en el descubrimiento de nuevos fármacos.<sup>56, 106</sup> Por las razones anteriores, la química de estos microorganismos ha sido investigada en varios trabajos a partir de 1989, cuando se reportó el aislamiento de las lactonas helicascolida A y B en el ascomiceto *Helicascus kanaloanus* obtenido de humedales Hawaianos.<sup>107</sup> Desde entonces y hasta el 2020, se han reportado aproximadamente 1387 PNs de hongos de manglares.<sup>106</sup>

Los estudios químicos sobre ascomicetos de manglares de México son limitados, sólo existe una publicación realizada por nuestro grupo de trabajo, en donde se reporta el aislamiento de butirolactona I a partir del microorganismo *Aspergillus terreus* (IQ-046),<sup>73</sup> una de las cepas estudiadas en este trabajo. Por esta razón, con el objetivo de generar

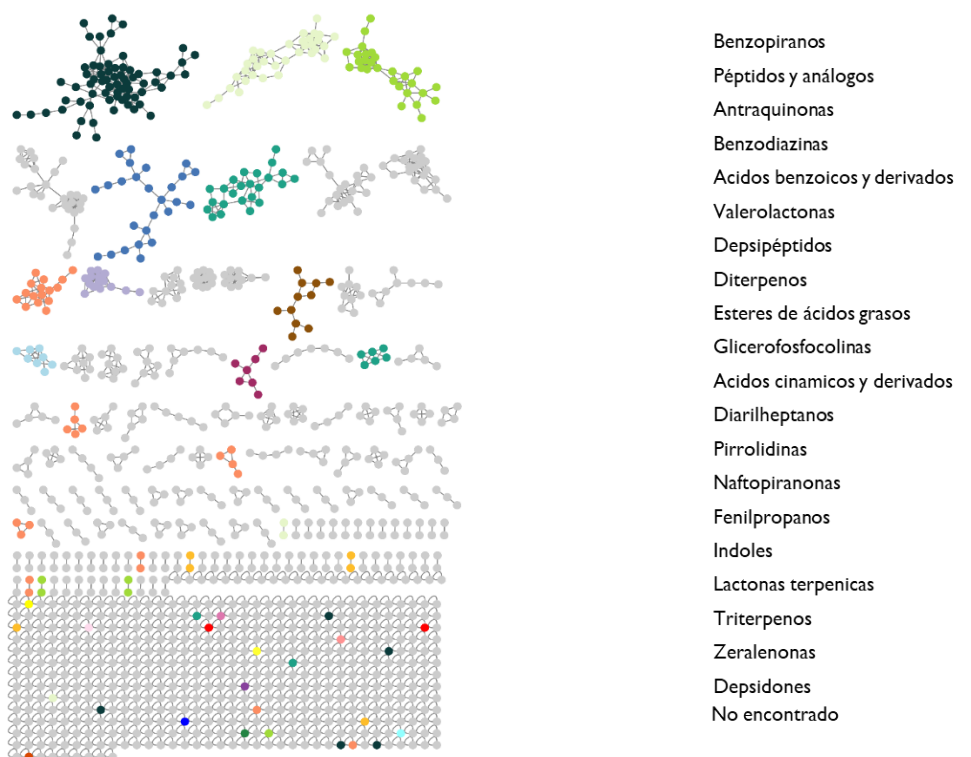
información sobre la química de ascomicetos obtenidos en manglares en México, se exploraron los PNs producidos por nuestra colección de hongos mediante un estudio de metabolómica no dirigida basado en datos de espectrometría de masas. Con este propósito, se empleó la herramienta web *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS, por sus siglas en inglés), una infraestructura interactiva que realiza análisis *in silico* de datos de espectrometría de masas en tándem (EM<sup>2</sup>). GNPS permite el alineamiento de espectros EM<sup>2</sup> creando redes moleculares (RMs) que agrupan compuestos con base en su similitud espectral, conectando dos o más nodos que probablemente representen estructuras químicas similares.<sup>39</sup> Asimismo, permite realizar análisis de desreplicación, comparando espectros EM<sup>2</sup> de moléculas presentes en una muestra con espectros de metabolitos depositados en su propia base de datos, la cual recopila espectros de masas EM<sup>2</sup> para más de 221,000 entidades químicas de referencia. Además, utiliza otras bibliotecas como MassBank y NP Atlas.

Las redes moleculares (RMs) clásicas realizadas en GNPS se construyeron con 15,921 espectros EM<sup>2</sup> resumidos en 1,257 nodos. El análisis *in silico* de las RMs utilizando el algoritmo MolNetEnhancer,<sup>79</sup> predijo una amplia gama de grupos estructurales distribuida en compuestos de tipo benzopirenos, péptidos y análogos, antraquinonas, benzodiazinas, ácidos benzoicos y derivados, valerolactonas, depsipéptidos, diterpenos, ésteres de ácidos grasos, glicerofosfocolinas, ácidos cinámicos y derivados, hidroxycumarinas, diarilheptanos, alquilpirrolidinas, pirrolidinas, naftopiranos, fenilpropanos, indoles, lactonas terpénicas, triterpenos, zeralenonas y depsidones (**Figura 27**). Sin embargo, existe un porcentaje alto de nodos que no fueron anotados con alguna clase estructural.

Además, mediante el análisis de desreplicación de las RMs, se logró identificar de manera presuntiva 19 PNs en seis géneros pertenecientes a la colección de aislamientos fúngicos (**Tabla 4**). En la **Figura 28** se presentan las estructuras químicas de las moléculas desreplicadas: oxalicina B (**1**), esclerotioramina (**2**), zearalenona (**3**), ocrefilona (**4**), ácido secálonico B (**5**), 7-butil-6,8-dihidroxi-3(R)-pent-11-enilisocroman-1-ona (**6**), lovastatina (**7**), butirolactona I (**8**), pirofeno (**9**), fonsecina (**10**), butirolactona III (**11**), malformina B4 (**12**), esterigmatocistina (**13**), beauvericina (**14**), 7-hidroxi-3-(2-hidroxipropil)-5-

metilisocromen-I-ona (**15**), hipomurocina A (**16**), tricolorzina IV (**17**), auranticina A (**18**) y pilobolusona C (**19**) (anotada manualmente). En la **Figura 29** se muestran ejemplos selectos de RMs con los correspondientes compuestos anotados en cada nodo.

Los PNs desreplicados han sido previamente reportados en ascomicetos. Los compuestos que se mencionan a continuación han sido previamente reportados en microorganismos de los géneros donde se detectaron en este trabajo: las moléculas **1-5** han sido aislados en cepas del género *Penicillium* spp., **7-12** son PNs habitualmente reportados en *Aspergillus* spp., **16** y **17** han sido aislados en cepas de *Trichoderma* spp., **18** ha sido aislado en *Westerdykella* sp.<sup>108-118</sup> Interesantemente, los compuestos **7, 8, 18** y **19** se aislaron en nuestro grupo de trabajo en las cepas donde fueron identificados,<sup>73</sup> demostrando la utilidad de GNPS en el proceso de desreplicación. Adicionalmente, se realizó la anotación manual de pilobolusona C (**19**) en el microorganismo *Westerdykella* sp. (IQ-050), este producto fue aislado previamente en esta cepa por un integrante de nuestro grupo de trabajo.<sup>119</sup>



**Figura 27.** Redes moleculares de 83 extractos de la colección de hongos cultivados en medios sólidos de arroz y cereal Cheerios® generados a partir de datos de EM<sup>2</sup> en GNPS y usando el algoritmo MolNetEnhancer.

**Tabla 4.** Relación de compuestos desreplicados usando GNPS.

Compuesto	Fórmula molecular	m/z experimental	m/z teórico	Aducto	RT	Etiqueta del microorganismo	Medio
<b><i>Penicillium</i> spp.</b>							
Oxalicina B (1)	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>7</sub>	520.2259	520.2329	[M + H] <sup>+</sup>	3.72	IQ-073	Cheerios®
Oxalicina B (1)	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>7</sub>	520.2280	520.2329	[M + H] <sup>+</sup>	3.71	IQ-073	Arroz
Esclerotioramina (2)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> ClNO <sub>4</sub>	390.1463	390.1466	[M + H] <sup>+</sup>	5.92	IQ-079	Arroz
Zearalenona (3)	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	319.1521	319.1540	[M + H] <sup>+</sup>	5.92	IQ-079	Cheerios®
Ocrefilona (4)	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	383.1814	383.1853	[M + H] <sup>+</sup>	7.21	IQ-079	Arroz
Ácido secalónico B (5)	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	639.1726	639.1708	[M + H] <sup>+</sup>	6.12	IQ-044	Arroz
Ácido secalónico B (5)	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	639.1639	639.1708	[M + H] <sup>+</sup>	6.13	IQ-073	Cheerios®
Ácido secalónico B (5)	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	639.1647	639.1708	[M + H] <sup>+</sup>	5.99	IQ-073	Arroz
7-butil-6,8-dihidroxi-3(R)-pent-1 I-enilisocroman-1-ona (6)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	305.1733	305.1747	[M + H] <sup>+</sup>	7.39	IQ-079	Cheerios®
7-butil-6,8-dihidroxi-3(R)-pent-1 I-enilisocroman-1-ona (6)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	305.1716	305.1747	[M + H] <sup>+</sup>	7.39	IQ-079	Arroz
<b><i>Aspergillus</i> spp.</b>							
Lovastatina (7)	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	405.2638	405.2635	[M + H] <sup>+</sup>	6.79	IQ-046	Arroz
Butirolactona I (8)	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	425.1625	425.1594	[M + H] <sup>+</sup>	5.40	IQ-046	Arroz
Pirofeno (9)	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	288.1246	288.1230	[M + H] <sup>+</sup>	3.6	IQ-051	Cheerios®
Fonsecina (10)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	273.0769	273.0757	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	4.3	IQ-043	Cheerios®
Butirolactona III (11)	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	441.1579	441.1543	[M + H] <sup>+</sup>	4.66	IQ-046	Arroz
Malformina B4 (12)	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	530.2467	530.2465	[M + H] <sup>+</sup>	5.04	IQ-043	Cheerios®

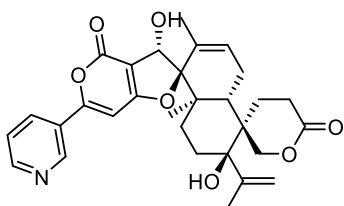




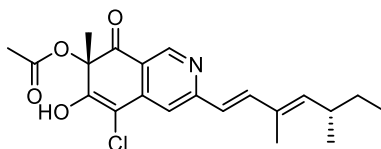
**Tabla 4. Continuación.** Relación de compuestos desreplicados usando GNPS.

Compuesto	Fórmula molecular	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórico	Aducto	RT	Etiqueta del microorganismo	Medio
<i>Trichoderma spp.</i>							
Hipomurocina A ( <b>16</b> )	C <sub>58</sub> H <sub>102</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1175.7754	1175.7762	[M + H] <sup>+</sup>	6.82	IQ-048	Arroz
Hipomurocina A ( <b>16</b> )	C <sub>58</sub> H <sub>102</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1175.7789	1175.7762	[M + H] <sup>+</sup>	6.66	IQ-049	Cheerios®
Hipomurocina A ( <b>16</b> )	C <sub>58</sub> H <sub>102</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1175.7702	1175.7762	[M + H] <sup>+</sup>	6.66	IQ-069	Cheerios®
Hipomurocina A ( <b>16</b> )	C <sub>58</sub> H <sub>102</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1175.7702	1175.7762	[M + H] <sup>+</sup>	6.66	IQ-069	Arroz
Tricorzina IV ( <b>17</b> )	C <sub>59</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1189.7927	1189.7918	[M + H] <sup>+</sup>	6.86	IQ-049	Cheerios®
Tricorzina IV ( <b>17</b> )	C <sub>59</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1189.7853	1189.7918	[M + H] <sup>+</sup>	6.86	IQ-069	Arroz
Tricorzina IV ( <b>17</b> )	C <sub>59</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1189.7839	1189.7918	[M + H] <sup>+</sup>	6.87	IQ-070	Cheerios®
Tricorzina IV ( <b>17</b> )	C <sub>59</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1189.7871	1189.7918	[M + H] <sup>+</sup>	6.85	IQ-070	Arroz
Tricorzina IV ( <b>17</b> )	C <sub>59</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	1189.7970	1189.7918	[M + H] <sup>+</sup>	6.86	IQ-045	Cheerios®
<i>Westerdykella sp.</i>							
Auranticina A ( <b>18</b> )	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	441.1540	441.1543	[M + H] <sup>+</sup>	5.78	IQ-050	Cheerios®
Auranticina A ( <b>18</b> )	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	441.1540	441.1543	[M + H] <sup>+</sup>	5.78	IQ-050	Arroz
Pilobolusona C ( <b>19</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	445.6360	445.1705	[M + H] <sup>+</sup>	4.89	IQ-050	Arroz

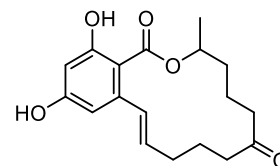
**Penicillium spp.**



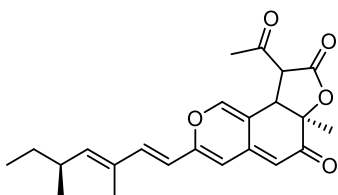
Oxalicina B (1)



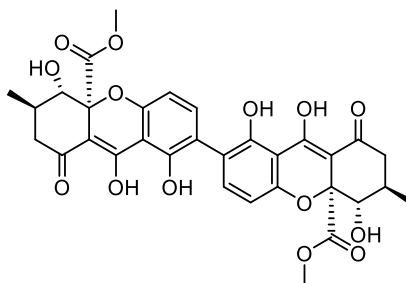
Esclerotioramina (2)



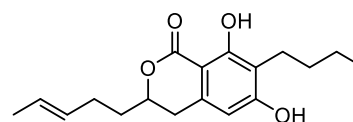
Zearalenona (3)



Ocrefilona (4)

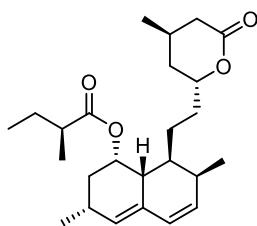


Ácido secalónico B (5)

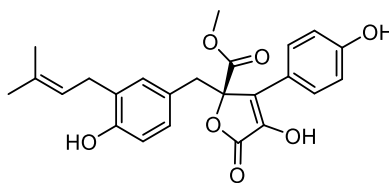


7-but-15-enil-6,8-dihidroxi-3(R)-pent-11-enilisochroman-1-ona (6)

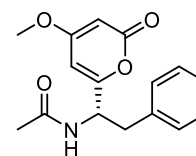
**Aspergillus spp.**



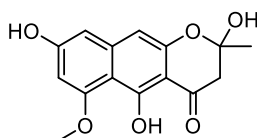
Lovastatina (7)



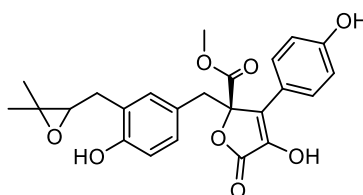
Butirolactona I (8)



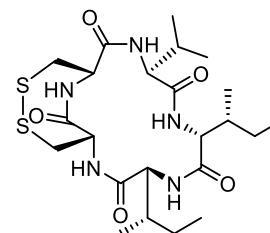
Pirofeno (9)



Fonsecaina (10)



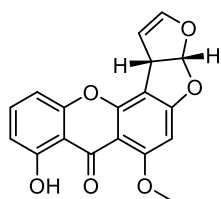
Butirolactona III (11)



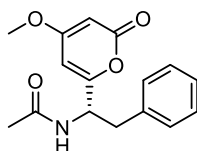
Malformina B4 (12)

**Figura 28.** Estructuras químicas de los compuestos identificados presuntamente utilizando la herramienta web GNPS.

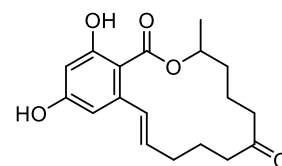
***Neopestalotiopsis* o *Pestalotiopsis* spp.**



Esterigmastocistina (13)

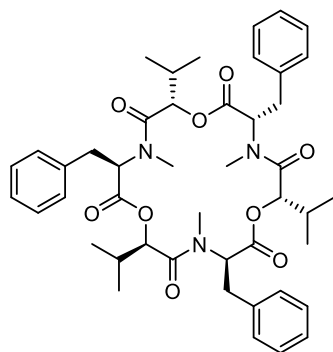


Piropeno (9)

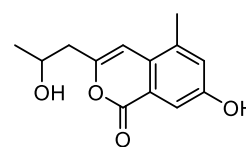


Zearalenona (3)

***Diaporthe* spp.**

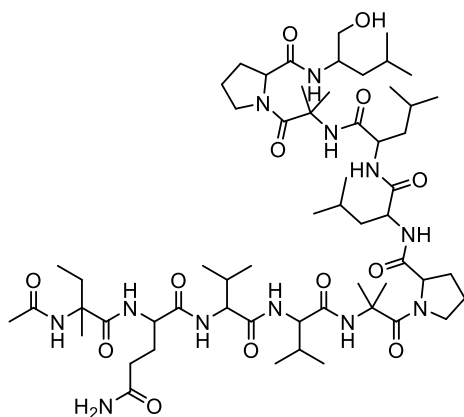


Beauvericina (14)

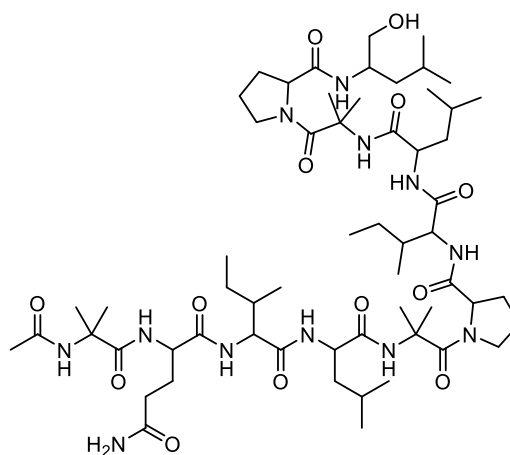


7-hidroxi-3-(2-hidroxiopropil)-5-metilisocromen-1-ona (15)

***Trichoderma* spp.**



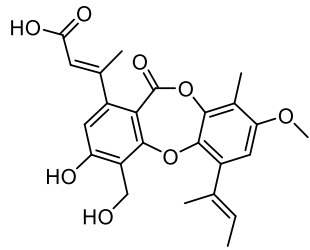
Hipomurocina A (16)



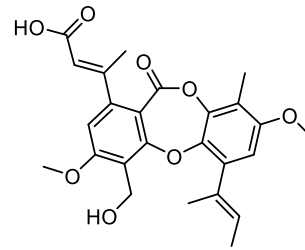
Tricorzina IV (17)

**Figura 28. Continuación.** Estructuras químicas de los compuestos identificados presuntamente utilizando la herramienta web GNPS.

**Westerdykella sp.**

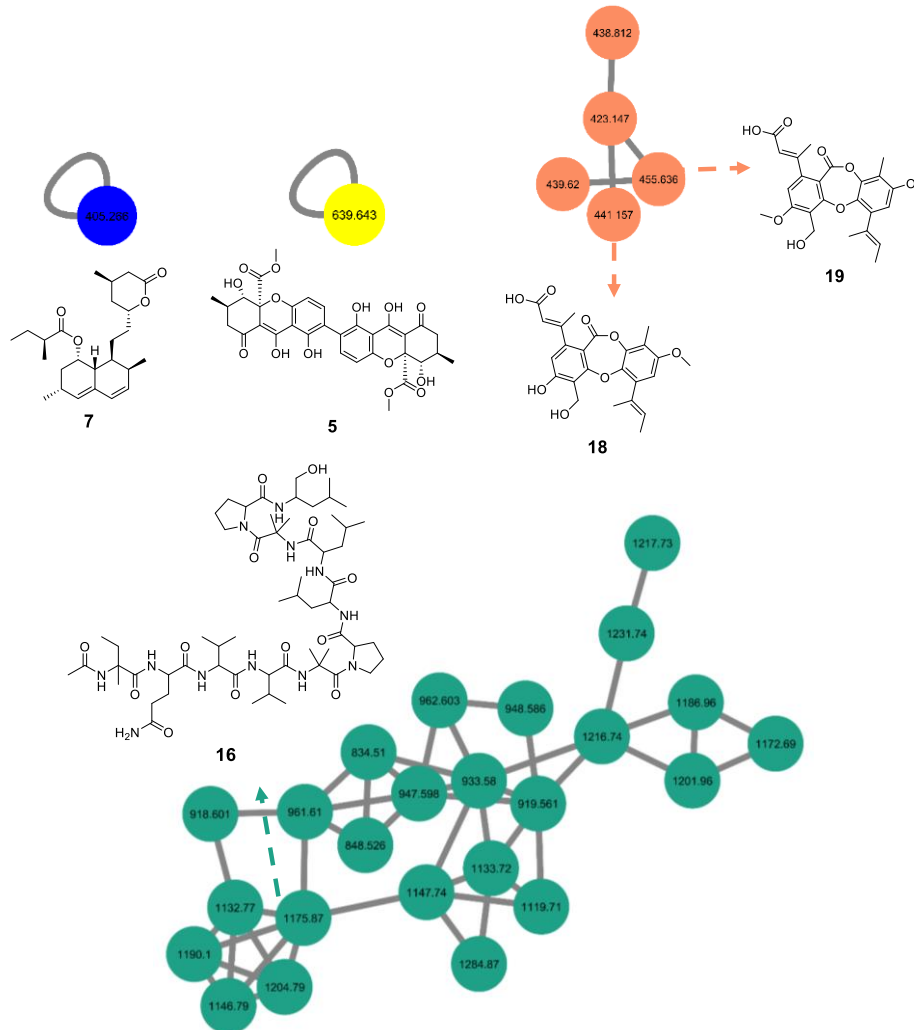


Auranticina A (18)



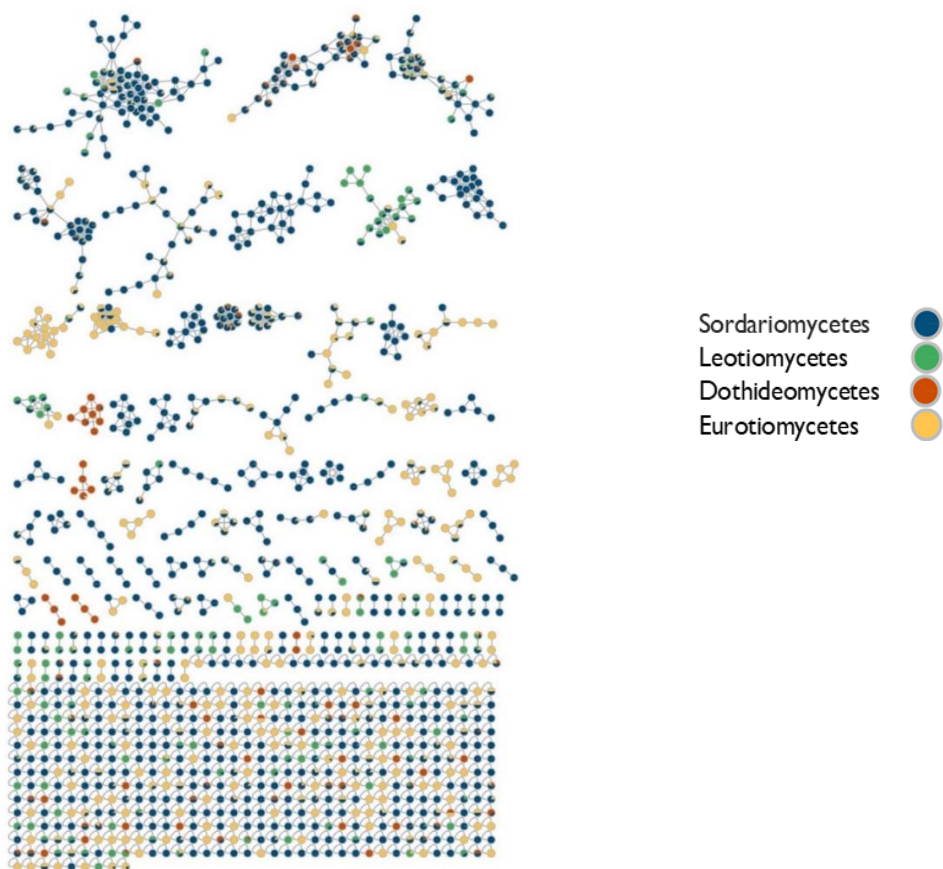
Pilobolusona C (19)\*

**Figura 28. Continuación.** Estructuras químicas de los compuestos identificados presuntamente utilizando la herramienta web GNPS. \*Compuesto anotado manualmente.



**Figura 29.** Ejemplos selectos de redes moleculares (RMs) con los respectivos compuestos fúngicos identificados presuntamente utilizando la plataforma web GNPS.

Por otro lado, con el fin de conocer la distribución de los metabolitos presentes a través de la taxonomía de las cepas fúngicas aisladas, se realizó el análisis de las RMs clasificándolas de acuerdo con la clase taxonómica de procedencia del extracto fúngico. Como se observa en la **Figura 30** las redes moleculares están formadas en su gran mayoría por nodos que pertenecen a metabolitos presentes en hongos de la clase de los Sordariomycetes, este resultado no es de extrañarse, puesto que el 70% de los aislamientos fúngicos corresponden a hongos clasificados en dicha clase taxonómica.



**Figura 30.** Redes moleculares clásicas de 83 extractos de la colección de hongos cultivados en medios sólidos de arroz y cereal Cheerios® generados en GNPS a partir de datos de EM<sup>2</sup>, las RMs fueron clasificadas de acuerdo con su clase taxonómica.

### 5.3 Cribado de actividad biológica

Con propósitos de bioprospección, se realizó un cribado de actividad biológica de la colección de extractos fúngicos frente a dos dianas terapéuticas; la enzima *hPTPIB*<sub>1-400</sub> y un set de bacterias gramnegativas y grampositivas aisladas en muestras obtenidas de pacientes hospitalizados. En total se realizaron 664 ensayos biológicos considerando 83

extractos fúngicos (obtenidos a partir de las extracciones orgánicas de los hongos fermentados tanto en arroz como en cereal Cheerios®) y ocho dianas de estudio (una enzima y siete bacterias). Los resultados se analizaron mediante un mapa de calor (ensayos enzimáticos) y un análisis de conglomerados jerárquico presentado en forma de un mapa de calor con un dendrograma (ensayos antibacterianos). Estos análisis permiten encontrar patrones o grupos dentro de un conjunto de datos. El porcentaje de inhibición sobre las dianas de estudio se consideró como observaciones.

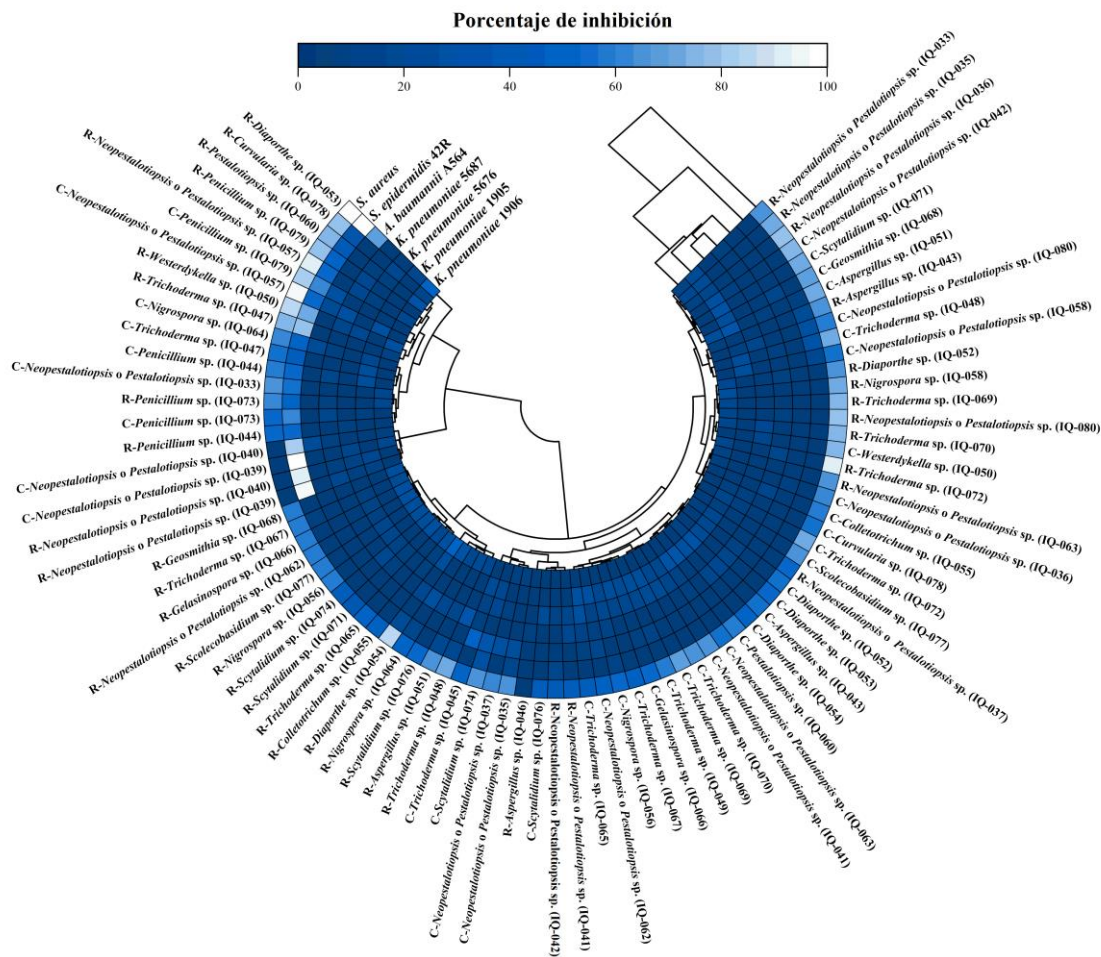
### 5.3.1 Inhibición de la $hPTPIB_{1-400}$

El mapa de calor realizado con los resultados de la inhibición de  $hPTPIB_{1-400}$  por los extractos fúngicos evaluados a una concentración final de 20  $\mu\text{g/mL}$  se muestra en la **Figura 31**. La mayor actividad inhibitoria frente a la  $hPTPIB_{1-400}$  se observó por los extractos derivados de *Nigrospora* sp. (IQ-064) y *Westerdykella* sp. (IQ-050) cultivadas en arroz, con inhibiciones del 93% y el 91%, respectivamente. Además, un grupo de 16 extractos inhiben la actividad fosfatasa de la  $hPTPIB_{1-400}$  en un rango de porcentajes del 70-89%: *Penicillium* spp. (IQ-044 e IQ-073), *Neopestalotiopsis* spp, y *Pestalotiopsis* spp. (IQ-035 e IQ-036), *Scolecobasidium* sp. (IQ-077), *Trichoderma* spp. (IQ-047, IQ-065, IQ-067, IQ-069, IQ-070) y *Diaporthe* spp. (IQ-052, IQ-054). Cabe destacar que la mayoría de los extractos activos se obtuvieron a partir de cepas fúngicas cultivadas en arroz, lo que indica la eficacia de esta fuente de carbono como medio de cultivo de hongos para producir metabolitos secundarios activos dirigidos a esta enzima. Estos hallazgos enfatizan el potencial de los hongos de manglar aislados en este estudio como una fuente prometedora de inhibidores de la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ .





de sedimentos de manglares de la laguna costera de Tampamachoco, Veracruz frente a las líneas celulares tumorales A-549, HBL-100, HeLa, SWI573, T-47D y WiDr.<sup>103</sup>



**Figura 32.** Análisis de conglomerados jerárquico con mapa de calor de la actividad biológica de los extractos fúngicos (200 µg/mL) contra bacterias de aislamiento hospitalario. Cada celda coloreada del mapa corresponde al porcentaje de actividad de cada extracto. La técnica de agrupamiento utilizada fue el método de Ward utilizando una escala de distancia euclidiana. El gráfico se realizó en el programa OriginPro 2023b.

#### 5.4 Selección de las cepas fúngicas para su estudio químico

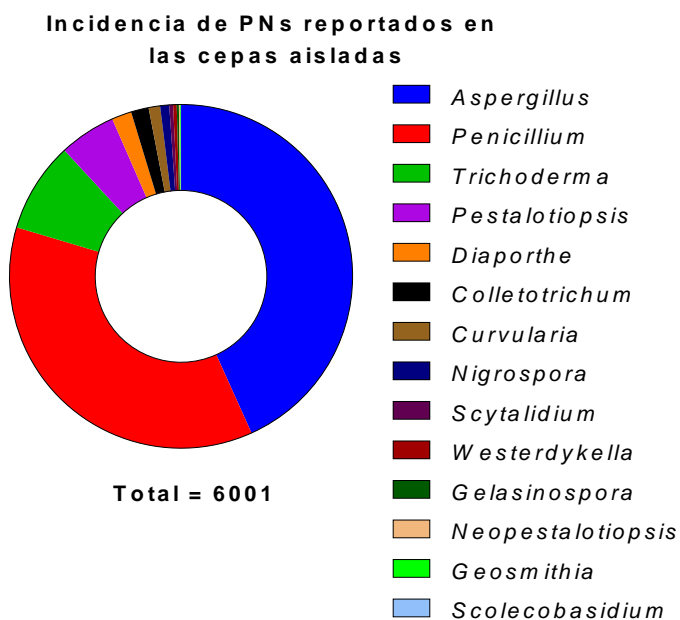
El redescubrimiento de PNs conocidos representa un obstáculo en este campo cada vez más difícil de superar utilizando las técnicas tradicionales de aislamiento (ensayos biodirigidos y estudio de muestras individuales).<sup>121</sup> En la actualidad, gracias al avance tecnológico, las estrategias y metodologías para el descubrimiento de nuevos PNs también

está cursando por una fase de innovación, donde los estudios genómicos y metabolómicos, así como la generación de bases de datos de PNs y de los BGCs que los codifican, tienen un papel protagónico. Las mejoras en la asequibilidad de estas herramientas permiten que más investigadores puedan implementarlas en su quehacer científico. Siguiendo este orden de ideas, en el presente trabajo se implementó una estrategia multi-informativa que integró tres niveles de información: taxonomía, metabolómica no dirigida y cribado de actividad biológica para seleccionar, dentro de una colección de cepas fúngicas de manglares, los dos microorganismos más adecuados para el descubrimiento de nuevos PNs o realizar su reposicionamiento.

La selección de los microorganismos fúngicos para su estudio químico se realizó siguiendo dos enfoques. El primero se basó en seleccionar a una cepa que tuviera pocos reportes de PNs aislados y con ello evaluar el potencial que tienen los hongos taxonómicamente poco estudiados en el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios. Para cumplir con este propósito, se realizó una búsqueda del número de PNs reportados para cada género de la colección de hongos aislados en este estudio (**Figura 33**). La revisión se realizó en dos bases de datos de PNs; el NPAtlas,<sup>122</sup> una librería de libre acceso que contiene estructuras químicas de compuestos aislados de microorganismos y en el Diccionario de Productos Naturales® (DNP, por sus inglés). Los microorganismos con el menor reporte de PNs en estas bases de datos son: *Nigrospora*, *Scytalidium*, *Westerdykella*, *Gelasinospora*, *Neopestalotiopsis*, *Geosmithia* y *Scolecobasidium*. El siguiente filtro se realizó considerando la actividad inhibitoria de los extractos fúngicos sobre la fosfatasa *hPTPIB<sub>1-400</sub>*. *Nigrospora* sp. (IQ-064) y *Westerdykella* sp. (IQ-050) fueron los microorganismos de donde se derivaron los extractos más activos (93 y 91% de inhibición), no obstante, *Westerdykella* sp. (IQ-050) ha sido estudiada químicamente en nuestro grupo de trabajo. De esta cepa se aislaron los compuestos auranticina A y pilobolusona C.<sup>123</sup> *Nigrospora* sp. (IQ-064) fue un buen candidato, se realizó su cultivo en mediana escala, sin embargo, no se logró hacer el aislamiento de sus PNs. Siguiendo estos criterios, se consideró como prioridad a *Scytalidium* sp. (IQ-074), cuyo extracto presentó moderada actividad frente a la *h-PTPIB<sub>1-400</sub>* (64% de inhibición). De este microorganismo se han aislado un menor número de productos naturales (22 PNs). *Scolecobasidium* sp. (IQ-077) también presenta buena actividad frente a la *hPTPIB<sub>1-400</sub>* (74% de inhibición), no obstante, al analizar su perfil químico por la plataforma

GNPS, se observa que esta cepa produce en su mayoría compuestos de naturaleza lipídica. Por las razones expuestas, *Scytalidium* sp. (IQ-074) fue la primera cepa seleccionada para su estudio químico. De acuerdo con el análisis de desreplicación a través de GNPS, en el extracto orgánico de *Scytalidium* sp. (IQ-074) no se identificó presuntivamente ningún PN.

Para la elección del segundo microorganismo, se consideró como único filtro el potencial de las cepas fúngicas de inhibir el crecimiento de las bacterias intrahospitalarias evaluadas en esta investigación, lo anterior debido a la urgencia en el desarrollo de nuevos antibióticos que puedan combatir el creciente problema de resistencia bacteriana a los antibióticos.<sup>62</sup> Por tal razón, el segundo microorganismo seleccionado fue *Diaporthe* sp. (IQ-053), una cepa fúngica cuyo extracto orgánico inhibe en un 70% el crecimiento bacteriano de la bacteria pandrogoresistente *A. baumannii* A564, resistente a los aminoglucósidos (amicacina y gentamicina), cefalosporinas [ceftazidim y cefepime], fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino), piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, trimetoprima/sulfametoxazol y minociclina, y que presenta resistencia intermedia a la colistina, un polipéptido cíclico de difícil acceso en México.<sup>120</sup> Además, las cepas *S. aureus* y *S. epidermidis* 42R fueron susceptibles al extracto orgánico de *Diaporthe* sp. (IQ-053). No se identificaron moléculas conocidas usando la plataforma GNPS para este microorganismo. Por otro lado, *Diaporthe* pertenece a uno de los géneros más estudiados, tan sólo en los años 2010 al 2019 se reportaron 335 metabolitos secundarios para este taxón y su anamorfo *Phomopsis*.<sup>124</sup> De este modo, se pretende contrastar los resultados del estudio de taxones menos explorados con aquellos géneros estudiados popularmente por tener una diversidad química elevada.

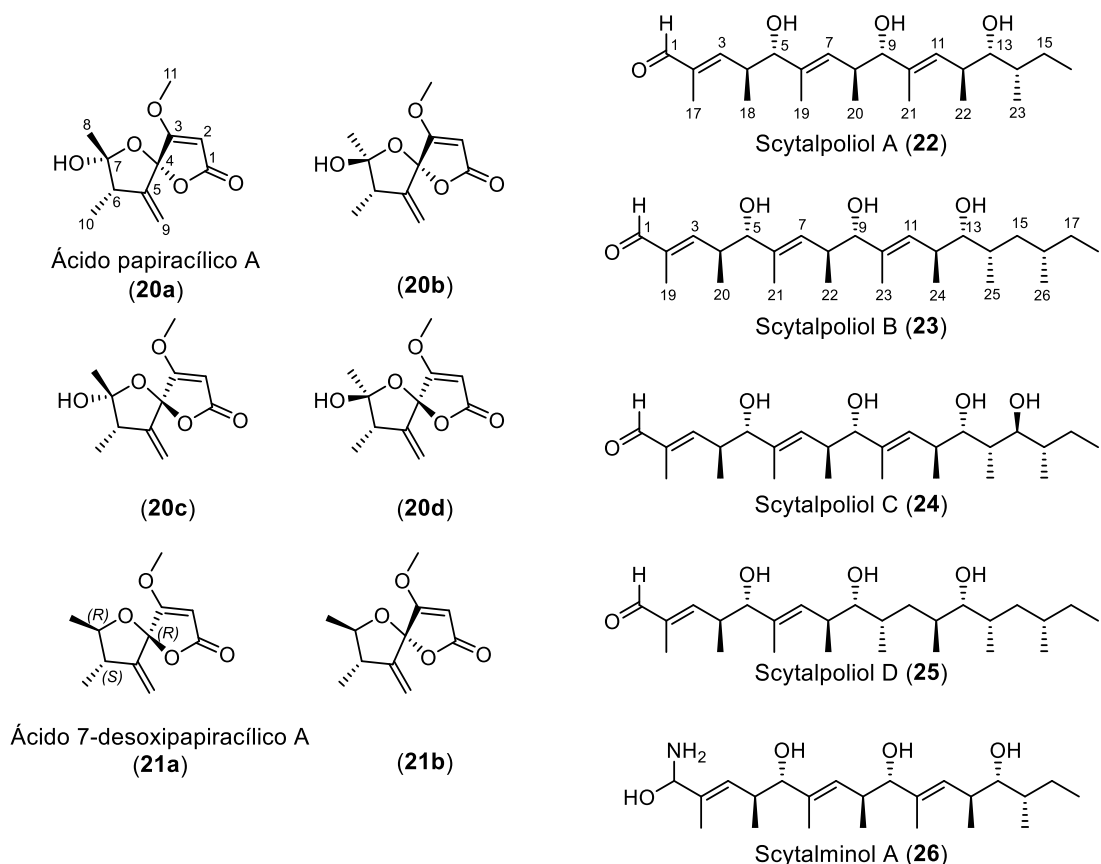


**Figura 33.** Gráfico circular que esquematiza la incidencia de PNs reportados en los géneros fúngicos aislados en este estudio de acuerdo con las bases de datos NP Atlas<sup>122</sup> y DPN®.

#### 5.4.1 Estudio químico de *Scytalidium* sp. (IQ-074)

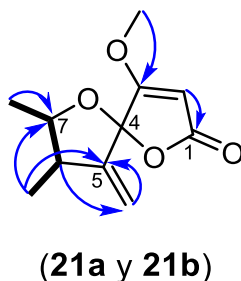
El estudio químico de *Scytalidium* sp. se realizó escalando el cultivo sólido de este hongo en cereal Cheerios®, se eligió esta condición debido a que el rendimiento del extracto es mayor en comparación con el obtenido cuando el hongo es cultivado en arroz (302.3 mg y 147.6 mg, respectivamente), además, la actividad inhibitoria *fla hPTP1B<sub>1-400</sub>* es la misma para ambos extractos (64 %). La obtención del extracto orgánico se realizó siguiendo el procedimiento de la sección 4.2 (Extractos fúngicos) del capítulo 1. Se obtuvieron 4.5 g de un extracto seco, del cual se fraccionaron 2.5 g mediante técnicas cromatográficas. De este procedimiento, se obtuvieron siete PNs, los cuales fueron caracterizados mediante el análisis de sus datos de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY y NOESY) y EM-AR-DART. Los compuestos identificados fueron una mezcla de cuatro diastereoisómeros del ácido papiracílico A (**20a-20d**)<sup>125</sup> y seis PNs nuevos: Dos diastereoisómeros del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**) y una serie de cinco policétidos lineales designados como scytalpolioles A (**22**), B (**23**), C (**24**), D (**25**) y el scytalminol A (**26**) (**Figura 34**). Cabe señalar que esta es la primera vez que se reportan este tipo de policétidos en una cepa del género *Scytalidium*.

El ácido papiracílico A (**20a-20d**) se aisló por primera en 1996 por Shan, *et al.*<sup>125</sup> Los reportes previos de la elucidación estructural de esta molécula por RMN indican que ésta se obtiene como una mezcla de cuatro diastereoisómeros (**20a-20d**) en una relación 1:1:2:4, congruente con los resultados obtenidos en este trabajo.<sup>125, 126</sup> Estas especies químicas coexisten en solución debido a un fenómeno de apertura tanto del acetal en C-4 como del hemiacetal en C-7, que dan origen a los diastereoisómeros 4S6S7R, 4S6S7S, 4R6S7R y 4R6S7S de la molécula. La configuración absoluta del isómero más abundante (**20a**), fue determinada previamente por Dai y colaboradores como 4S6S7R.<sup>126</sup> El ácido papiracílico A (**20a-20d**) ha sido aislado previamente en los microorganismos fúngicos: *Lachnum papyraceus*,<sup>125</sup> *Microsphaeropsis* sp. y *Ascochyta agropyrina* Var. *nana*.<sup>127</sup> Hasta el momento, esta es la primera vez que la mezcla de estos PNs (**20a-20d**) se reportan en el género *Scytalidium*.



**Figura 34.** Estructura química de los compuestos aislados de *Scytalidium* sp (IQ-074).

Los compuestos **21a** y **21b** fueron aislados como sólidos vítreos y consisten en una mezcla en relación 1:1 de diastereoisómeros del ácido 7-desoxipapiracílico A, determinado mediante un análisis detallado de su espectro de RMN-<sup>1</sup>H. La fórmula molecular de **21a** y **21b** se estableció como C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, basándose en el análisis del ion de la molécula protonada en *m/z* 211.0965 [M + H]<sup>+</sup> (calcd. para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 211.0970), lo que indica un índice de deficiencia de hidrógenos (DH) de cinco. Estos compuestos difieren del ácido papiracílico A (**20a–20d**) en que presentan la pérdida de un grupo hidroxilo en la posición C-7, resultando en un oximetino que tiene los desplazamientos químicos  $\delta_H/\delta_C$  4.50/80.5 y  $\delta_H/\delta_C$  4.56/79.4, para cada isómero. Además, sólo se observa una señal a  $\delta_C$  108.3 correspondiente a un carbono completamente sustituido, asignado para C-4. Los desplazamientos químicos para ambos isómeros del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**) se muestran en la **Tabla 5**. En la **Figura 35** se señalan las correlaciones más importantes observadas en los espectros bidimensionales HMBC y COSY para **21a** y **21b**.



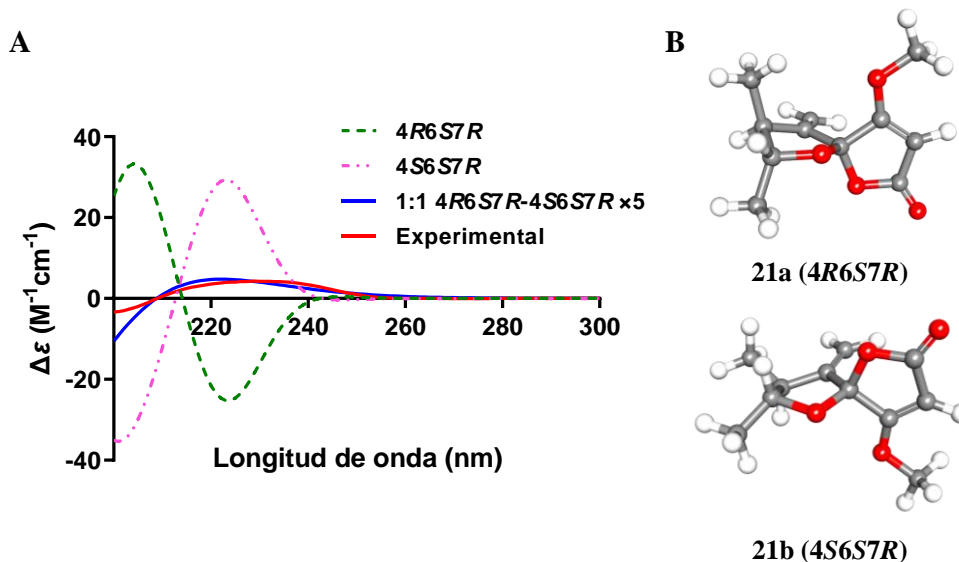
**Figura 35.** Correlaciones de HMBC ( ) y COSY ( ) del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21**).

**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de RMN registrados en CDCl<sub>3</sub> <sup>1</sup>H (700 MHz) y <sup>13</sup>C (175 MHz), para los diastereómeros del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**).

Posición	Tipo	<b>21a (4R6S7R)</b>		<b>21b (4S6S7R)</b>	
		$\delta_C$ ppm	$\delta_H$ ppm, mult. (J, Hz)	$\delta_C$ ppm	$\delta_H$ ppm, mult. (J, Hz)
1	C	170.4		169.9	
2	CH	88.8	5.07, s	90.6	5.15, s
3	C	178.3		176.7	
4	C	108.3		108.3	
5	C	149.2		150.9	
6	CH	40.3	3.01, m	41.5	2.92, m
7	CH	80.5	4.50, q (6.4)	79.4	4.56, q (6.4)
8	CH <sub>3</sub>	16.8	1.17, d (6.5)	15.8	1.21, d (6.5)
9	CH <sub>2</sub>	111.0	5.22, d (2.0)	110.9	5.23, d (2.0)
			5.22, d (2.0)		5.11, d (2.0)
10	CH <sub>3</sub>	12.3	1.12, d (6.9)	13.9	1.07, d (7.2)
11	CH <sub>3</sub>	59.8	3.87, s	59.8	3.89, s

La configuración absoluta de los diastereómeros del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21a** y **21b**) fue determinada usando una combinación de datos de DCE teóricos y experimentales (**Figura 36A**). Con este propósito, sólo se modelaron dos de los ocho posibles diastereoisómeros de **21**, los isómeros 4S6S7R y 4R6S7. Se ha informado previamente que los espirocetales simples como el ácido exogónico son predominantemente mezclas de los diastereoisómeros *R* y *S* en el carbono espiro de la fracción 1,6-dioxaspiro[4.4]nonano.<sup>128</sup> El espectro DCE calculado para el diastereoisómero 4R6S7R muestra un efecto Cotton positivo y otro negativo a 204 y 223 nm, respectivamente. Por el contrario, para el diastereoisómero 4S6S7R los efectos Cotton fueron opuestos, pero de diferente magnitud. Los espectros DCE generados para la mezcla 1:1 de ambos diastereoisómeros (4S6S7R y 4R6S7R) mostraron un efecto Cotton positivo amplio entre 210-250 nm, el cual está en concordancia con la curva experimental.

El conjunto de datos de RMN para el compuesto **21a** se asignó al diastereoisómero 4R6S7R, en el que CH<sub>3</sub>-8 y C-7 están en posición *cis* al oxígeno del segundo anillo (**Figura 36B**), y resuenan en un campo más bajo que cuando son *cis* a C-3, de acuerdo con las reglas empíricas establecidas por Kitching y colaboradores.<sup>129</sup> Con base en lo anterior, los datos de RMN para **21b** se asignaron al diastereoisómero 4S6S7R (**Figura 36B**).



**Figura 36.** A) Comparación entre los espectros de DCE experimentales (línea roja) y calculados (línea azul) para una mezcla 1:1 de los diastereoisómeros 4R6S7R (**21a**) y 4S6S7R (**21b**). Las líneas discontinuas verde y rosa representan los espectros de DCE calculados para **21a** y **21b**, respectivamente. B) Estructuras optimizadas (DFT-B3LYP/6-31G\*) para los compuestos **21a** y **21b**.

Los scytalpolioles A-D (**22-25**) y el scytalminol A (**26**) son policétidos lineales que contienen una serie de dobles enlaces y grupos hidroxilo y metilo como sustituyentes en la cadena principal. La elucidación estructural de estos compuestos se estableció mediante el análisis de los datos de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC y COSY) y EM-AR-DART. Estos datos presentan similitud con los reportados para los pestalpolioles.<sup>130,131</sup> Los pestalpolioles tienen un grupo cetona al inicio de la cadena, mientras que los scytalpolioles presentan un grupo aldehído. No obstante, un octavo pestalpoliol descrito, el pestalpoliol I,<sup>132</sup> aislado de otra cepa de *Pestalotiopsis*, presenta un grupo aldehído al inicio de la cadena del policétido, sin embargo, difiere estructuralmente de los scytalpolioles al perder el grupo metilo en el carbono C-6, rompiendo la sustitución secuencial de metilos 1-3. Adicionalmente, presenta una hidroxilación en uno de los grupos metilos sustituyentes al final de la cadena.

El scytalpoliol A (**22**) fue aislado como un polvo blanco. Su fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4$  de acuerdo con los datos de EM-AR-DART para el aducto de amonio de la molécula, observado en una relación  $m/z$  de 398.32668  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ ; su fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4$  (calcd. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{NO}_4^+$  398.3270), indicando un índice de deficiencia de hidrógenos (IDH) de cuatro. El análisis de los espectros RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Tablas 6 y 7) indicaron la presencia de un hidrógeno muy desprotegido



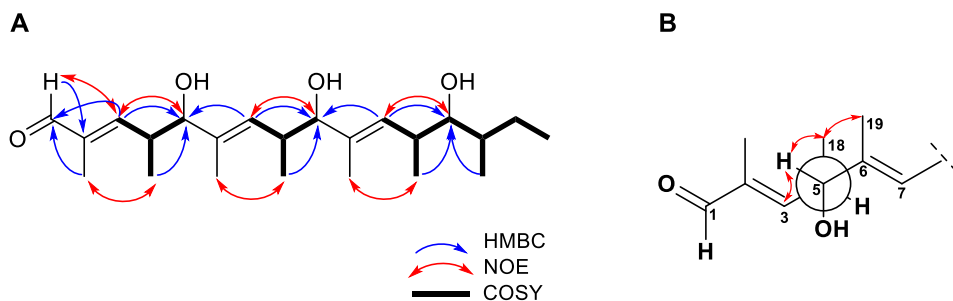
pertenciente a un grupo aldehído ( $\delta_H/\delta_C$  9.42/195.9), tres hidrógenos olefínicos ( $\delta_H/\delta_C$  6.44/158.5, 5.30/131.5, 5.23/130.2), tres metinos alifáticos oxigenados ( $\delta_H/\delta_C$  3.83/81.2, 3.78/83.0, 3.19/78.2), además de tres metinos alílicos ( $\delta_H/\delta_C$  2.81/36.8, 2.67/35.0, 2.52/35.8), un metileno alifático ( $\delta_H/\delta_C$  1.36/27.4), más un metino alifático ( $\delta_H/\delta_C$  1.54/35.9) y ocho metilos ( $\delta_H/\delta_C$  0.91/17.6, 0.84/16.9, 0.88/16.4, 1.62/13.0, 0.90/12.3, 0.83/11.7, 1.63/10.5, 1.77/9.6). Asimismo, se observan las señales de tres carbonos totalmente sustituidos que incluyen a los carbonos vinílicos C-2, C-6, C-10 ( $\delta_C$  139.9, 138.2, 137.1). La conexión de los sustituyentes en la molécula se elucidó mediante el análisis de los espectros bidimensionales. El espectro COSY muestra tres sistemas de espín; el primero comienza con el hidrógeno del metino CH-3 y se extiende hasta el metino oxigenado CH-5, incluyendo la correlación con los hidrógenos del metilo CH<sub>3</sub>-18; el siguiente sistema corresponde al fragmento de los metinos CH-7 al H-9 conectándose con el metilo CH<sub>3</sub>-20 y finalmente, el sistema de espín que incluye al metino alílico CH-11 y se extiende hasta los hidrógenos del CH<sub>3</sub>-23 incluyendo la correlación con los hidrógenos del metilo CH<sub>3</sub>-22. El análisis del espectro HMBC confirmó las conexiones establecidas con el espectro COSY y estableció las correlaciones <sup>2</sup>J y <sup>3</sup>J claves para conectar las estructuras identificadas: CH-5 con C-6, CH-7 y CH<sub>3</sub>-19; CH-9 con C-10 y CH<sub>3</sub>-21; CH-11 con CH-9; CH-12 con CH-11 y CH<sub>2</sub>-15 con CH-14 (**Figura 37A**). De acuerdo con las correlaciones NOESY representadas en la **Figura 37A**, se determinó que los dobles enlaces en **22** tenían una configuración *E*. Esta situación también se presenta en los compuestos **23-26**. Del mismo modo, la configuración relativa del metilo (CH<sub>3</sub>-18) en C-4 y el grupo hidroxilo en C-5 se dedujo mediante una inspección minuciosa de las constantes de acoplamiento <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y las correlaciones NOESY de los hidrógenos en estos estereocentros (**Figura 37B**) (el mismo razonamiento se utilizó en los compuestos restantes, **23-26**).<sup>133</sup> La constante de acoplamiento de 9.0 Hz observada entre los metinos CH-4 y CH-5 confirmó una relación *anti* entre el metilo CH<sub>3</sub>-24 y el grupo hidroxilo en CH-5. Un análisis similar se aplicó para establecer la configuración relativa entre los grupos metilo e hidroxilo en las unidades restantes de esta molécula.

**Tabla 6.** Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **22**, **23**, **24**, **25** y **26**.

Posición	<b>22<sup>a,c</sup></b>		<b>23<sup>a,c</sup></b>		<b>24<sup>a,c</sup></b>		<b>25<sup>a,c</sup></b>		<b>26<sup>b,d</sup></b>	
	Tipo	$\delta_{\text{C}}$	Tipo	$\delta_{\text{C}}$	Tipo	$\delta_{\text{C}}$	Tipo	$\delta_{\text{C}}$	Tipo	$\delta_{\text{C}}$
1	CH	195.9	CH	195.8	CH	195.9	CH	195.6	C	82.7
2	C	139.9	C	139.4	C	139.4	C	139.9	C	136.4
3	CH	158.5	CH	158.6	CH	158.3	CH	157.2	CH	135.3
4	CH	36.8	CH	36.7	CH	36.7	CH	37.3	CH	36.7
5	CH	83.0	CH	82.9	CH	83.2	CH	82.3	CH	84.3
6	C	137.1	C	137.5	C	136.2	C	136.3	C	137.8
7	CH	131.5	CH	130.8	CH	133.6	CH	132.3	CH	133.5
8	CH	35.0	CH	35.0	CH	35.1	CH	35.6	CH	37.0
9	CH	81.3	CH	80.4	CH	83.4	CH	80.3	CH	84.1
10	C	138.2	C	138.8	C	137.0	CH	32.8	C	137.1
11	CH	130.2	CH	129.3	CH	132.6	CH <sub>2</sub>	37.0	CH	132.8
12	CH	35.8	CH	35.8	CH	33.9	CH	33.6	CH	36.7
13	CH	78.2	CH	77.1	CH	81.1	CH	79.3	CH	79.4
14	CH	35.9	CH	30.67	CH	37.5	CH	32.0	CH	38.2
15	CH <sub>2</sub>	27.4	CH <sub>2</sub>	41.5	CH	75.8	CH <sub>2</sub>	41.6	CH <sub>2</sub>	27.8
16	CH <sub>3</sub>	12.3	CH	31.5	CH	35.2	CH	31.5	CH <sub>3</sub>	12.0
17	CH <sub>3</sub>	9.6	CH <sub>2</sub>	29.8	CH <sub>2</sub>	25.2	CH <sub>2</sub>	29.2	CH <sub>3</sub>	13.1
18	CH <sub>3</sub>	16.4	CH <sub>3</sub>	11.5	CH <sub>3</sub>	11.2	CH <sub>3</sub>	11.6	CH <sub>3</sub>	17.7
19	CH <sub>3</sub>	10.5	CH <sub>3</sub>	9.7	CH <sub>3</sub>	9.6	CH <sub>3</sub>	9.7	CH <sub>3</sub>	11.4
20	CH <sub>3</sub>	17.6	CH <sub>3</sub>	16.4	CH <sub>3</sub>	16.3	CH <sub>3</sub>	16.6	CH <sub>3</sub>	17.8
21	CH <sub>3</sub>	13.0	CH <sub>3</sub>	10.5	CH <sub>3</sub>	10.7	CH <sub>3</sub>	11.4	CH <sub>3</sub>	11.6
22	CH <sub>3</sub>	16.9	CH <sub>3</sub>	17.7	CH <sub>3</sub>	17.3	CH <sub>3</sub>	17.7	CH <sub>3</sub>	18.0
23	CH <sub>3</sub>	11.7	CH <sub>3</sub>	13.6	CH <sub>3</sub>	11.0	CH <sub>3</sub>	12.8	CH <sub>3</sub>	13.6
24	-	-	CH <sub>3</sub>	16.6	CH <sub>3</sub>	16.8	CH <sub>3</sub>	16.2	-	-
25	-	-	CH <sub>3</sub>	12.9	CH <sub>3</sub>	11.1	CH <sub>3</sub>	13.4	-	-
26	-	-	CH <sub>3</sub>	19.5	CH <sub>3</sub>	15.5	CH <sub>3</sub>	19.8	-	-

<sup>a</sup>Registrado en  $\text{CDCl}_3$ , <sup>b</sup> en  $\text{MeOH-}d_4$ .

<sup>c</sup>Registrado a 100 MHz, <sup>d</sup> a 175 MHz.



**Figura 37.** A) Correlaciones espectroscópicas bidimensionales (HMBC, NOE y COSY) claves para el compuesto **22**. B) Rotámero de los centros asimétricos C-4 y C-5, esquematizando las correlaciones NOE.

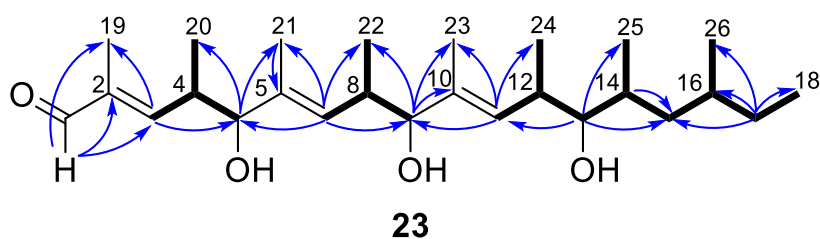
**Tabla 7.** Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H para los compuestos **22**, **23**, **24**, **25** y **26**.

Posición	<b>22</b> <sup>a,c</sup>	<b>23</b> <sup>a,c</sup>	<b>24</b> <sup>a,c</sup>	<b>25</b> <sup>a,c</sup>	<b>26</b> <sup>b,d</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ , (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , (J en Hz)
1	9.42, s	9.41, s	9.40, s	9.43, s	4.22, s
3	6.44, dd (9.4, 1.1)	6.44, dd (9.4, 1.5)	6.38, d (9.3)	6.46, dd (9.7, 1.1)	5.32, d (9.3)
4	2.81, m	2.82, m	2.8, m	2.89, ddq (9.7, 8.4, 6.9)	2.64, m, superpuesto
5	3.78, d (9.0)	3.77, d (9.2)	3.75, d (9.6)	3.91, d (8.4)	3.71, d (9.3)
7	5.30, d (11.2)	5.32, dd (9.9, 1.6)	5.19, d (9.2)	5.41, brd (9.7)	5.29, dd (9.5, 1.5)
8	2.67, m	2.69, m	2.52, m	2.63, ddq (9.7, 7.1, 6.8)	2.64, m, superpuesto
9	3.83, d (9.3)	3.90, d (5.3)	3.60, d (9.1)	3.25, dd (7.1, 3.8)	3.69, d (9.0)
10	-	-	-	1.74, m	-
11	5.23, d (10.0)	5.26, d (10.0)	5.19, d (9.2)	1.10, superpuesto 1.68, superpuesto	5.36, dd (9.5, 1.6)
12	2.52, m	2.52, m	1.86, m	1.63, m	2.64, m, superpuesto
13	3.19, dd (9.3, 2.0)	3.15, dd (9.5, 2.0)	3.29, dd (8.4, 2.4)	3.12, dd (7.7, 3.5)	3.23, dd (6.8, 4.6)
14	1.54, m	1.77, m	1.60, m, superpuesto	1.77, superpuesto	1.51, m
15	1.36, m	1.41, m 1.02, m	3.67, d (br)	1.01, m 1.33, m	1.46, m 1.26, m
16	0.90, t (7.0)	1.41, m	2.52, m	1.42, m	0.91, t (7.3)
17	1.77, d (1.0)	1.30, m 1.11, m	1.75, m, superpuesto 1.16, m	1.06, m 1.32, m	1.75, s
18	0.84, d (6.6)	0.83, t (7.2)	0.91, t (7.3)	0.86, t (7.4)	0.81, d (6.3)
19	1.63, d (1.1)	1.77, d (1.3)	1.75, s (br)	1.79, d (1.2)	1.67, d (1.3)
20	0.91, d (6.3)	0.84, d (7.6)	0.83, d (6.2)	0.93, d (6.9)	0.79, d (6.3)
21	1.62, d (1.3)	1.62, d (1.3)	1.61, s (br)	1.68, d (1.3)	1.65, d (1.6)
22	0.88, d (6.8)	0.97, d (6.9)	0.69, d (6.6)	0.95, d (6.8)	0.92, d (6.8)
23	0.83, d (6.8)	1.61, d (1.3)	1.61, s (br)	0.89, d (6.4)	0.91, d (6.7)
24	-	0.89, d (6.6)	0.81, d (6.2)	0.82, d (6.4)	-
25	-	0.82, d (6.9)	1.00, d (7.0)	0.83, d (6.5)	-
26	-	0.84, d (7.2)	0.81, d (6.2)	0.85, d (6.4)	-

<sup>a</sup>Registrado en CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> en MeOH-d<sub>4</sub>.

<sup>c</sup>Registrado a 400 MHz, <sup>d</sup> a 700 MHz.

De acuerdo con los datos espectroscópicos, el compuesto **23** presenta el mismo núcleo estructural que el **22**, con una ampliación de la cadena principal de 16 a 18 carbonos. Además, se añade un grupo metilo en C-16, resultando en 26 carbonos, consistente con la fórmula molecular  $C_{26}H_{46}O_4$  (que indica un índice de deficiencia de hidrógeno de cuatro) determinada por el análisis EM-AR-DART a partir del aducto de amonio  $m/z$  440.3723  $[M + NH_4]^+$  (calcd. para  $C_{26}H_{50}NO_4^+$  440.3739). Los espectros de RMN ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC, HMBC y COSY) fueron similares a los obtenidos para **22**. La diferencia radica en los desplazamientos químicos de los sustituyentes alifáticos que se encuentran al final de la cadena, indicando la presencia de un metino CH-16 ( $\delta_H/\delta_C$  1.41/31.5), un metileno  $CH_2$ -17 ( $\delta_H/\delta_C$  1.30, 1.11/29.8), y dos grupos metilo  $CH_3$ -18 y  $CH_3$ -26 ( $\delta_H/\delta_C$  0.83/11.5 y 0.84/19.5, respectivamente). Los datos espectroscópicos de **23** se presentan en las **Tablas 6 y 7**. Las correlaciones HMBC y COSY claves para elucidar la estructura química de **23** se muestran en la **Figura 38**.

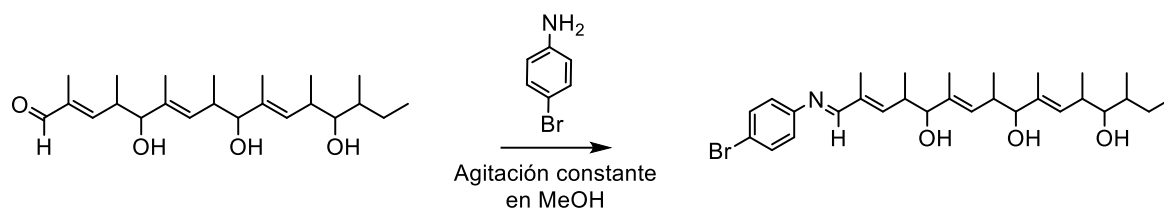


**Figura 38.** Correlaciones claves de HMBC (  $\curvearrowright$  ) y COSY ( — ) del scytopoliol B (**23**).

Las fórmulas químicas de los compuestos **24** y **25** se establecieron mediante el análisis de los datos de EM-AR-DART a partir de los iones de las moléculas protonadas en  $m/z$  439.3421  $[M + H]^+$  y 425.36118  $[M + H]^+$ , respectivamente (calcd. para  $C_{26}H_{47}O_5$  439.3423 y  $C_{26}H_{49}O_4$  425.3630 para los compuestos **24** y **25**). El scytopoliol C (**24**) únicamente difiere en la adición de un grupo hidroxilo en C-15 ( $\delta_H/\delta_C$  3.67/ 75.8), mientras que el scytopoliol D (**25**) experimenta una reducción en C-10, dando lugar a un metino CH-10 ( $\delta_H/\delta_C$  1.74/32.8) y un metileno  $CH_2$ -11 ( $\delta_H/\delta_C$  1.10, 1.68/37.0). Los datos espectroscópicos de RMN para ambos scytopolios se presentan en las **Tablas 6 y 7**.

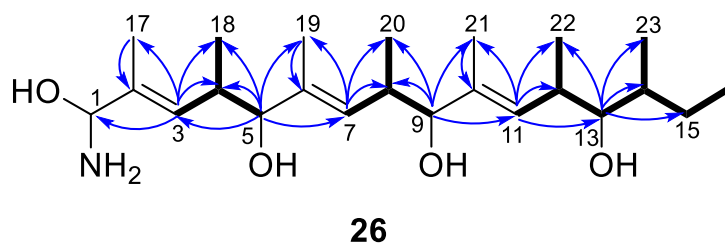
Con el objetivo de conocer la configuración absoluta de los centros estereogénicos de los scytopolios, se intentó cristalizar al scytopoliol A (**22**) para conocer su estructura en 3D. Se realizaron diversos ensayos de cristalización mediante difusión de vapor

utilizando las siguientes mezclas de disolventes: MeOH-H<sub>2</sub>O, MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y Hex-AcOEt. Además, se hicieron ensayos variando la temperatura. No obstante, los cristales obtenidos con este procedimiento no cumplieron con las características adecuadas para realizar el análisis estructural. Por tal razón, se realizó una derivatización con *p*-bromoanilina (**Figura 39**) para inducir la cristalización del producto **22**.<sup>134</sup> Sin embargo, no se tuvo éxito en esta tarea. Por lo tanto, en este trabajo sólo se reporta la configuración relativa para este conjunto de moléculas.



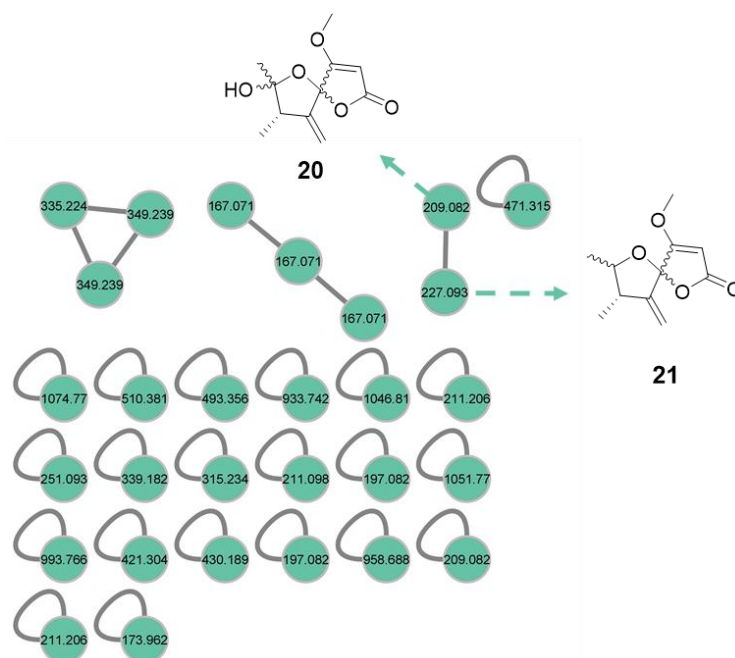
**Figura 39.** Derivatización de scytalpoliol A (**22**) con *p*-bromoanilina.

El compuesto **26** se aisló como un polvo amarillento. Su fórmula molecular se determinó como C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub> mediante el análisis de sus datos obtenidos por EM-AR-DART para la molécula protonada, con un valor *m/z* de 398.3268 (calcd. para C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> 398.3270), lo que indica un índice de deficiencia de hidrógeno de tres. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de este compuesto fueron similares a los de **22**; con excepción de la señal de hidrógeno correspondiente al aldehído (**Tablas 6 y 7**). En su lugar, se observó una señal en  $\delta_H/\delta_C$  4.22/82.7, correspondiente a un metino base de heteroátomo. La posición de este metino se confirmó por la correlación <sup>3</sup>J en el espectro HMBC entre el metino CH-3 con C-1 (**Figura S51**). La presencia del grupo amina se corroboró mediante cromatografía en capa fina utilizando una solución de ninhidrina (2,2-dihidroxiindan-1,3-diona) como agente revelador. Después de la elución y el calentamiento de la placa cromatográfica, se observó un cambio de coloración a azul-purpura para la banda correspondiente, evidenciando la reacción entre la ninhidrina y la amina primaria de la molécula.<sup>135</sup> Los datos espectroscópicos de **26** se muestran en las **Tablas 6 y 7**. Las correlaciones HMBC y COSY claves para elucidar la estructura química de **23** se muestran en la **Figura 40**.



**Figura 40.** Correlaciones de HMBC ( ) y COSY ( ) del scytalminol A (**26**).

Consecutivamente, se realizó un análisis de RMs del extracto orgánico de *Scytalidium* sp. (IQ-074) con el propósito de anotar los productos aislados en la base de datos de GNPS. Las RMs generadas en el modo clásico se presentan en la **Figura 41**. Únicamente, se observan los nodos correspondientes a los compuestos ácido papiracílico A (**20**; aducto  $[M^+ - OH]^+$   $m/z$  209.082) y al ácido 7-desoxipapiracílico A (**21**; aducto de amonio  $[M + NH_4]^+$   $m/z$  227.093). Los scytalpolioles A-D (**22-25**) y el scytalminol A (**26**) no fueron detectados mediante este análisis, probablemente debido a que las condiciones de análisis no son favorables para la correcta ionización de las moléculas.

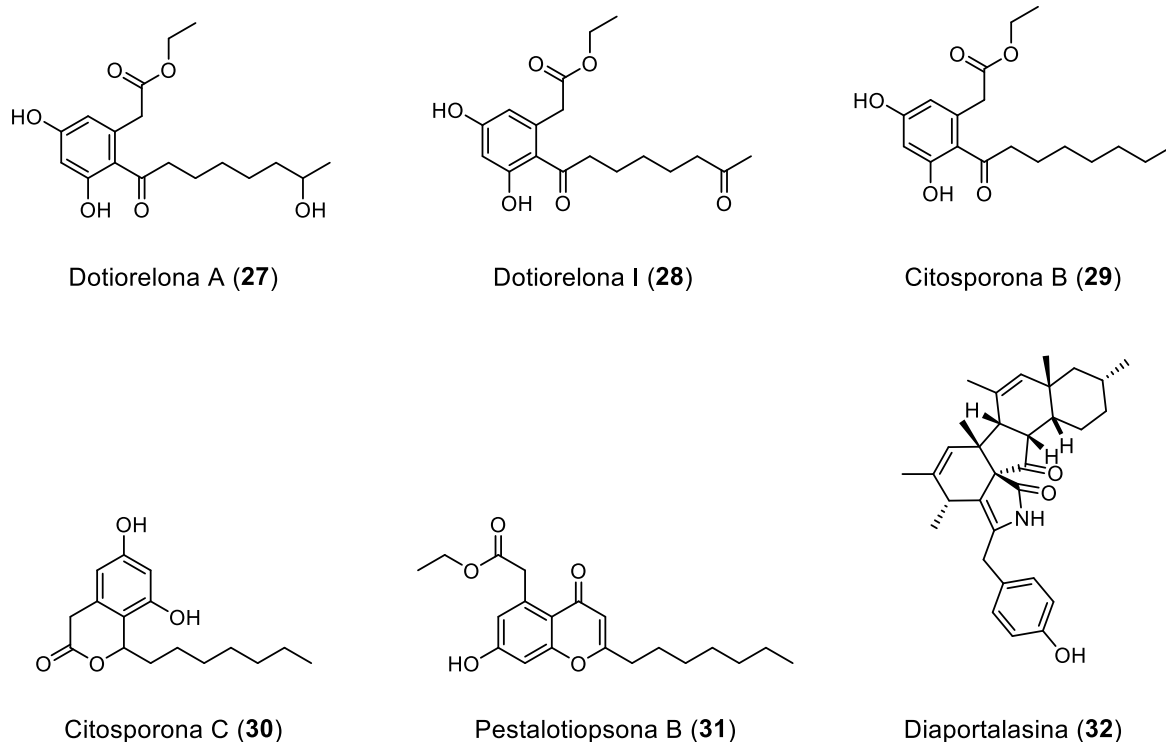


**Figura 41.** Redes moleculares del extracto orgánico de *Scytalidium* sp. (IQ-074).

#### 5.4.2 Estudio químico de *Diaporthe* sp. (IQ-053)

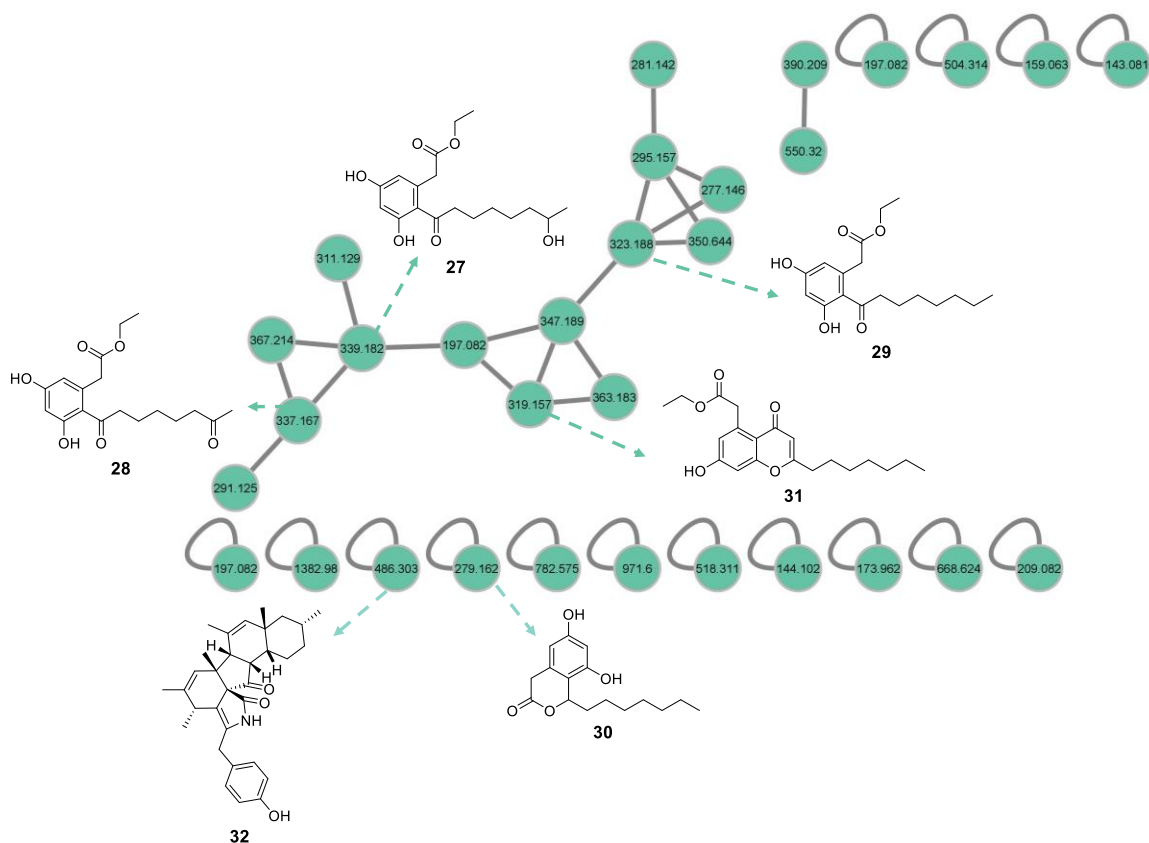
El extracto orgánico obtenido del microorganismo *Diaporthe* sp. (IQ-053) cultivado en arroz se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2. Se obtuvo un extracto

seco (998.9 mg) que fue fraccionado utilizando distintas técnicas cromatográficas. Este procedimiento condujo al aislamiento de seis productos naturales con reportes previos en cepas del género *Diaporthe*; los policétidos aromáticos con cadenas laterales dotiorelona A (**27**) e I (**28**)<sup>136</sup>, las citosporonas B (**29**) y C (**30**)<sup>137,138</sup>, la cromona pestalotiopsona B (**31**)<sup>139</sup> y la citocalasina diaportalasina (**32**)<sup>140</sup> (**Figura 42**). La elucidación estructural de estos compuestos se concretó comparando su información espectroscópica y espectrométrica (**Figuras S55 - S110** y **Tablas S2 – S7**) con datos descritos en la literatura.



**Figura 42.** Compuestos aislados del extracto orgánico del cultivo sólido en arroz de *Diaporthe* sp. (IQ-053).

A pesar de que los productos naturales aislados de *Diaporthe* sp. (IQ-053) fueron moléculas descritas previamente en la literatura, éstas no han sido anotadas en la plataforma GNPS. Esto demuestra que, aunque la plataforma es de gran utilidad, el enriquecimiento de su base de datos es una tarea en la que toda la comunidad científica debe contribuir. Por lo tanto, se realizó la anotación de los seis productos aislados de *Diaporthe* sp. (IQ-053) en esta plataforma. (**Figura 43**).



**Figura 43.** Redes moleculares del extracto orgánico de *Diaporthe* sp. (IQ-053). Todos los nodos anotados representan el ion de la molécula protonada  $[M + H]^+$ .

## 5.5 Evaluación biológica de los compuestos aislados.

A continuación, se describe el resultado de la actividad biológica de cada metabolito aislado.

### 5.5.1 Inhibición de la actividad inhibitoria de la enzima $hPTPIB_{1-400}$ por los compuestos aislados de *Scytalidium* sp. (IQ-074)

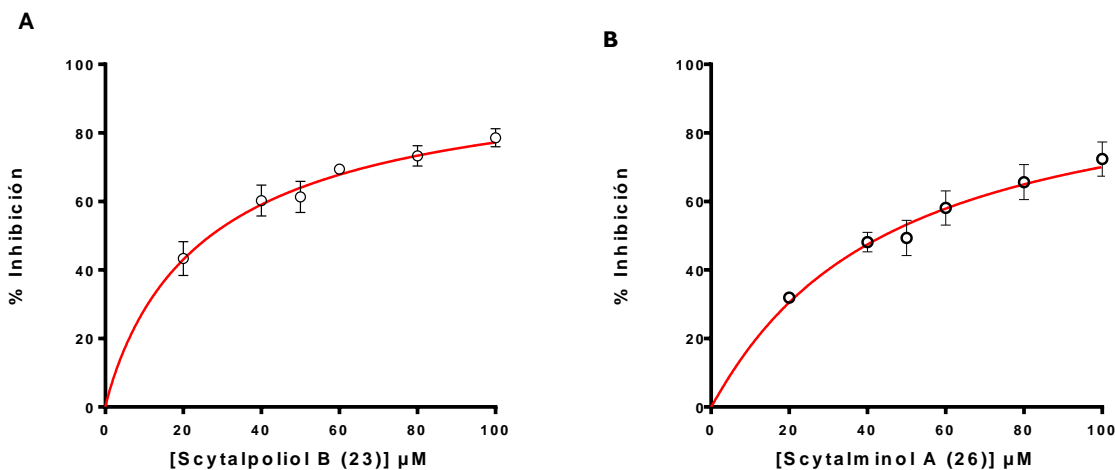
Mediante un ensayo espectrofotométrico se determinó la actividad inhibitoria de los compuestos **20-26** frente a la enzima  $hPTPIB_{1-400}$ . Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla 10**. Únicamente los metabolitos scytalpoliol B (**23**) y scytalminol A (**26**) presentaron inhibición aceptable sobre la  $hPTPIB_{1-400}$ , por lo cual se procedió a realizar el cálculo de la  $CI_{50}$  para cada producto. El scytalpoliol B (**23**) inhibió de manera dependiente de la concentración a la enzima  $hPTPIB_{1-400}$  con un valor de  $CI_{50}$  de  $27.0 \pm$



1.7  $\mu\text{M}$  (**Figura 44A**) siendo tan activo como el ácido ursólico ( $\text{CI}_{50} = 26.6 \mu\text{M}$ ) usado como control positivo.<sup>141</sup> Esta es la primera vez que se reporta un polienol (policétido lineal de tipo polioliol) como inhibidor de la PTPIB humana de cadena completa. Por otro lado, el scytalminol A (**26**) presentó una actividad moderada, con una  $\text{CI}_{50}$  de  $44.1 \pm 1.9$  (**Figura 44B**).

**Tabla 8.** Resultados de la actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios aislados de *Scytalidium* sp. (IQ-074) frente a la enzima  $h\text{PTPIB}_{1-400}$ .

Compuesto (100 $\mu\text{M}$ )	Porcentaje de inhibición
Ácido papiracílico A ( <b>20a – 20d</b> )	$32.9 \pm 4.0$
Ácido 7-desoxipapiracílico A ( <b>21a y 21b</b> )	$19.4 \pm 5.2$
Scytalpoliol A ( <b>22</b> )	$10.7 \pm 4.1$
Scytalpoliol B ( <b>23</b> )	$78.6 \pm 1.7$
Scytalpoliol C ( <b>24</b> )	$27.1 \pm 0.1$
Scytalpoliol D ( <b>25</b> )	$32.7 \pm 3.9$
Scytalminol A ( <b>26</b> )	$71.9 \pm 2.0$
Ácido ursólico	$26.6 \pm 2.5$



**Figura 44.** A) Curva concentración-respuesta de scytalpoliol B (**23**) y B) scytalminol A (**26**) frente a  $h\text{PTPIB}_{1-400}$ . Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

### 5.5.2 Actividad antibacteriana de los compuestos aislados de *Diaporthe* sp. (IQ-053)

Los PNs aislados derivado del estudio químico de *Diaporthe* sp. (IQ-053) fueron evaluados mediante el ensayo de microdilución en placas frente a las bacterias grampositivas *S. aureus* y *S. epidermidis* 42R y una bacteria gramnegativa pandrogoresistente, *Acinetobacter*

*baumanni* A564<sup>120</sup>. Solo se evaluaron las cepas anteriores, debido a que el resto no fue sensible al extracto de *Diaporthe* sp. (IQ-053). En la **Tabla 11** se muestran los resultados de la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los compuestos **27-32** evaluadas a una concentración de 50 µg/mL.

**Tabla 9.** Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de *Diaporthe* sp. (IQ-053).

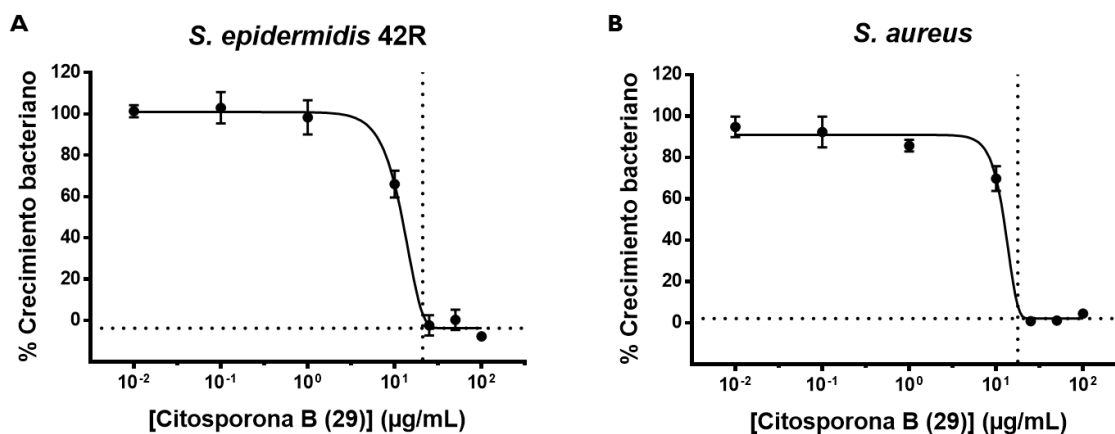
50 µg/mL	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 42R	<i>Acinetobacter baumannii</i> A564
<b>Dotiorelona A (27)</b>	10.1 ± 1.5	7.1 ± 1.1	N
<b>Dotiorelona I (28)</b>	N	26.5 ± 2.6	N
<b>Citosporona B (29)</b>	99.7 ± 0.2	99.8 ± 0.4	51.0 ± 1.3
<b>Citosporona C (30)</b>	N	56.2 ± 3.6	12.3 ± 5.0
<b>Pestalotiopsona B (31)</b>	N	20.9 ± 3.1	7.8 ± 3.6
<b>Diaportalasina (32)</b>	94.4 ± 0.7	99.3 ± 0.3	30.2 ± 3.4
<b>Gentamicina</b>	100 ± 0.1	100 ± 0.2	N

N: no presentó inhibición.

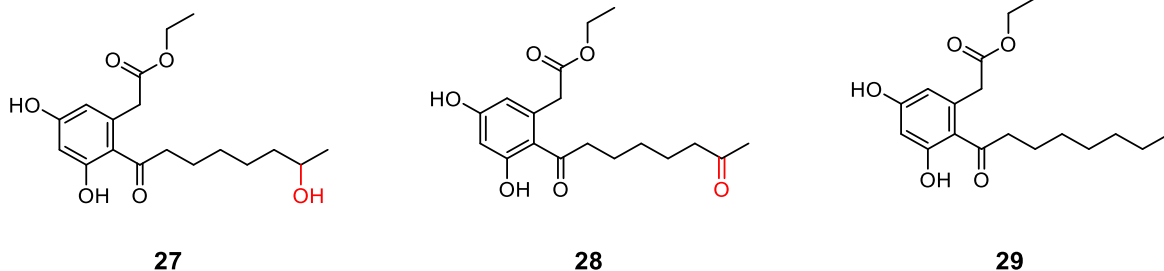
Como se observa en la **Tabla 9**, la citosporona B (**29**) y la diaportalasina (**32**) fueron los productos que presentaron la mejor actividad inhibitoria del crecimiento de las bacterias evaluadas, inhibieron en su totalidad el crecimiento de *S. epidermidis* 42R, **29** inhibió el crecimiento de *S. aureus*. Por lo tanto, se evaluó el valor de la CMI para citosporona B (**29**). El compuesto **29** presentó un valor de CMI = 21 ± 2.6 y 18 ± 2.9 µg/mL contra *S. epidermidis* 42R y *S. aureus*, respectivamente (**Figura 44**). Interesantemente, la citosporona B (**29**) inhibió moderadamente el crecimiento de *A. baumannii* A564 (51.0 ± 1.3%), una bacteria considerada como panresistente, la cual hace referencia a los microorganismos que son resistentes a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos. Por lo anterior, citosporona B (**29**) podría considerarse como un compuesto líder en el desarrollo de un nuevo antibiótico contra *A. baumannii* A564 e incluso puede proyectarse como un compuesto antibiótico de amplio espectro, al ser también un inhibidor del crecimiento de bacterias grampositivas. Adicionalmente, **29** no muestra efectos tóxicos en células HeLa en concentraciones que van de 25-100 µM.<sup>142</sup> Interesantemente, **29** ha mostrado inhibir el Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3) de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.<sup>142</sup> El SST3 es un importante factor de virulencia que se encuentra altamente conservado en varias

bacterias gramnegativas facilitando la invasión y diseminación bacteriana en el hospedero. No obstante, el sistema de secreción SST3 no es un sistema de secreción que esté codificado en *A. baumannii*,<sup>143</sup> sugiriendo que la inhibición del crecimiento de este microorganismo por la acción de **29** está mediada por un mecanismo de acción distinto.

Al comparar la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los policétidos estructuralmente similares **27**, **28** y **29** frente a *S. epidermidis* 42R se encontró una tendencia particular, como se observa en la **Figura 45** estos compuestos difieren únicamente en la sustitución del carbono C-15, a medida que la cadena lateral se vuelve más hidrofóbica la actividad de la molécula incrementa considerablemente (**Tabla 9**). La mejora observada podría estar relacionada con una mayor permeabilidad en las células bacterianas. Por lo tanto, una estrategia propuesta para potenciar la actividad de la citosporona B (**29**) sería aumentar el número de carbonos en su cadena lateral.



**Figura 45.** Inhibición del crecimiento de las bacterias A) *S. aureus* y B) *S. epidermidis* 42R por la citosporona B (0.1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Los valores corresponden a tres experimentos independientes. Las líneas verticales indican los valores de CMI determinados por la función Gompertz modificada.



**Figura 46.** Comparación estructural de tres policétidos aislados de *Diaporthe* sp. (IQ-053). A medida que la cadena lateral se vuelve más hidrofóbica, el compuesto experimenta una mejora significativa en su actividad como inhibidor del crecimiento bacteriano en las cepas de estudio.

Por otra parte, existen dos estudios previos sobre la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de la diaportalasina (**32**).<sup>140,144</sup> En el 2014 cuando se aisló por primera vez esta molécula se reportaron valores de CMI de 2  $\mu\text{g/mL}$  para las bacterias *S. aureus* y *S. aureus* resistente a la meticilina.<sup>140</sup> Tres años más tarde, otro estudio reveló que **32** presenta un valor de CMI de 4  $\mu\text{g/mL}$  para las bacterias *S. aureus* ATCC25923 y *S. aureus* resistente a la meticilina, dos veces mayor al reportado previamente.<sup>144</sup> No obstante, en nuestro estudio, **32** inhibió el crecimiento de *S. aureus* ( $94.4 \pm 0.7 \%$ ) a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ . A la misma concentración, **32** también inhibe el crecimiento *S. epidermidis* 42R ( $99.3 \pm 0.3 \%$ ). Consecutivamente, se ha reportado que diaportalasina **32** no presenta toxicidad en líneas celulares no cancerosas (células vero). Contrario a este resultado, la diaportalasina, otra citocalasina que difiere estructuralmente de la diaportalasina en el sustituyente del carbono C-3 (el cual presenta una hibridación  $sp^3$ ), inhibe la enzima CYP3A4 responsable del metabolismo de fármacos.<sup>145</sup>

## 6 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de este trabajo de investigación se pone de manifiesto que el escrutinio racional mediante la integración de tres niveles de información: taxonomía, metabolómica no dirigida y cribado de actividad biológica de un conjunto de microorganismos aislados de un nicho ecológico que albergue una comunidad activa de microbios que, por las condiciones bióticas y abióticas del mismo, tengan el potencial de producir una amplia gama de moléculas bioactivas con estructuras únicas, es una metodología útil en el descubrimiento de nuevos productos naturales (PNs) funcionales y en el reposicionamiento de PNs conocidos.

## 7 PERSPECTIVAS

- Identificar inequívocamente a nivel de género, los hongos *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis*.
- Realizar el estudio químico de *Nigrospora* sp. (IQ-064), un microorganismo que presenta excelente inhibición *in vitro* de la fosfatasa *hPTPIB<sub>1-400</sub>* (93%) y ha sido químicamente poco estudiado, a la fecha sólo se han aislado 51 PNs.
- Buscar las condiciones adecuadas para lograr obtener el cristal de los PNs nuevos (**21-26**) y con ellos conocer su configuración absoluta.
- Evaluar el mecanismo de inhibición de scytalpol B (**23**) sobre la *h-PTPIB<sub>1-400</sub>*.
- Preparar derivados semisintéticos de la citosporona B (**29**) y evaluar si su actividad antibacteriana mejora.
- Determinar el valor de CMI de **32** contra *S. epidermidis* 42R.
- Elucidar el posible mecanismo de acción de los compuestos **29** y **32** como agentes antibióticos.

## 8 REFERENCIAS

- (1) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr* **2017**, 5 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- (2) Phukhamsakda, C.; Nilsson, R. H.; Bhunjun, C. S.; De Farias, A. R. G.; Sun, Y.-R.; Wijesinghe, S. N.; Raza, M.; Bao, D.-F.; Lu, L.; Tibpromma, S.; et al. The numbers of fungi: contributions from traditional taxonomic studies and challenges of metabarcoding. *Fungal Divers* **2022**, 114 (1), 327-386. DOI: 10.1007/s13225-022-00502-3.
- (3) Li, Y.; Steenwyk, J. L.; Chang, Y.; Wang, Y.; James, T. Y.; Stajich, J. E.; Spatafora, J. W.; Groenewald, M.; Dunn, C. W.; Hittinger, C. T.; et al. A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. *Current Biology* **2021**, 31 (8), 1653-1665.e1655. DOI: 10.1016/j.cub.2021.01.074.
- (4) Robey, M. T.; Caesar, L. K.; Drott, M. T.; Keller, N. P.; Kelleher, N. L. An interpreted atlas of biosynthetic gene clusters from 1,000 fungal genomes. *Proc Natl Acad Sci* **2021**, 118 (19), e2020230118. DOI: 10.1073/pnas.2020230118.
- (5) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46 (1-3), 3-26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- (6) Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* **2011**, 2 (1), 87-95. DOI: 10.5598/imafungus.2011.02.01.12.
- (7) Huttner, A.; Bielicki, J.; Clements, M. N.; Frimodt-Møller, N.; Muller, A. E.; Paccaud, J.-P.; Mouton, J. W. Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clin Microbiol Infect* **2020**, 26 (7), 871-879. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.11.028.
- (8) El-Shaboury, S. R.; Saleh, G. A.; Mohamed, F. A.; Rageh, A. H. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* **2007**, 45 (1), 1-19. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.06.002.
- (9) Whitby, M. Fusidic acid in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **1999**, 12, S67-S71. DOI: 10.1016/S0924-8579(98)00075-2.
- (10) Koehler, P. J.; Isler, H. The early use of ergotamine in migraine. Edward Woakes' report of 1868, its theoretical and practical background and its international reception. *Cephalalgia* **2002**, 22 (8), 686-691. DOI: 10.1046/j.1468-2982.2002.00422.x.
- (11) Borel, J. F.; Kis, Z. L.; Beveridge, T. The history of the discovery and development of cyclosporine (Sandimmune®). *In The Search for Anti-Inflammatory Drugs: Case Histories from Concept to Clinic*, Birkhäuser Boston, **1995**; pp 27-63.
- (12) Stähelin, H. F. The history of cyclosporin A (Sandimmune®) revisited: Another point of view. *Experientia* **1996**, 52 (1), 5-13. DOI: 10.1007/bf01922409.

- (13) Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci* **1980**, *77* (7), 3957-3961. DOI: 10.1073/pnas.77.7.3957.
- (14) Balkovec, J. M.; Hughes, D. L.; Masurekar, P. S.; Sable, C. A.; Schwartz, R. E.; Singh, S. B. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®) a case study. *Nat Prod Rep* **2014**, *31* (1), 15-34. DOI: 10.1039/c3np70070d.
- (15) Strader, C. R.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fingolimod (FTY720): a recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *J Nat Prod* **2011**, *74* (4), 900-907. DOI: 10.1021/np2000528.
- (16) Rokas, A.; Mead, M. E.; Steenwyk, J. L.; Raja, H. A.; Oberlies, N. H. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Nat Prod Rep* **2020**, *37* (7), 868-878. DOI: 10.1039/c9np00045c.
- (17) Caesar, L. K.; Butun, F. A.; Robey, M. T.; Ayon, N. J.; Gupta, R.; Dainko, D.; Bok, J. W.; Nickles, G.; Stankey, R. J.; Johnson, D.; et al. Correlative metabologenomics of 110 fungi reveals metabolite–gene cluster pairs. *Nat Chem Biol* **2023**. DOI: 10.1038/s41589-023-01276-8.
- (18) Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; Supuran, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20* (3), 200-216. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z.
- (19) Noble, R. L. The discovery of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol* **1990**, *68* (12), 1344-1351.
- (20) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* **2016**, *79* (3), 629-661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- (21) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **2019**, *51*, 72-80. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- (22) Bode, H. B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* **2002**, *3* (7), 619-627. DOI: 10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9.
- (23) Albright, J. C.; Henke, M. T.; Soukup, A. A.; McClure, R. A.; Thomson, R. J.; Keller, N. P.; Kelleher, N. L. Large-scale metabolomics reveals a complex response of *Aspergillus nidulans* to epigenetic perturbation. *ACS Chem Biol* **2015**, *10* (6), 1535-1541. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00025.
- (24) Knowles, S. L.; Raja, H. A.; Roberts, C. D.; Oberlies, N. H. Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. *Nat Prod Rep* **2022**, *39* (8), 1557-1573. DOI: 10.1039/d1np00070e.

- (25) Goering, A. W.; McClure, R. A.; Doroghazi, J. R.; Albright, J. C.; Haverland, N. A.; Zhang, Y.; Ju, K.-S.; Thomson, R. J.; Metcalf, W. W.; Kelleher, N. L. Metabologenomics: Correlation of microbial gene clusters with metabolites drives discovery of a nonribosomal peptide with an unusual amino acid monomer. *ACS Cent Sci* **2016**, 2 (2), 99-108. DOI: 10.1021/acscentsci.5b00331.
- (26) Olivon, F.; Allard, P. M.; Koval, A.; Righi, D.; Genta-Jouve, G.; Neyts, J.; Apel, C.; Pannecouque, C.; Nothias, L. F.; Cachet, X.; et al. Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. *ACS Chem Biol* **2017**, 12 (10), 2644-2651. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00413.
- (27) Olivon, F.; Remy, S.; Grelier, G.; Apel, C.; Eydoux, C.; Guillemot, J. C.; Neyts, J.; Delang, L.; Touboul, D.; Roussi, F.; et al. Antiviral compounds from *Codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. *J Nat Prod* **2019**, 82 (2), 330-340. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00800.
- (28) Williams, A. N.; Sorout, N.; Cameron, A. J.; Stavrinides, J. the integration of genome mining, comparative genomics, and functional genetics for biosynthetic gene cluster identification. *Front Genet* **2020**, 11, 600116. DOI: 10.3389/fgene.2020.600116.
- (29) Rivera-Chávez, J.; Ceapă, C.-D.; Figueroa, M. Biological dark matter exploration using data mining for the discovery of antimicrobial natural products. *Planta Med* **2022**, 88 (09/10), 702-720. DOI: 10.1055/a-1795-0562.
- (30) Blin, K.; Shaw, S.; Kloosterman, A. M.; Charlop-Powers, Z.; van Wezel, G. P.; Medema, M. H.; Weber, T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res* **2021**, 49 (W1), W29-W35. DOI: 10.1093/nar/gkab335.
- (31) Navarro-Muñoz, J. C.; Selem-Mojica, N.; Mallowney, M. W.; Kautsar, S. A.; Tryon, J. H.; Parkinson, E. I.; De Los Santos, E. L. C.; Yeong, M.; Cruz-Morales, P.; Abubucker, S.; et al. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nat Chem Biol* **2020**, 16 (1), 60-68. DOI: 10.1038/s41589-019-0400-9.
- (32) Demarque, D. P.; Dusi, R. G.; De Sousa, F. D. M.; Grossi, S. M.; Silvério, M. R. S.; Lopes, N. P.; Espindola, L. S. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. *Sci Rep* **2020**, 10 (1). DOI: 10.1038/s41598-020-58046-y.
- (33) Avalon, N. E.; Murray, A. E.; Baker, B. J. Integrated metabolomic–genomic workflows accelerate microbial natural product discovery. *Anal Chem* **2022**, 94 (35), 11959-11966. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c02245.
- (34) Bauermeister, A.; Mannocho-Russo, H.; Costa-Lotufo, L. V.; Jarmusch, A. K.; Dorrestein, P. C. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. *Nat Rev Microbiology* **2022**, 20 (3), 143-160. DOI: 10.1038/s41579-021-00621-9.
- (35) Caesar, L. K.; Montaser, R.; Keller, N. P.; Kelleher, N. L. Metabolomics and genomics in natural products research: complementary tools for targeting new chemical entities. *Nat Prod Rep* **2021**, 38 (11), 2041-2065. DOI: 10.1039/d1np00036e.



- (36) Roberts, L. D.; Souza, A. L.; Gerszten, R. E.; Clish, C. B. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* **2012**, 98 (1), 30.32.31-30.32.24. DOI: 10.1002/0471142727.mb3002s98.
- (37) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapon, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **2016**, 34 (8), 828-837. DOI: 10.1038/nbt.3597.
- (38) Soldatou, S.; Eldjárn, G. H.; Ramsay, A.; Van Der Hooft, J. J. J.; Hughes, A. H.; Rogers, S.; Duncan, K. R. Comparative metabologenomics analysis of polar Actinomycetes. *Mar Drugs* **2021**, 19 (2), 103. DOI: 10.3390/md19020103.
- (39) Aron, A. T.; Gentry, E. C.; McPhail, K. L.; Nothias, L. F.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J. M.; Sikora, N.; Vargas, F.; et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat Protoc* **2020**, 15 (6), 1954-1991. DOI: 10.1038/s41596-020-0317-5.
- (40) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; De Felicio, R.; Fenner, A.; et al. Molecular networking as a dereplication strategy. *J Nat Prod* **2013**, 76 (9), 1686-1699. DOI: 10.1021/np400413s.
- (41) Vizcaino, M. I.; Engel, P.; Trautman, E.; Crawford, J. M. Comparative metabolomics and structural characterizations illuminate colibactin pathway-dependent small molecules. *J Am Chem Soc* **2014**, 136 (26), 9244-9247. DOI: 10.1021/ja503450q.
- (42) Schorn, M. A.; Verhoeven, S.; Ridder, L.; Huber, F.; Acharya, D. D.; Aksenov, A. A.; Aleti, G.; Moghaddam, J. A.; Aron, A. T.; Aziz, S.; et al. A community resource for paired genomic and metabolomic data mining. *Nat Chem Biol* **2021**, 17 (4), 363-368. DOI: 10.1038/s41589-020-00724-z.
- (43) Lee, S.; Van Santen, J. A.; Farzaneh, N.; Liu, D. Y.; Pye, C. R.; Baumeister, T. U. H.; Wong, W. R.; Linington, R. G. NP Analyst: An open online platform for compound activity mapping. *ACS Cent Sci* **2022**, 8 (2), 223-234. DOI: 10.1021/acscentsci.1c01108.
- (44) Chandra Mohana, N.; Yashavantha Rao, H. C.; Rakshith, D.; Mithun, P. R.; Nuthan, B. R.; Satish, S. Omics based approach for biodiscovery of microbial natural products in antibiotic resistance era. *J Genet Eng Biotechnol* **2018**, 16 (1), 1-8. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.01.006.
- (45) Jia, S. L.; Chi, Z.; Liu, G. L.; Hu, Z.; Chi, Z. M. Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. *Crit Rev Biotechnol* **2020**, 40 (6), 852-864. DOI: 10.1080/07388551.2020.1789063.
- (46) Velázquez-Salazar S., R.-Z. M. T., Alcántara-Maya J.A., Villeda-Chávez E., Valderrama-Landeros L., T.-S. C., Vázquez-Balderas B., Pérez-Espinosa I., Cruz-López M. I. Ressler, D. I. B. D. V. G., Paz O., Aguilar-Sierra V., Hrubby F. y Muñoa-Coutiño J. H. Manglares de México. Actualización y análisis de los datos 2020. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad México CDMX, **2021**; p 168.

- (47) FAO. The world's mangroves 1980-2005; Forest Resources Division, **2007**.
- (48) Nettel, A.; Dodd, R. S.; Afzal-Rafii, Z.; Tovilla-Hernández, C. Genetic diversity enhanced by ancient introgression and secondary contact in East Pacific black mangroves. *Mol Ecol* **2008**, 17 (11), 2680-2690. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03766.x.
- (49) Salvador, S. D. Caracterización estructural y cambios en la cobertura del manglar en el sistema lagunar Los Patos-Sólo Dios en la costa de Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México, **2013**.
- (50) Thatoi, H.; Behera, B. C.; Mishra, R. R.; Dutta, S. K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Ann Microbiol* **2013**, 63 (1), 1-19. DOI: 10.1007/s13213-012-0442-7
- (51) Sarma, V. V., and Hyde, K. D. A review on frequently occurring fungi in mangroves. *Fungal Divers* **2001**, 8, 1-34.
- (52) Lee, N. L. Y.; Huang, D.; Quek, Z. B. R.; Lee, J. N.; Wainwright, B. J. Mangrove-associated fungal communities are differentiated by geographic location and host structure. *Front Microbiol* **2019**, 10, 2456. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02456.
- (53) Stevens, F. L. New or noteworthy porto rican fungi. *Bot Gaz* **1920**, 70 (5), 399-402. DOI: 10.1086/332764.
- (54) Devadatha, B.; Jones, E. B. G.; Pang, K. L.; Abdel-Wahab, M. A.; Hyde, K. D.; Sakayaroj, J.; Bahkali, A. H.; Calabon, M. S.; Sarma, V. V.; Sutreong, S.; et al. Occurrence and geographical distribution of mangrove fungi. *Fungal Divers* **2021**, 106 (1), 137-227. DOI: 10.1007/s13225-020-00468-0.
- (55) Chen, S.; Cai, R.; Liu, Z.; Cui, H.; She, Z. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities. *Nat Prod Rep* **2022**, 39 (3), 560-595. DOI: 10.1039/d1np00041a.
- (56) Xu, J. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. *RSC Adv* **2015**, 5 (2), 841-892. DOI: 10.1039/C4RA11756E.
- (57) IDF Diabetes Atlas; International Diabetes Federation, **2021**.
- (58) JIM, O. N. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on antimicrobial resistance*, **2016**.
- (59) Zhang, S.; Zhang, Z. Y. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov Today* **2007**, 12 (9-10), 373-381. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.03.011.
- (60) Organization, W. W. H. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

- (61) Sulis, G.; Sayood, S.; Gandra, S. Antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: current status and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2022**, 20 (2), 147-160. DOI: 10.1080/14787210.2021.1951705.
- (62) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **2022**, 399 (10325), 629-655. DOI: 10.1016/s0140-6736(21)02724-0.
- (63) Walesch, S.; Birkelbach, J.; Jézéquel, G.; Haeckl, F. P. J.; Hegemann, J. D.; Hesterkamp, T.; Hirsch, A. K. H.; Hamman, P.; Müller, R. Fighting antibiotic resistance—strategies and (pre)clinical developments to find new antibacterials. *EMBO Rep* **2023**, 24 (1). DOI: 10.15252/embr.202256033.
- (64) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! an update from the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* **2009**, 48 (1), 1-12. DOI: 10.1086/595011.
- (65) Leyte-Lugo, M.; González-Andrade, M.; González, M. e. C.; Glenn, A. E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. (+)-Ascosalitoxin and vermelhotin, a calmodulin inhibitor, from an endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod* **2012**, 75 (9), 1571-1577. DOI: 10.1021/np300327y.
- (66) Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **2000**, 7 (1-2), 203-214. DOI: 10.1089/10665270050081478.
- (67) Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **1997**, 25 (24), 4876-4882. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876.
- (68) Galtier, N.; Gouy, M.; Gautier, C. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **1996**, 12 (6), 543-548. DOI: 10.1093/bioinformatics/12.6.543.
- (69) Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; FilipSKI, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **2013**, 30 (12), 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- (70) Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* **2021**, 49 (W1), W293-W296. DOI: 10.1093/nar/gkab301 (accessed 2022-02-10T23:46:30).
- (71) Rivera-Chávez, J.; Zacatenco-Abarca, J.; Morales-Jiménez, J.; Martínez-Aviña, B.; Hernández-Ortega, S.; Aguilar-Ramírez, E. Cuautepetalorin, a 7,8-Dihydrochromene–Oxoisochromane Adduct Bearing a Hexacyclic Scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011. *Org Lett* **2019**, 21 (10), 3558-3562. DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00962.

- (72) Jiménez-Arreola, B. S.; Aguilar-Ramírez, E.; Cano-Sánchez, P.; Morales-Jiménez, J.; González-Andrade, M.; Medina-Franco, J. L.; Rivera-Chávez, J. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTPIB. *Bioorg Chem* **2020**, *101*, 103893. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103893.
- (73) Rivera-Chávez, J.; Coporo-Blancas, D.; Morales-Jiménez, J. One-step partial synthesis of (±)-asperteretone B and related hPTPIB<sub>1-400</sub> inhibitors from butyrolactone I. *Bioorg Med Chem* **2020**, *28* (24), 115817. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115817
- (74) Martínez-Aldino, I. Y.; Villaseca-Murillo, M.; Morales-Jiménez, J.; Rivera-Chávez, J. Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429. *Bioorg Chem* **2021**, *115*, 105166. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105166.
- (75) Rivera-Chávez, J.; Figueroa, M.; González, M. e. C.; Glenn, A. E.; Mata, R. α-Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* associated with *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod* **2015**, *78* (4), 730-735. DOI: 10.1021/np500897y.
- (76) Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G. SpecDis: quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra. *Chirality* **2013**, *25* (4), 243-249. DOI: 10.1002/chir.22138.
- (77) El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B. M.; Cech, N. B.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J Nat Prod* **2013**, *76* (9), 1709-1716. DOI: 10.1021/np4004307.
- (78) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **2003**, *13* (11), 2498-2504. DOI: 10.1101/gr.1239303.
- (79) Ernst, M.; Kang, K. B.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Nothias, L.-F.; Wandy, J.; Chen, C.; Wang, M.; Rogers, S.; Medema, M. H.; Dorrestein, P. C.; et al. MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites* **2019**, *9* (7), 144. DOI: 10.3390/metabo9070144.
- (80) Da Silva, R. R.; Wang, M.; Nothias, L.-F.; Van Der Hooft, J. J. J.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Fox, E.; Balunas, M. J.; Klassen, J. L.; Lopes, N. P.; Dorrestein, P. C. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. *PLoS Comput Biol* **2018**, *14* (4), e1006089. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006089.
- (81) Van Der Hooft, J. J. J.; Wandy, J.; Barrett, M. P.; Burgess, K. E. V.; Rogers, S. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proc Natl Acad Sci* **2016**, *113* (48), 13738-13743. DOI: 10.1073/pnas.1608041113.

- (82) Raorane, C. J.; Lee, J. H.; Kim, Y. G.; Rajasekharan, S. K.; García-Contreras, R.; Lee, J. Antibiofilm and antivirulence efficacies of flavonoids and curcumin against *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 990. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00990.
- (83) Wayne, P. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute **2015**.
- (84) Lambert, R. J. W.; Pearson, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol* **2000**, *88* (5), 784-790. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x.
- (85) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J Nat Prod* **2017**, *80* (3), 756-770. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.
- (86) Liu, Y. J.; Hall, B. D. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc Natl Acad Sci* **2004**, *101* (13), 4507-4512. DOI: 10.1073/pnas.0400938101.
- (87) Reeb, V.; Lutzoni, F.; Roux, C. Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Mol Phylogenet Evol* **2004**, *32* (3), 1036-1060. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.04.012.
- (88) Rehner, S. A.; Buckley, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia* **2005**, *97* (1), 84-98. DOI: 10.3852/mycologia.97.1.84.
- (89) Glass, N. L.; Donaldson, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* **1995**, *61* (4), 1323-1330. DOI: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.
- (90) O'Donnell, K.; Cigelnik, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* **1997**, *7* (1), 103-116. DOI: 10.1006/mpev.1996.0376.
- (91) Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Houbraken, J.; Hong, S. B.; Hubka, V.; Klaassen, C. H.; Perrone, G.; Seifert, K. A.; Susca, A.; Tanney, J. B.; et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* **2014**, *78*, 141-173. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- (92) Raja, H.; Schoch, C. L.; Hustad, V.; Shearer, C.; Miller, A. Testing the phylogenetic utility of MCM7 in the Ascomycota. *MycKeys* **2011**, *1*, 63-94. DOI: 10.3897/mycokeys.1.1966.
- (93) Schmitt, I.; Crespo, A.; Divakar, P. K.; Fankhauser, J. D.; Herman-Sackett, E.; Kalb, K.; Nelsen, M. P.; Nelson, N. A.; Rivas-Plata, E.; Shimp, A. D.; et al. New primers for promising

single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Pers: Mol Phylogeny Evol Fungi* **2009**, 23 (1), 35-40. DOI: 10.3767/003158509x470602.

(94) Ananda K, S. K. Mycolora on dead animal materials of mangrove habitats of Karnataka Coast, India. Sri Lanka. *J Aqua Sci* **2001**; Vol. 6, pp 85-93.

(95) Li, L.; Yang, Q.; Li, H. Morphology, phylogeny, and pathogenicity of Pestalotioid species on *Camellia oleifera* in China. *J Fungi* **2021**, 7 (12), 1080. DOI: 10.3390/jof7121080.

(96) Maharachchikumbura, S. S. N.; Hyde, K. D.; Groenewald, J. Z.; Xu, J.; Crous, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. *Stud Mycol* **2014**, 79 (1), 121-186. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.09.005.

(97) J, K. Marine fungi from the tropics. *Mycologia* **1968**, 60 (2), 252– 270.

(98) Kohlmeyer, J. Tropical marine fungi. *Mar Eco* **1984** 5,329-378.

(99) Hyde, K. D.; Lee, S. Y. Ecology of mangrove fungi and their role in nutrient cycling: what gaps occur in our knowledge? *Hydrobiologia* **1995**, 295 (1-3), 107-118. DOI: 10.1007/bf00029117.

(100) K.D., H. Intertidal mangrove fungi from the west coast of Mexico, including one new genus and two new species. *Mycology* **1992**, 96 (1), 25-30.

(101) Rosa María Arias Mota, G. H. A., Rafael F. Castañeda Ruíz, Cinthya Ivonne Becerra Hernández. Two new species of *Polyschema* and *Vanakripa* and other microfungi recorded from mangrove in Veracruz, Mexico. *Mycotaxon* **2008**, 106, 29-40.

(102) Grano-Maldonado, M. I.; Ramos-Payan, R.; Rivera-Chaparro, F.; Aguilar-Medina, M.; Romero-Quintana, J. G.; Rodríguez-Santiago, A.; Nieves-Soto, M. First molecular characterization of *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* sp. isolated from mangrove in Mexico and the antagonist effect of *Trichoderma harzianum* as an effective biocontrol agent. *Plant Pathol J* **2021**, 37 (5), 465-475. DOI: 10.5423/ppj.oa.03.2021.0048.

(103) Lumbreras Martínez, H.; Espinoza, C.; Fernández, J. J.; Norte, M.; Lagunes, I.; Padrón, J. M.; López-Portillo, J.; Trigos, Á. Bioprospecting of fungi with antiproliferative activity from the mangrove sediment of the Tampamachoco coastal lagoon, Veracruz, Mexico. *Scientia Fungorum* **2018**, 48, 53-60. DOI: 10.33885/sf.2018.48.1234.

(104) García-Martínez, Y.; Heredia Abarca, G.; Guzmán-Guillermo, J.; Valenzuela, R.; Raymundo, T. Hongos asociados al mangle rojo *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en la Reserva de la Biosfera Isla Cozumel, Quintana Roo, México. *Acta Bot Mex* **2021**, (128). DOI: 10.21829/abm128.2021.1792.

(105) Sopalun, K.; Laosripaiboon, W.; Wachirachai Karn, A.; lamtham, S. Biological potential and chemical composition of bioactive compounds from endophytic fungi associated with thai mangrove plants. *S Afr J Bot* **2021**, 141, 66-76. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.04.031.

- (106) Chen, S.; Cai, R.; Liu, Z.; Cui, H.; She, Z. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities. *Nat Prod Rep* **2021**. DOI: 10.1039/d1np00041a.
- (107) Poch, G. K.; Gloer, J. B. Helicascolides A and B: new lactones from the marine fungus *Helicascus kanaloanus*. *J Nat Prod* **1989**, 52 (2), 257-260. DOI: 10.1021/np50062a006.
- (108) Goulard, C.; Hlimi, S.; Rebuffat, S.; Bodo, B. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot* **1995**, 48 (11), 1248-1253. DOI: 10.7164/antibiotics.48.1248.
- (109) Chidananda, C.; Sattur, A. P. Sclerotiorin, a novel inhibitor of lipoxygenase from *Penicillium frequentans*. *J Agric Food Chem* **2007**, 55 (8), 2879-2883. DOI: 10.1021/jf062032x.
- (110) Steyn, P. S. The isolation, structure and absolute configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron* **1970**, 26 (1), 51-57. DOI: 10.1016/0040-4020(70)85006-2.
- (111) Yuan, W. H.; Wei, Z. W.; Dai, P.; Wu, H.; Zhao, Y. X.; Zhang, M. M.; Jiang, N.; Zheng, W. F. Halogenated metabolites isolated from *Penicillium citreonigrum*. *Chem Biodivers* **2014**, 11 (7), 1078-1087. DOI: 10.1002/cbdv.201300349.
- (112) Li, C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; Dowd, P. F. Antiinsectan decaturin and oxalicine analogues from *Penicillium thiersii*. *J Nat Prod* **2005**, 68 (3), 319-322. DOI: 10.1021/np0496486.
- (113) Barnes, C. L.; Steiner, J. R.; Torres, E.; Pacheco, R.; Marquez, H. Structure and absolute configuration of pyrophen, a novel pryronone derivative of L-phenylalanine from *Aspergillus niger*. *Int J Pept Protein Res* **1990**, 36 (3), 292-296. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1990.tb00981.x.
- (114) Zhang, Y.; Ling, S.; Fang, Y.; Zhu, T.; Gu, Q.; Zhu, W. M. Isolation, Structure elucidation, and antimycobacterial properties of dimeric naphtho-gamma-pyrone from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*. *Chem Biodivers* **2008**, 5 (1), 93-100. DOI: 10.1002/cbdv.200890017.
- (115) Kitagawa, M.; Okabe, T.; Ogino, H.; Matsumoto, H.; Suzuki-Takahashi, I.; Kokubo, T.; Higashi, H.; Saitoh, S.; Taya, Y.; Yasuda, H. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **1993**, 8 (9), 2425-2432.
- (116) Luo, Y.; Ma, H.; Zhang, X.; He, X.; Wang, W.; Gang, C.; Wang, H.; Pei, Y.-H. A New Butyrolactone from *Aspergillus* sp. *Chem Nat Compd* **2018**, 54 (6), 1035-1037. DOI: 10.1007/s10600-018-2548-z.
- (117) Kim, K. W.; Sugawara, F.; Yoshida, S.; Murofushi, N.; Takahashi, N.; Curtis, R. W. Structure of malformin B, a phytotoxic metabolite produced by *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem* **1993**, 57 (5), 787-791. DOI: 10.1271/bbb.57.787.

- (118) Ebead, G. A.; Overy, D. P.; Berru , F.; Kerr, R. G. *Westerdykella reniformis* sp. nov., producing the antibiotic metabolites melinacidin IV and chetracin B. *IMA Fungus* **2012**, 3 (2), 189-201. DOI: 10.5598/imafungus.2012.03.02.11.
- (119) Rodríguez-Reyes, M. Estudio químico de especies selectas de ascomicetos como fuente potencial de moléculas con actividad antibacteriana. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, **2022**.
- (120) Aguilar-Vega L, López-Jácome LE, Franco B, Muñoz-Carranza S, Vargas-Maya N, Franco-Cendejas R, Hernández-Durán M, Otero-Zúniga M, Campo-Bele o C, Jiménez-Cortés JG, Martínez-Vázquez M, Rodríguez-Zavala JS, Maeda T, Zurabian R, García-Contreras R. Antibacterial properties of phenothiazine derivatives against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *J Appl Microbiol* **2021**,131(5):2235-2243. DOI: 10.1111/jam.15109
- (121) Pye, C. R.; Bertin, M. J.; Lokey, R. S.; Gerwick, W. H.; Linington, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proc Natl Acad Sci* **2017**, 114 (22), 5601-5606. DOI: 10.1073/pnas.1614680114.
- (122) Santen, V., Jeffrey A; Poynton, E. F.; Iskakova, D.; Mccmann, E.; Alsup, A., Tyler; Clark, T. N.; Fergusson, C. H.; Fewer, D. P.; Hughes, A. H.; Mccadden, C. A.; et al. The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Res* **2022**, 50 (D1), D1317-D1323. DOI: 10.1093/nar/gkab941.
- (123) Rodríguez-Reyes, M. Estudio químico de especies selectas de ascomicetos como fuente potencial de moléculas con actividad antibacteriana. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, **2022**.
- (124) Xu, T.-C.; Lu, Y.-H.; Wang, J.-F.; Song, Z.-Q.; Hou, Y.-G.; Liu, S.-S.; Liu, C.-S.; Wu, S.-H. Bioactive secondary metabolites of the genus *Diaporthe* and anamorph *Phomopsis* from terrestrial and marine habitats and endophytes: 2010–2019. *Microorganisms* **2021**, 9 (2), 217. DOI: 10.3390/microorganisms9020217 (accessed 2022-02-11T03:11:43).
- (125) Shan, R.; Anke, H.; Stadler, M.; Sterner, O. Papyracillic acid, a new penicillic acid analogue from the ascomycete *Lachnum papyraceum*. *Tetrahedron* **1996**, 52 (30), 10249-10254. DOI: 10.1016/0040-4020(96)00559-5.
- (126) Dai, J.; Krohn, K.; Els sser, B.; Fl rke, U.; Draeger, S.; Schulz, B.; Pescitelli, G.; Salvadori, P.; Antus, S.; Kurt n, T. Metabolic products of the endophytic fungus *Microsphaeropsis* sp. from *Larix decidua*. *Eur J Org Chem* **2007**, 2007 (29), 4845-4854. DOI: 10.1002/ejoc.200700348.
- (127) Evidente, A.; Berestetskiy, A.; Cimmino, A.; Tuzi, A.; Superchi, S.; Melck, D.; Andolfi, A. Papyracillic Acid, a Phytotoxic 1,6-dioxaspiro[4,4]nonene produced by *Ascochyta agropyrina* Var.nana, a potential mycoherbicide for *Elytrigia repens* biocontrol. *J Agric Food Chem* **2009**, 57 (23), 11168-11173. DOI: 10.1021/jf903499y.



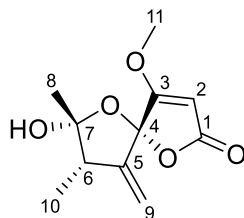
- (128) Lawson, E. N.; Jamie, J. F.; Kitching, W. Absolute stereochemistry of exogonic acid. *J Org Chem* **1992**, *57*, 1, 353–358. DOI: 10.1021/jo00027a060.
- (129) Nishiyama, T.; Woodhall, J. F.; Lawson, E. N.; Kitching, W. Synthesis of exogonic acid and related compounds. *J Org Chem* **1989**, *54*, 9, 2183–2189. DOI: 10.1021/jo00270a031.
- (130) Xie, J.; Li, J.; Yang, Y. H.; Li, X. N.; Chen, Y. H.; Zhao, P. J. Four pestalpolyols from a mycoparasite *Pestalotiopsis* sp. PG52. *Arch Pharm Res* **2015**. DOI: 10.1007/s12272-015-0675-7.
- (131) Li, J.; Xie, J.; Yang, Y. H.; Li, X. L.; Zeng, Y.; Zhao, P. J. Pestalpolyols A-D, cytotoxic polyketides from *Pestalotiopsis* sp. cr013. *Planta Med* **2015**, *81* (14), 1285-1289. DOI: 10.1055/s-0035-1546257.
- (132) Pérez Hemphill, C. F.; Daletos, G.; Liu, Z.; Lin, W.; Proksch, P. Polyketides from the mangrove-derived fungal endophyte *Pestalotiopsis clavispora*. *Tetrahedron Lett* **2016**, *57* (19), 2078-2083. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.03.101.
- (133) Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R. Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. *Chem Rev* **2007**, *107* (9), 3744-3779. DOI: 10.1021/cr030733c.
- (134) Khalaji, A. D.; Harrison, W. T. A. Crystal Structure of  $\beta$ -phenylcinnamaldehyde-4-bromoaniline. *X-ray Struct Anal Online* **2008**, *24*, X3-X4. DOI: 10.2116/analscix.24.x3.
- (135) Miyoshi, Y.; Oyama, T.; Koga, R.; Hamase, K.; Fanali, S.; Haddad, P. R.; Poole, C. F.; Schoenmakers, P.; Lloyd, D. Chapter 6 - Amino acid and bioamine separations. *In Liquid Chromatography*, Elsevier, **2013**; pp 131-147.
- (136) Liu, Z.; Zhao, J.; Liang, X.; Lv, X.; Li, Y.; Qu, J.; Liu, Y. Dothiorelone derivatives from an endophyte *Diaporthe pseudomangiferaea* inhibit the activation of human lung fibroblasts MRC-5 cells. *Fitoterapia* **2018**, *127*, 7-14. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.04.009.
- (137) Brady, S. F.; Wagenaar, M. M.; Singh, M. P.; Janso, J. E.; Clardy, J. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. *Org Lett* **2000**, *2* (25), 4043-4046. DOI: 10.1021/ol006680s.
- (138) Gao, Y. Q.; Du, S. T.; Xiao, J.; Wang, D. C.; Han, W. B.; Zhang, Q.; Gao, J. M. Isolation and characterization of antifungal metabolites from the melia azedarach-associated fungus *Diaporthe eucalyptorum*. *J Agric Food Chem* **2020**, *68* (8), 2418-2425. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b07825.
- (139) Huang, Z.; Cai, X.; Shao, C.; She, Z.; Xia, X.; Chen, Y.; Yang, J.; Zhou, S.; Lin, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochem* **2008**, *69* (7), 1604-1608. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.02.002

- (140) Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. An antibacterial cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Diaporthaceae* sp. PSU-SP2/4. *Phytochem Lett* **2014**, *10*, 5-9. DOI: 10.1016/j.phytol.2014.06.014.
- (141) Rivera-Chávez, J.; Bustos-Brito, C.; Aguilar-Ramírez, E.; Martínez-Otero, D.; Rosales-Vázquez, L. D.; Dorazco-González, A.; Cano-Sánchez, P. Hydroxy-neo-clerodanes and 5,10-seco-neo-clerodanes from *Salvia decora*. *J Nat Prod* **2020**, *83* (7), 2212-2220. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00313.
- (142) Li, J.; Lv, C.; Sun, W.; Li, Z.; Han, X.; Li, Y.; Shen, Y. Cytosporone B, an inhibitor of the type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57* (5), 2191-2198. DOI: 10.1128/AAC.02421-12.
- (143) Sycz, G.; Di Venanzio, G.; Distel, J. S.; Sartorio, M. G.; Le, N.-H.; Scott, N. E.; Beatty, W. L.; Feldman, M. F. Modern *Acinetobacter baumannii* clinical isolates replicate inside spacious vacuoles and egress from macrophages. *PLoS Pathog* **2021**, *17* (8), e1009802. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009802.
- (144) Kongprapan, T.; Xu, X.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Chen, J.; Shen, X. Cytosporone derivatives from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-H188. *Phytochem Lett* **2017**, *22*, 219-223. DOI:10.1016/j.phytol.2017.10.002.
- (145) Pornpakakul, S.; Roengsumran, S.; Deechangvipart, S.; Petsom, A.; Muangsin, N.; Ngamrojnavanich, N.; Sriubolmas, N.; Chaichit, N.; Ohta, T. Diaporthichalasin, a novel CYP3A4 inhibitor from an endophytic *Diaporthe* sp. *Tetrahedron Lett* **2007**, *48* (4), 651-655. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.11.102.

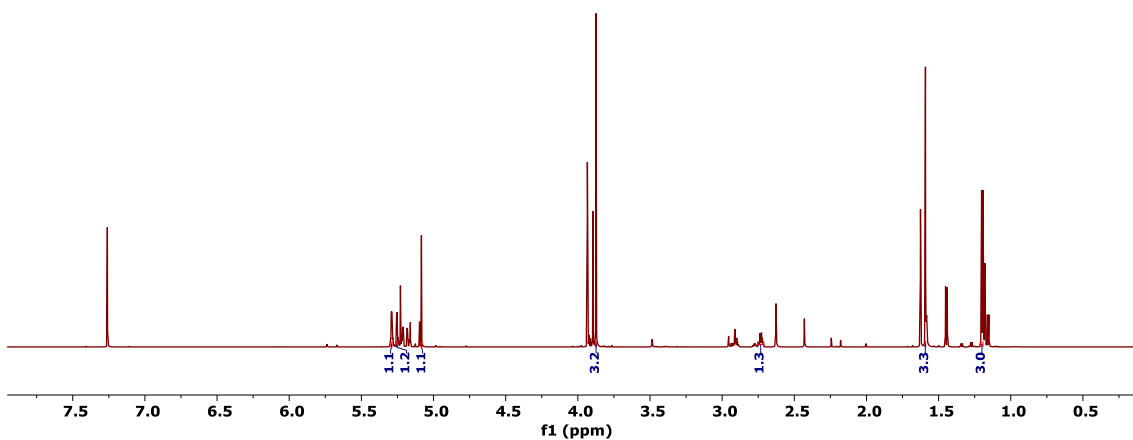
## 9 ANEXOS II

**Tabla SI.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) del diastereoisomero mayoritario del ácido papiracílico A (**20a**) en CDCl<sub>3</sub>.

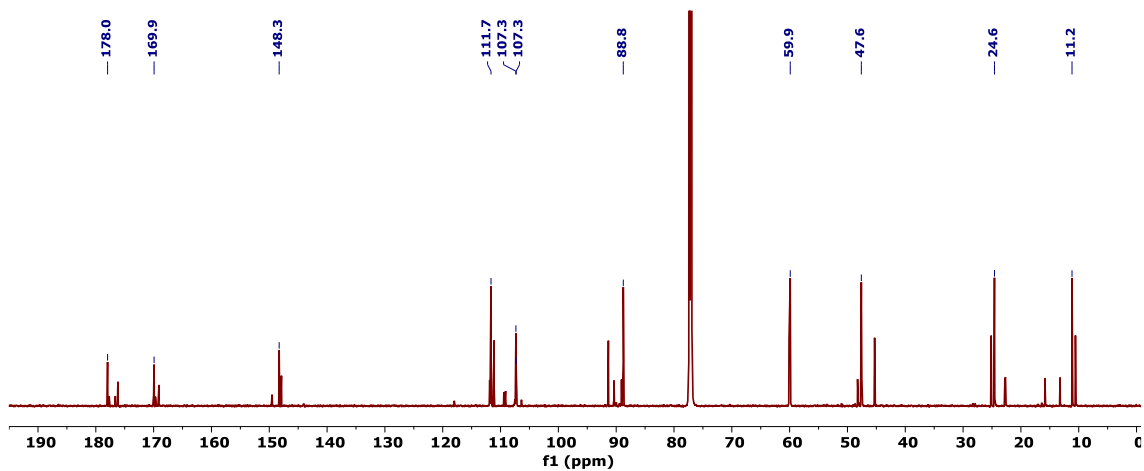
Posición	$\delta_c$ ppm	Tipo	$\delta_H$ ppm, mult. (J en Hz)
1	169.9	C	-
2	88.8	CH	5.08, s
3	178.0	C	-
4	107.3	C	-
5	148.3	C	-
6	47.6	CH	2.73, m
7	107.3	C	-
8	24.6	CH <sub>3</sub>	1.59, s
9	111.7	CH <sub>2</sub>	5.29, dd (3.5, 1.4) 5.25, dd (3.5, 1.4)
10	11.2	CH <sub>3</sub>	1.20, d (6.8)
11	59.9	CH <sub>3</sub>	3.87, s



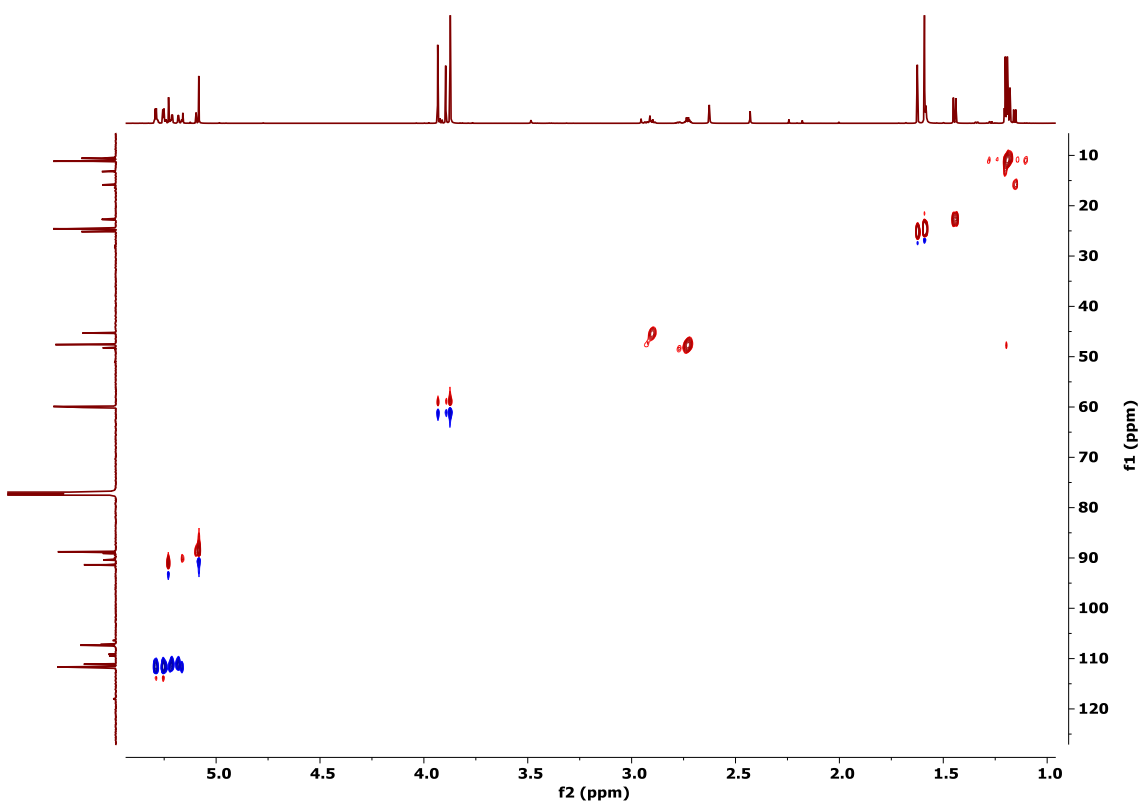
**20a**



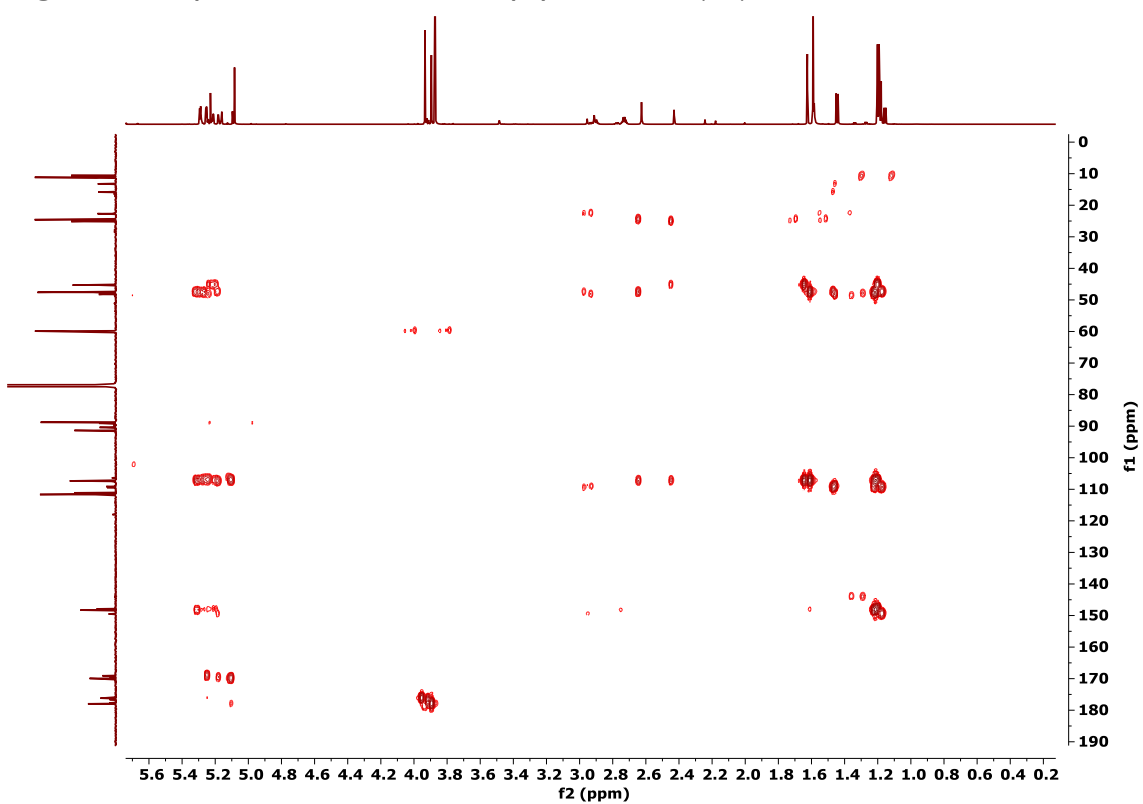
**Figura S1.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido papiracílico A (**20**) en CDCl<sub>3</sub> a 700 MHz.



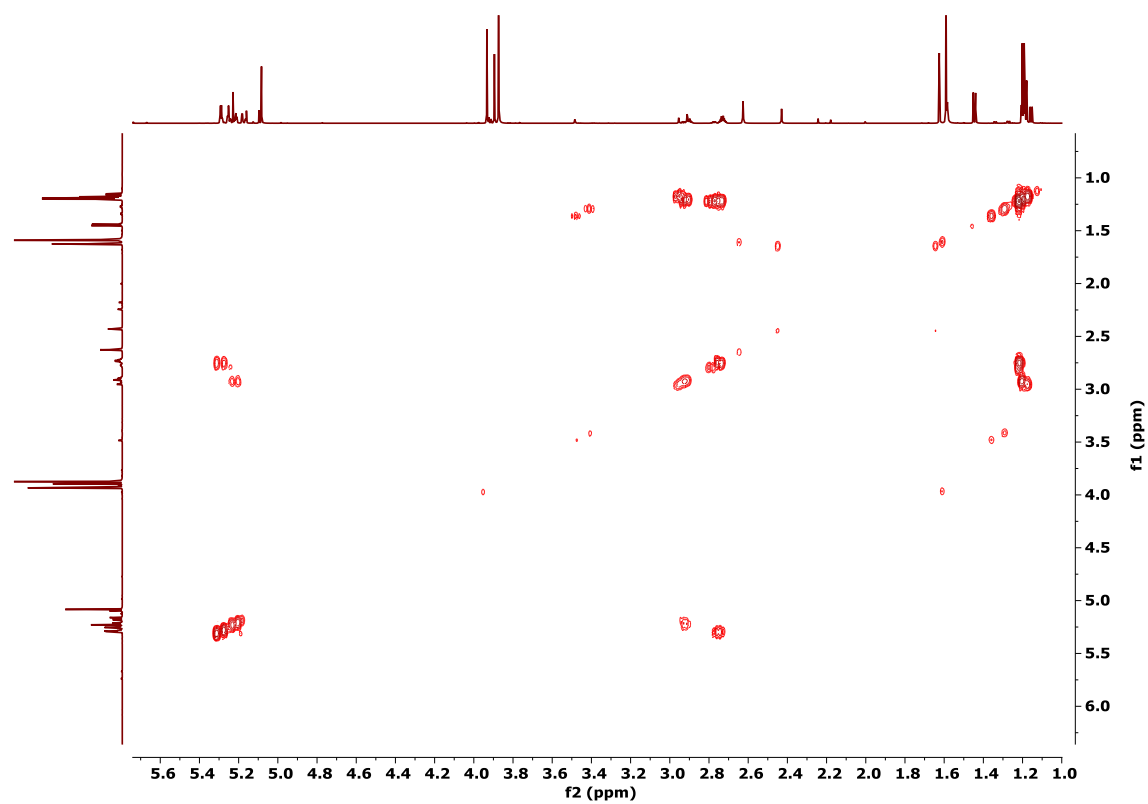
**Figure S2.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C del ácido papiracílico A (**20**) en CDCl<sub>3</sub> a 175 MHz.



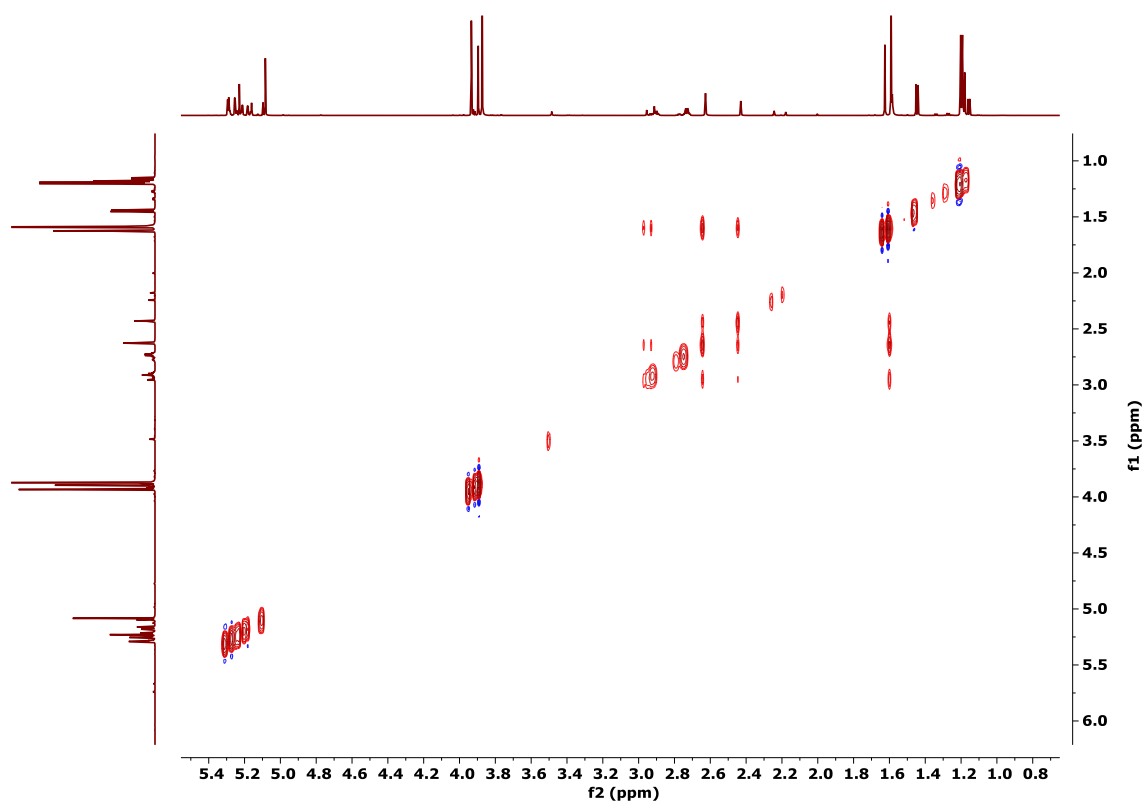
**Figura S3.** Espectro HSQC del ácido papiracílico A (**20**) en  $\text{CDCl}_3$



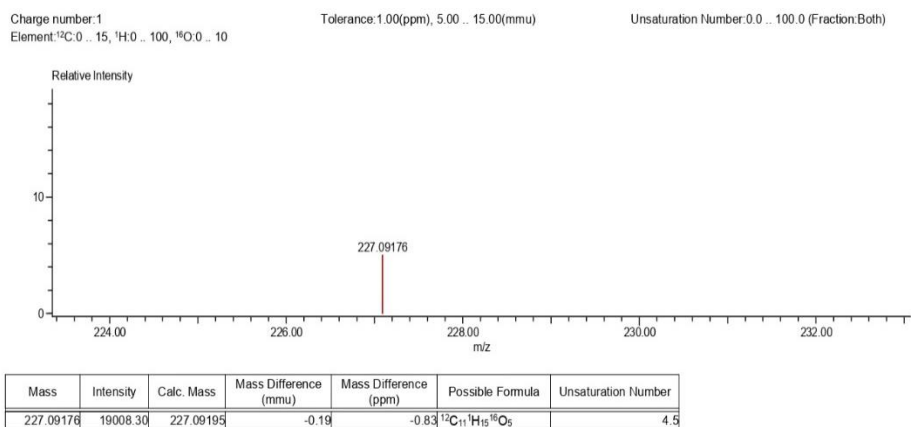
**Figura S4.** Espectro HMBC del ácido papiracílico A (**20**) en  $\text{CDCl}_3$ .



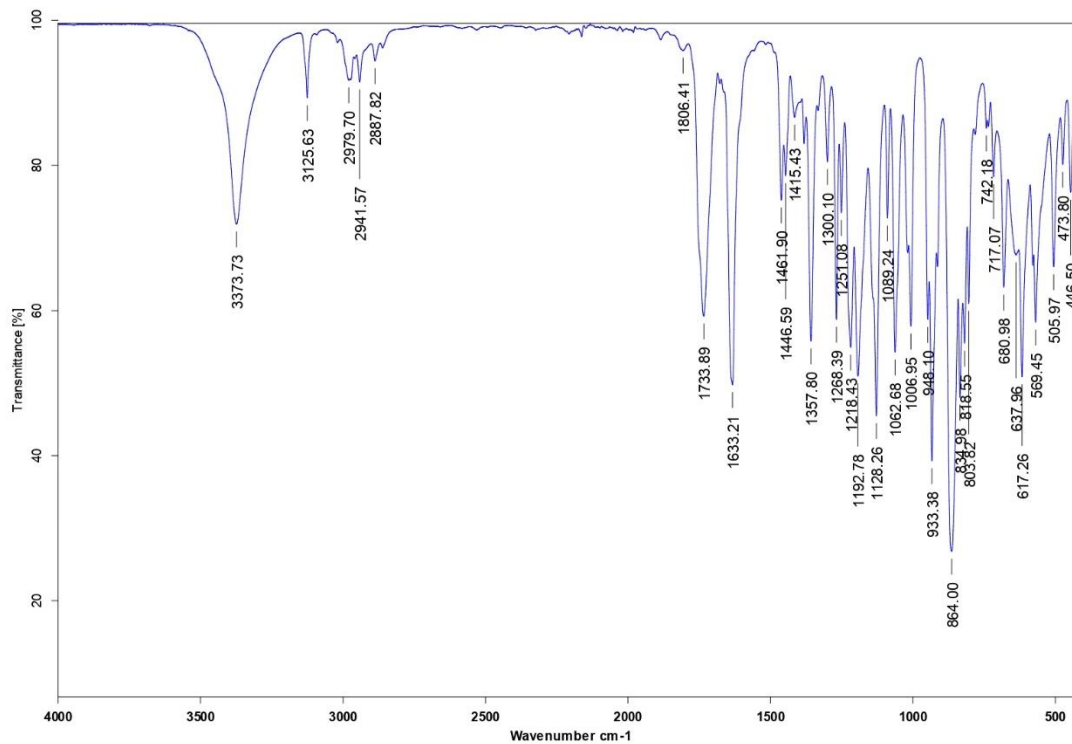
**Figura S5.** Espectro COSY del ácido papiracílico A (**20**) en  $\text{CDCl}_3$ .



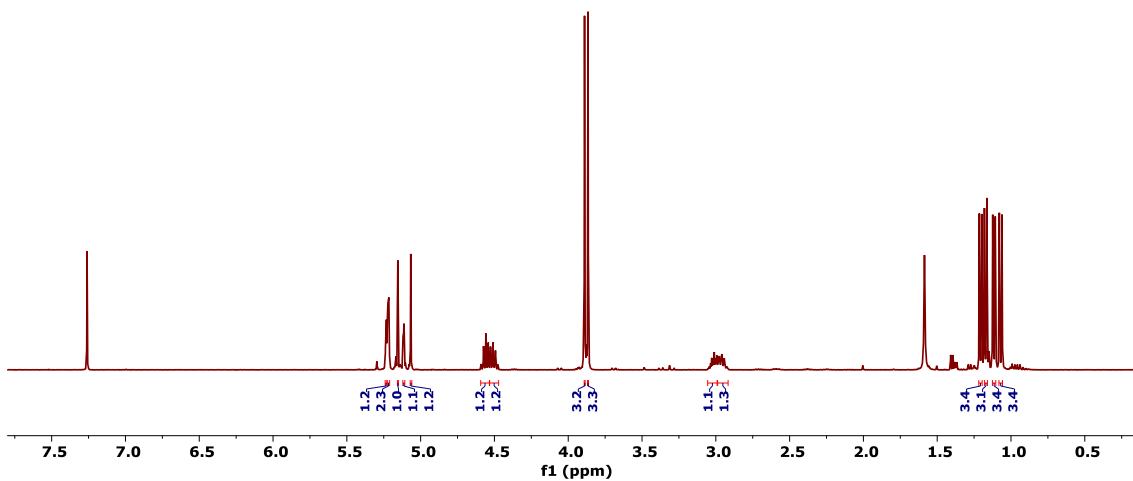
**Figura S6.** Espectro NOESY del ácido papiracílico A (**20**) en  $\text{CDCl}_3$ .



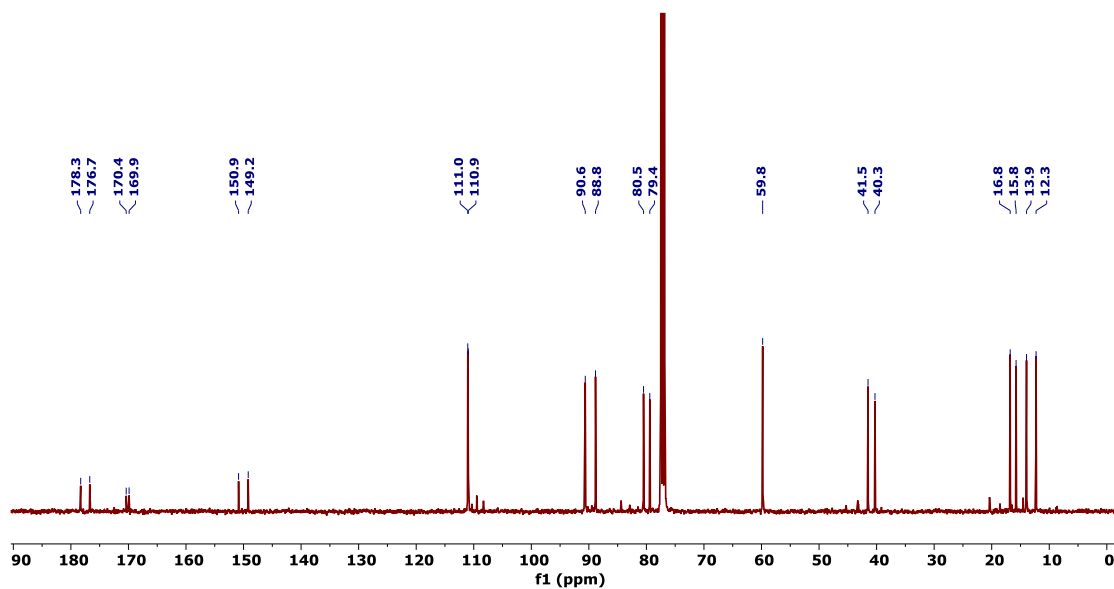
**Figura S7.** Espectro EM-AR-DART del ácido papiracílico A (20).



**Figure S8.** Espectro IR del ácido papiracílico A (20).



**Figura S9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido 7-desoxipapiracílico A (21) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



**Figura S10.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del ácido 7-desoxipapiracílico A (21) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.



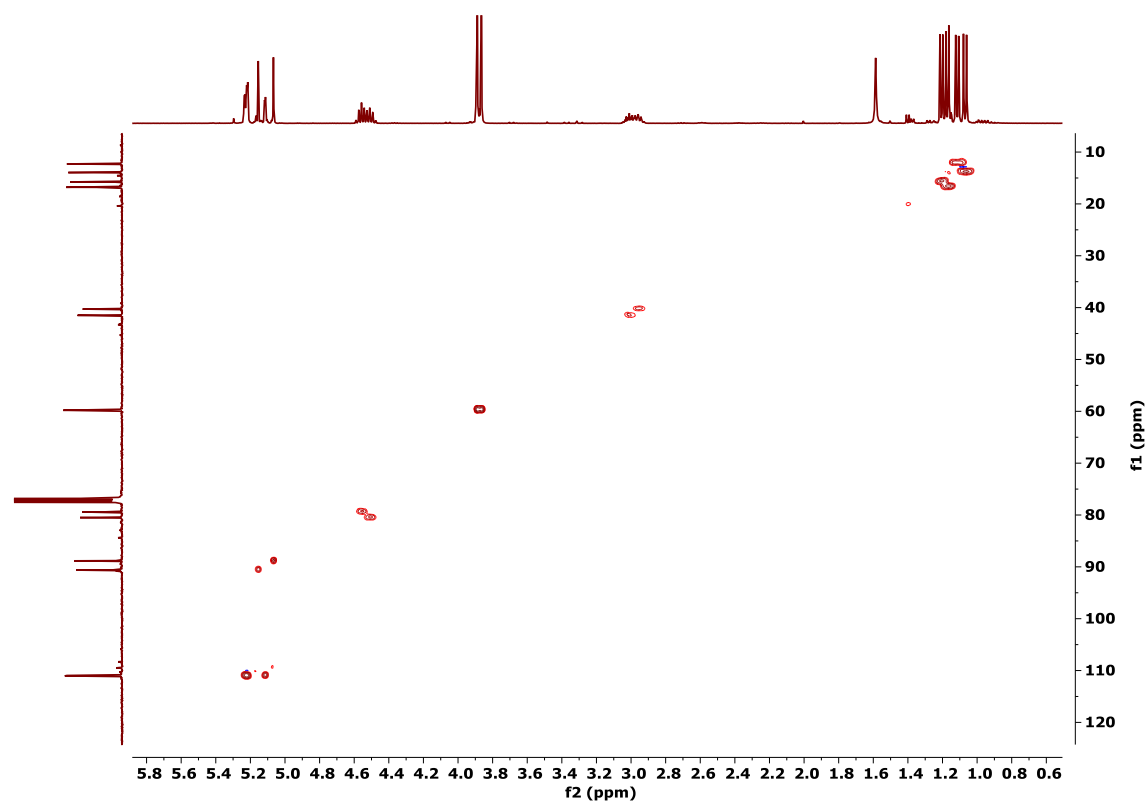


Figura S11. Espectro HSQC del ácido 7-desoxipapiracílico A (**2I**) en  $\text{CDCl}_3$ .

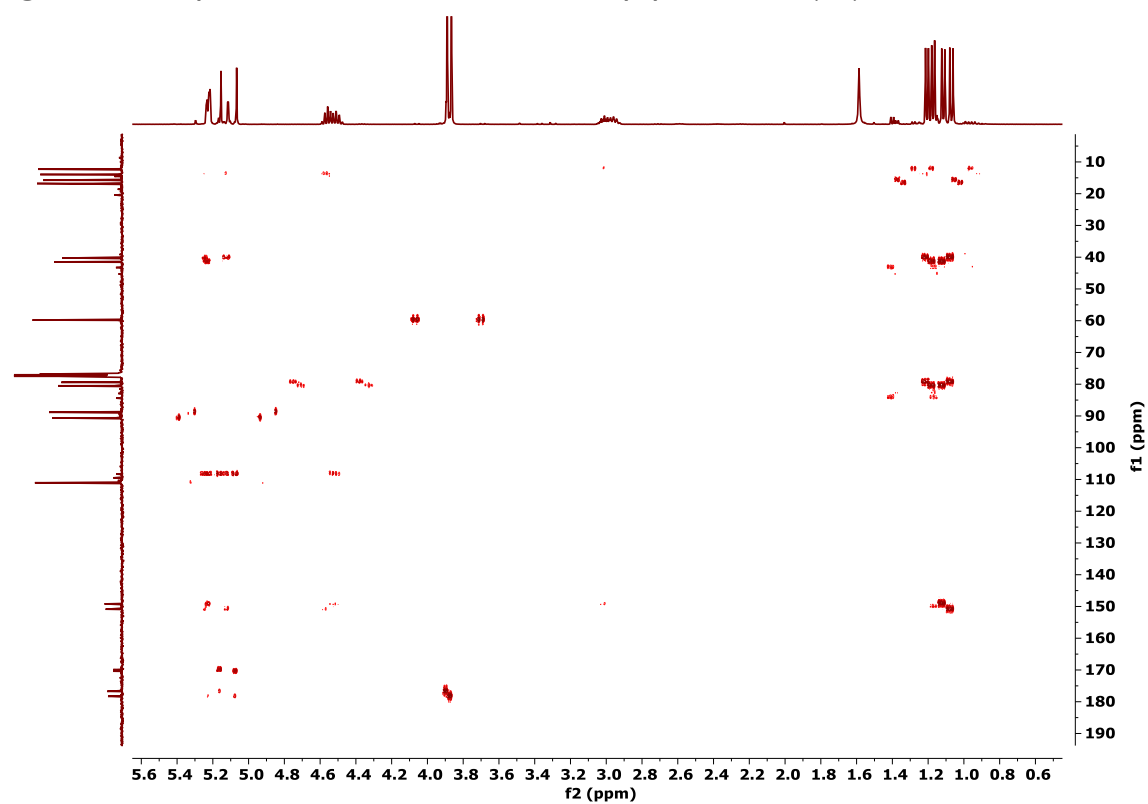
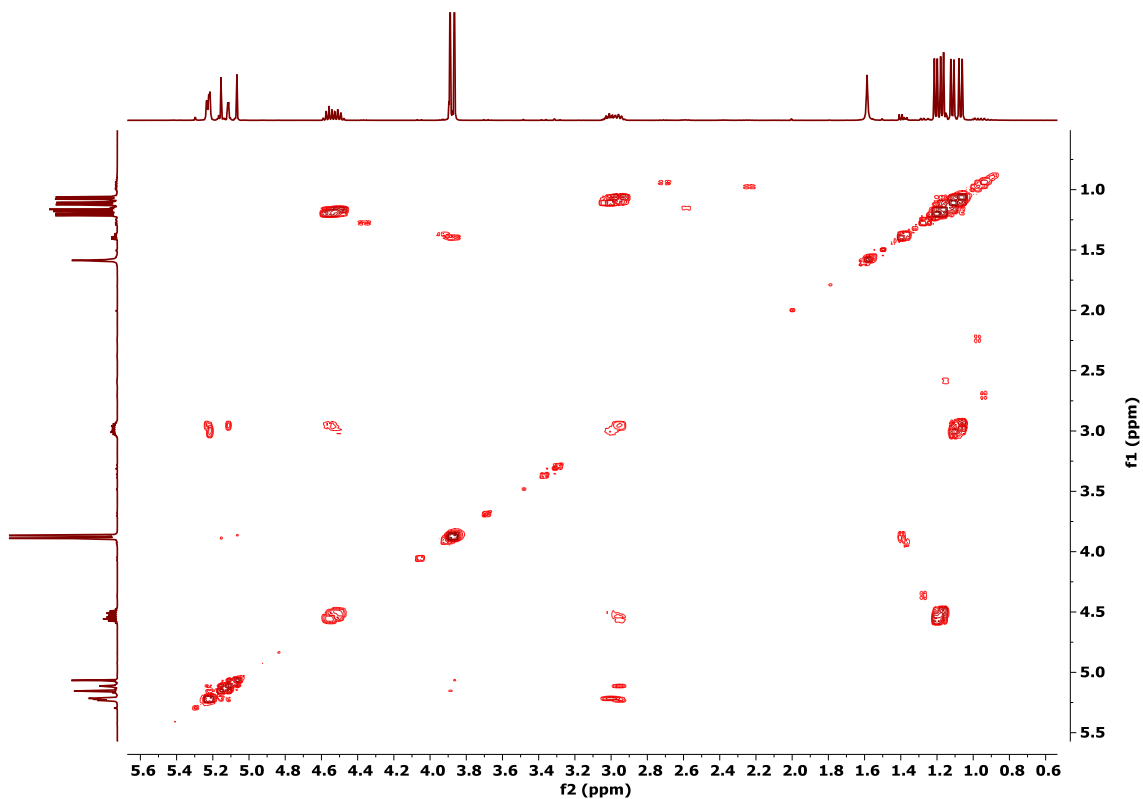
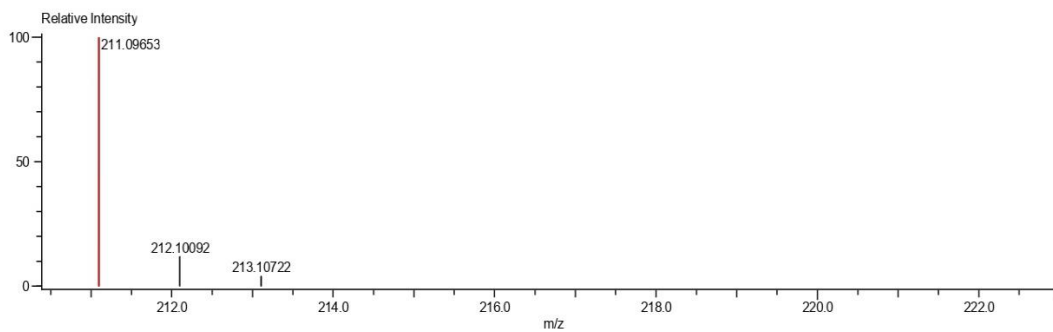


Figura S12. Espectro HMBC del ácido 7-desoxipapiracílico A (**2I**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S13.** Espectro COSY del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Charge number:1 Tolerance:1.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)  
 Element: $^{12}\text{C}$ :0 .. 40,  $^1\text{H}$ :0 .. 60,  $^{16}\text{O}$ :0 .. 7



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
211.09653	91500.34	211.09703	-0.50	-2.37	$^{12}\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4$	4.5

**Figura S14.** Espectro EM-AR-DART del ácido 7-desoxipapiracílico A (**21**).

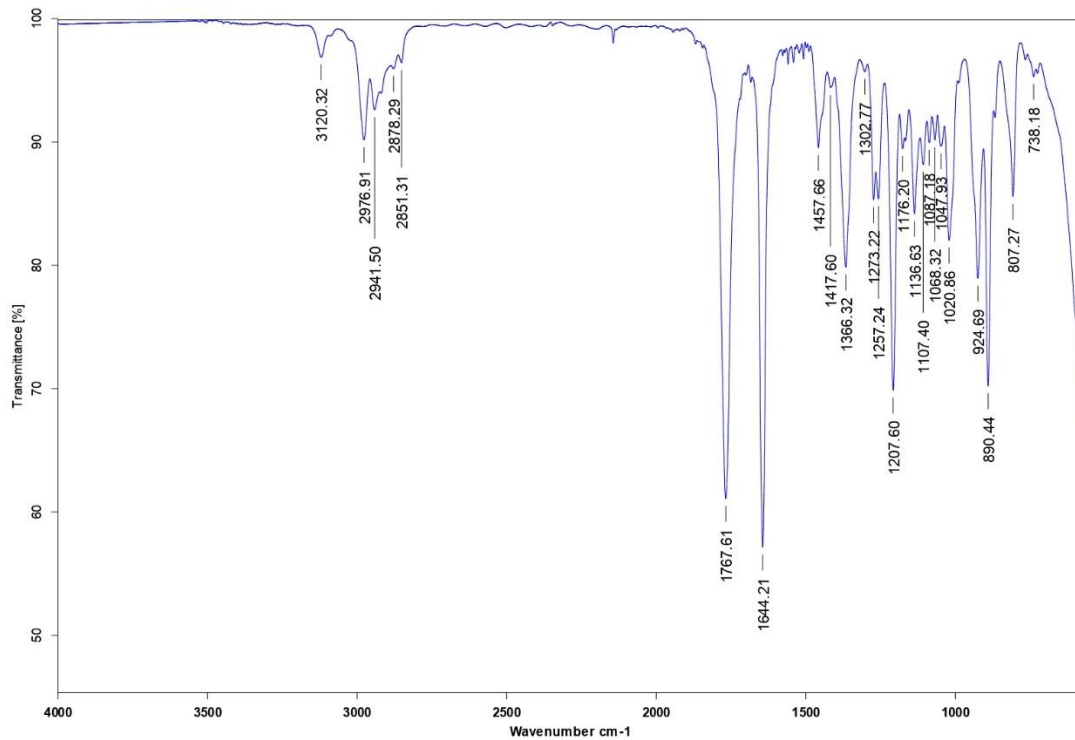


Figura S15. Espectro IR del ácido 7-desoxipapiracílico A (21).

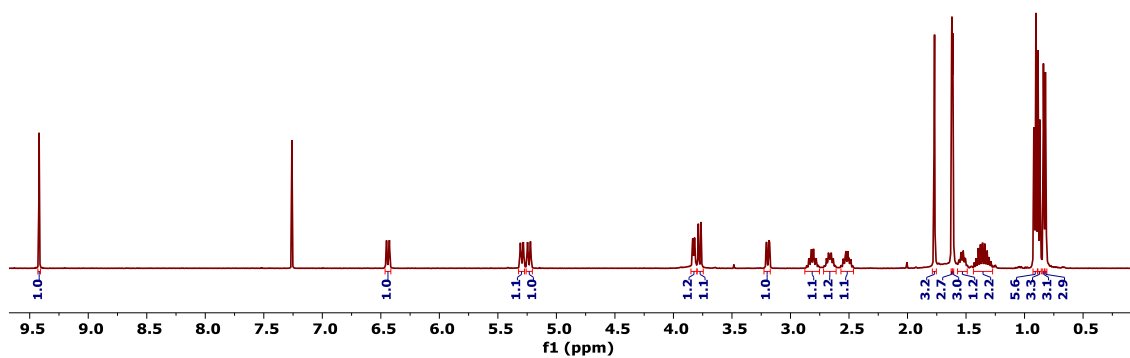


Figura S16. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del scytalpoliol A (22) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

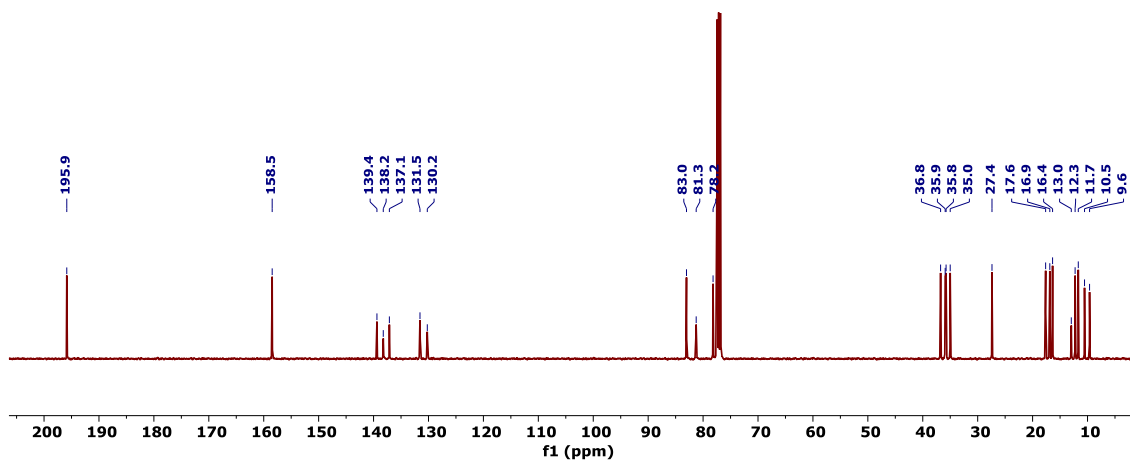


Figura S17. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del scytalpoliol A (**22**) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

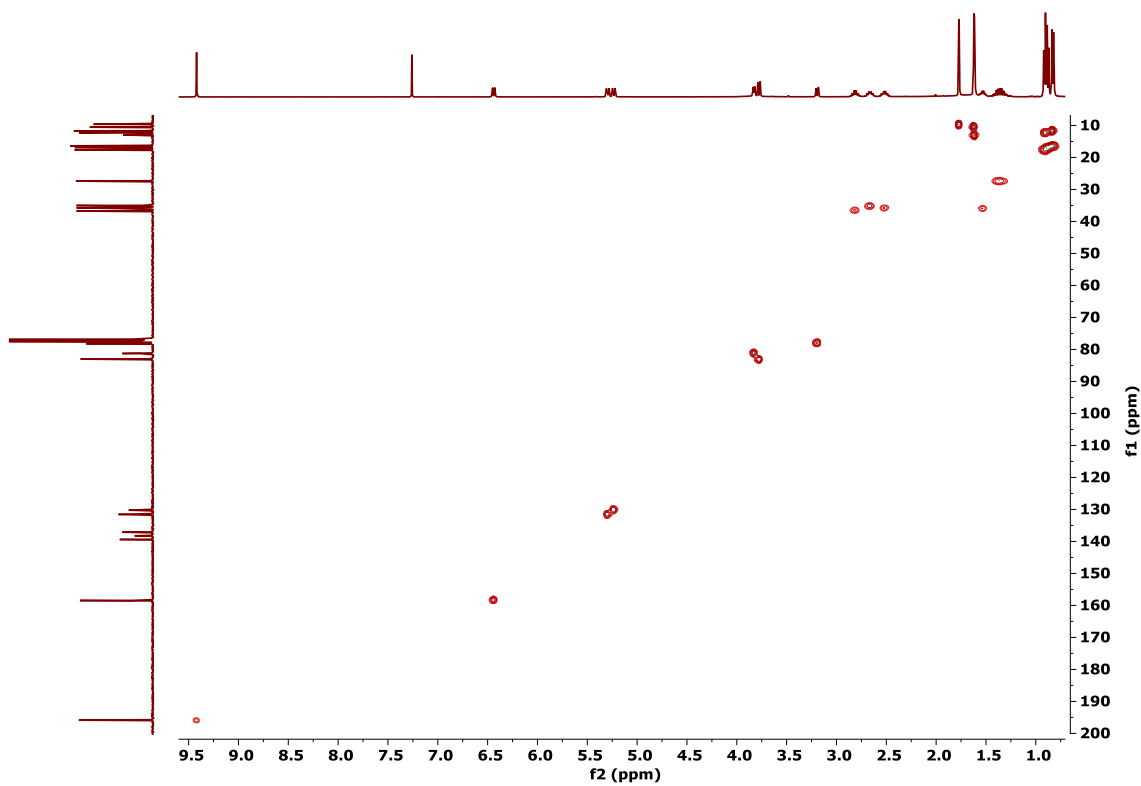


Figura S18. Espectro HSQC del scytalpoliol A (**22**) en CDCl<sub>3</sub>.

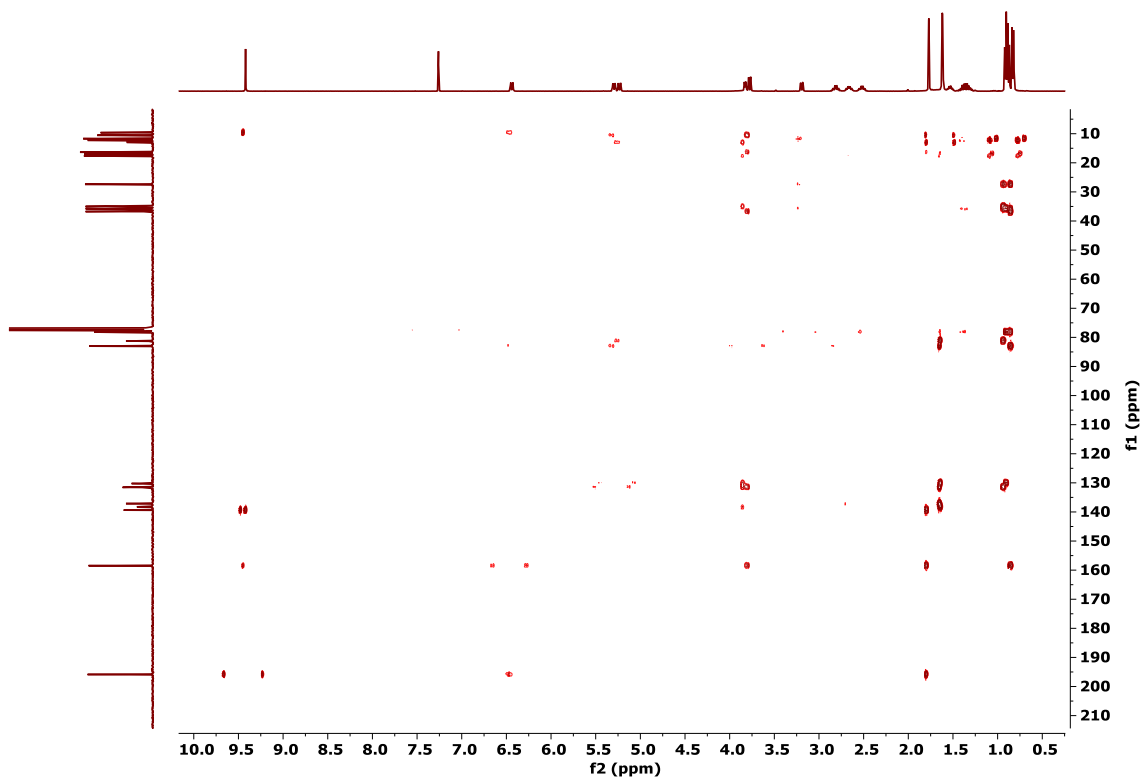


Figura S19. Espectro HMBC del scytopoliol A (**22**) en CDCl<sub>3</sub>.

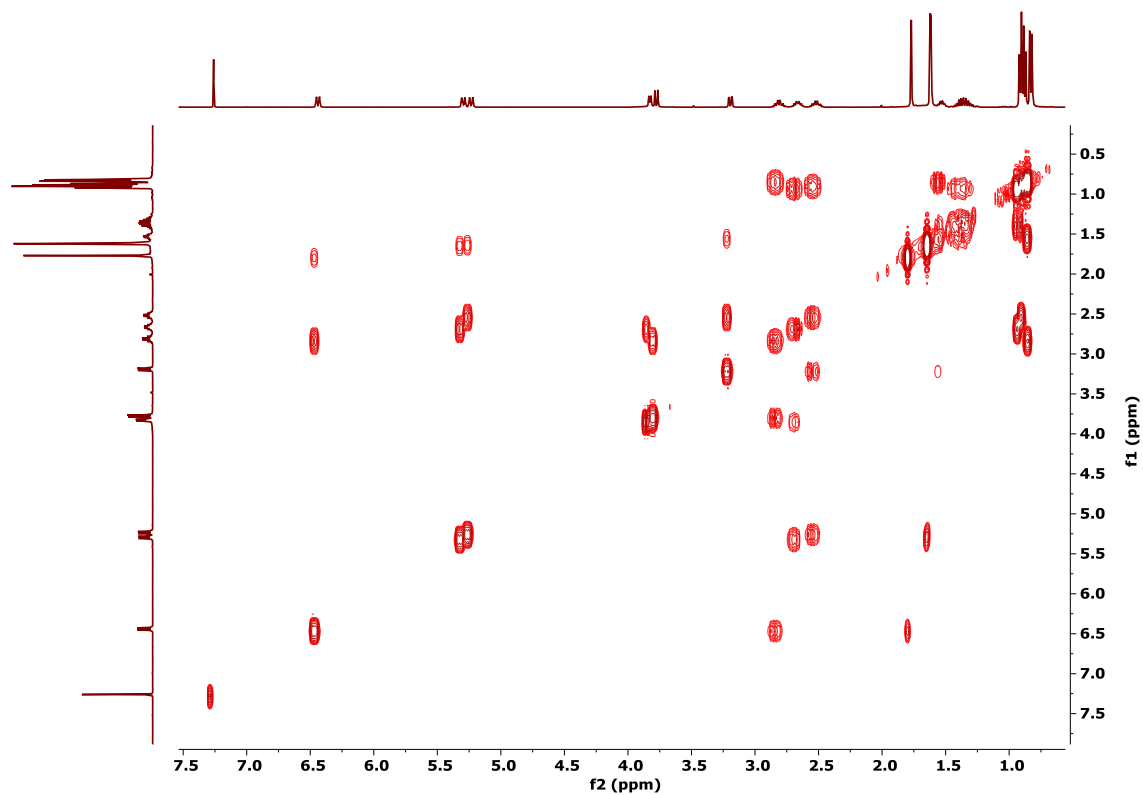
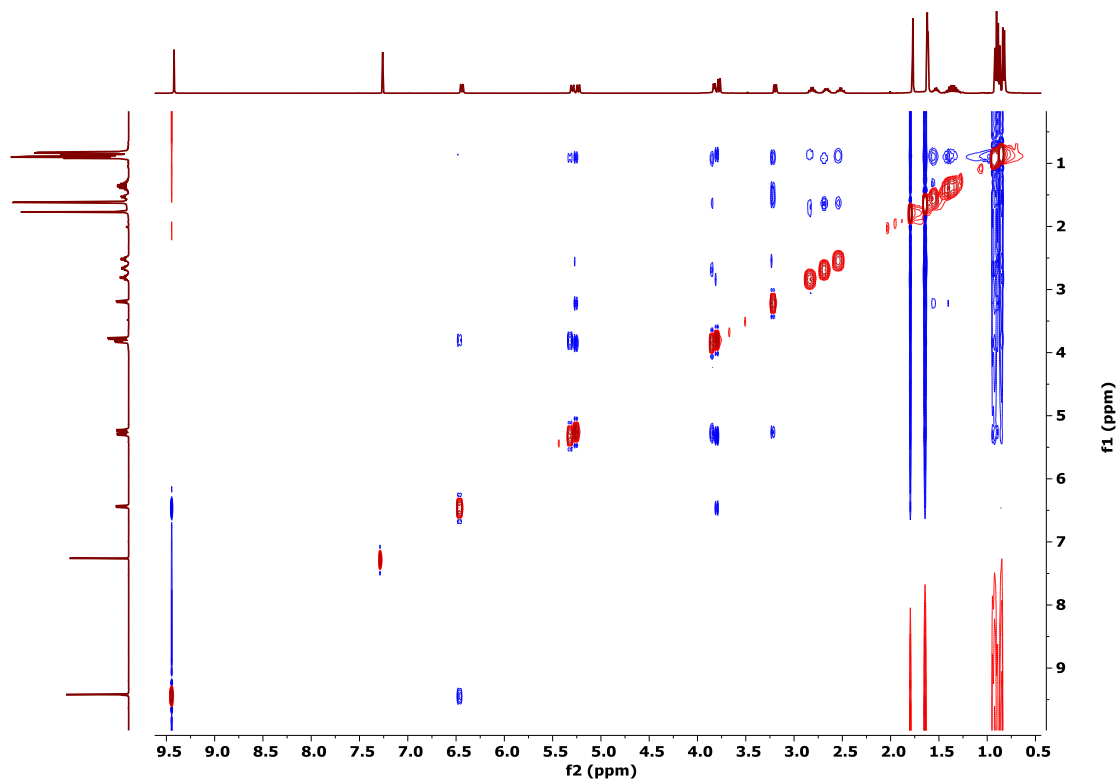
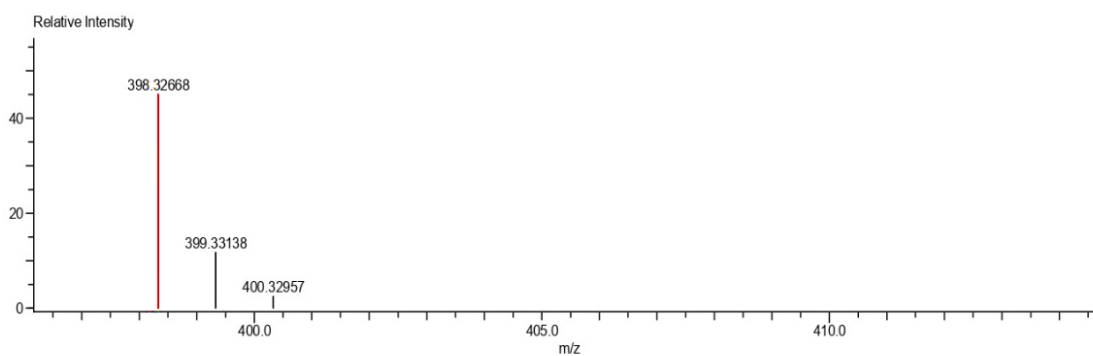


Figura S20. Espectro COSY del scytopoliol A (**22**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura S21.** Espectro NOESY del scytopoliol A (**22**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Charge number:1 Tolerance:1.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)  
 Element: $^{12}\text{C}$ :0 .. 25,  $^1\text{H}$ :0 .. 50,  $^{14}\text{N}$ :0 .. 3,  $^{16}\text{O}$ :0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
398.32668	15869.94	398.32703	-0.35	-0.88	$^{12}\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_1\text{O}_4$	2.5

**Figura S22.** Espectro EM-AR-DART del scytopoliol A (**22**).

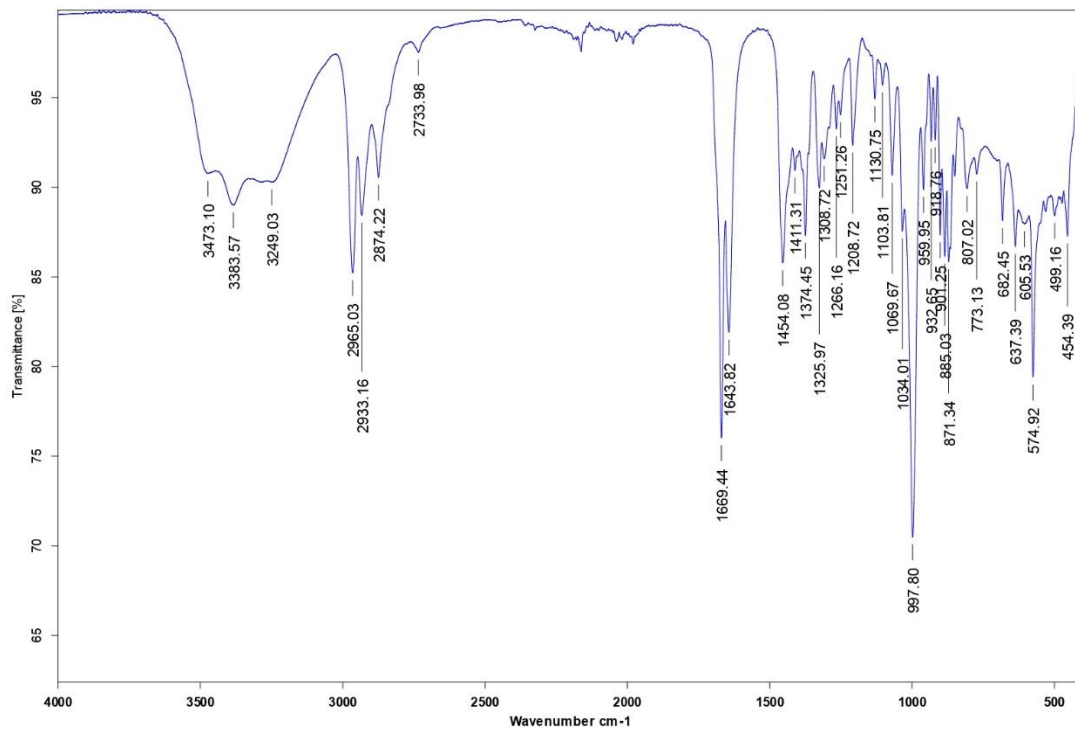


Figura S23. Espectro IR del scytalpoliol A (22).

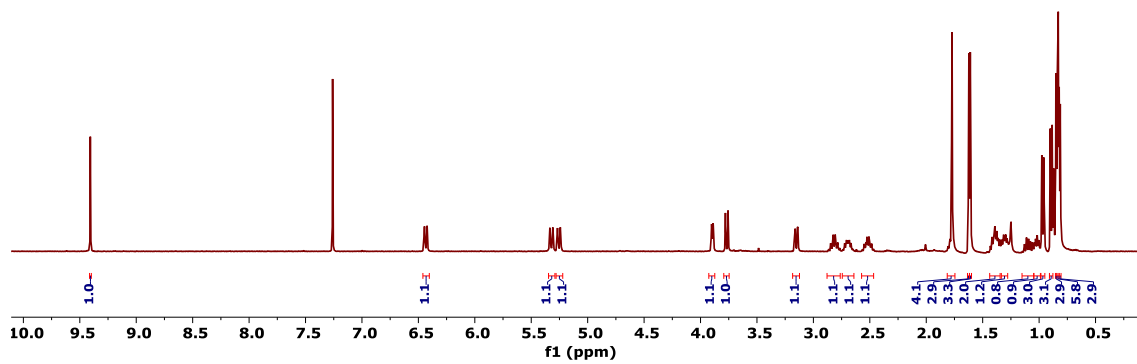


Figura S32. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del scytalpoliol B (23) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

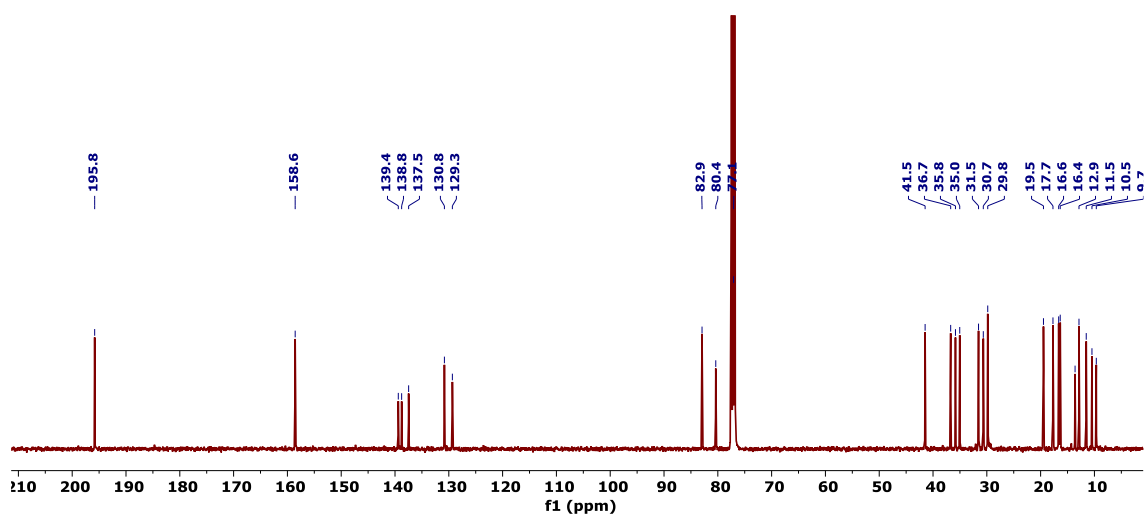


Figura S33. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del scytalpoliol B (**23**) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

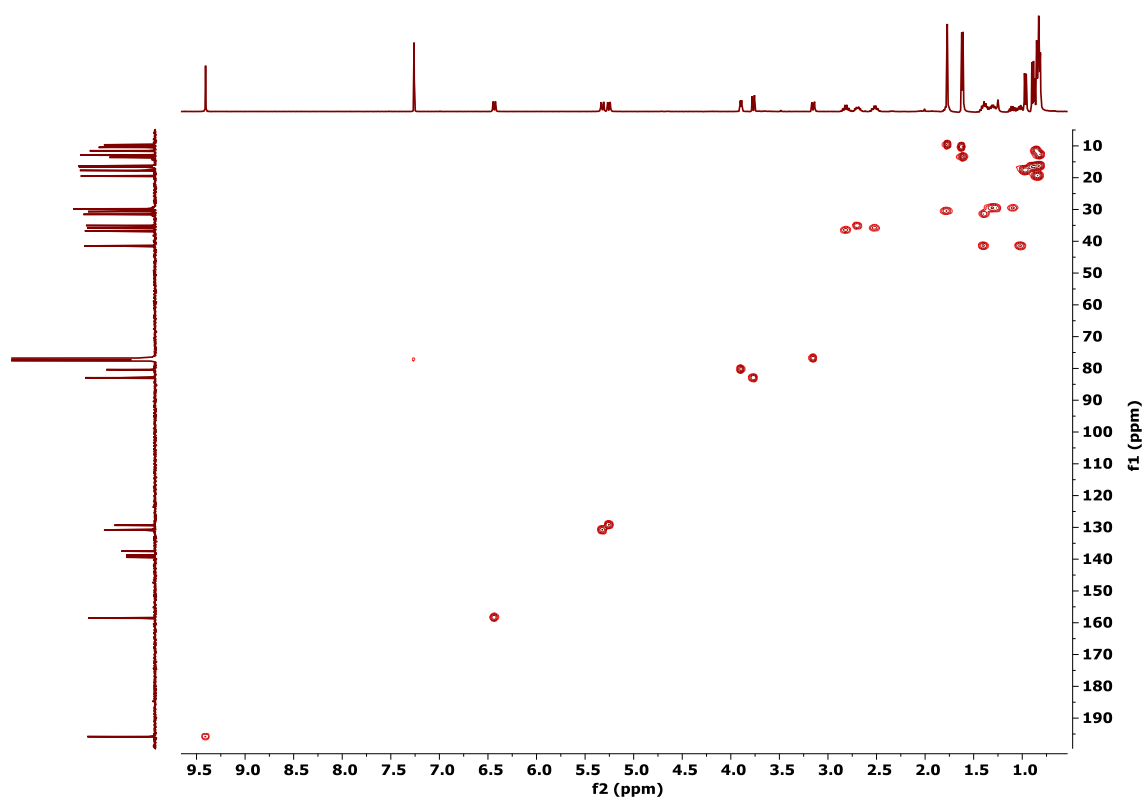


Figura S34. Espectro HSQC del scytalpoliol B (**23**) en CDCl<sub>3</sub>.



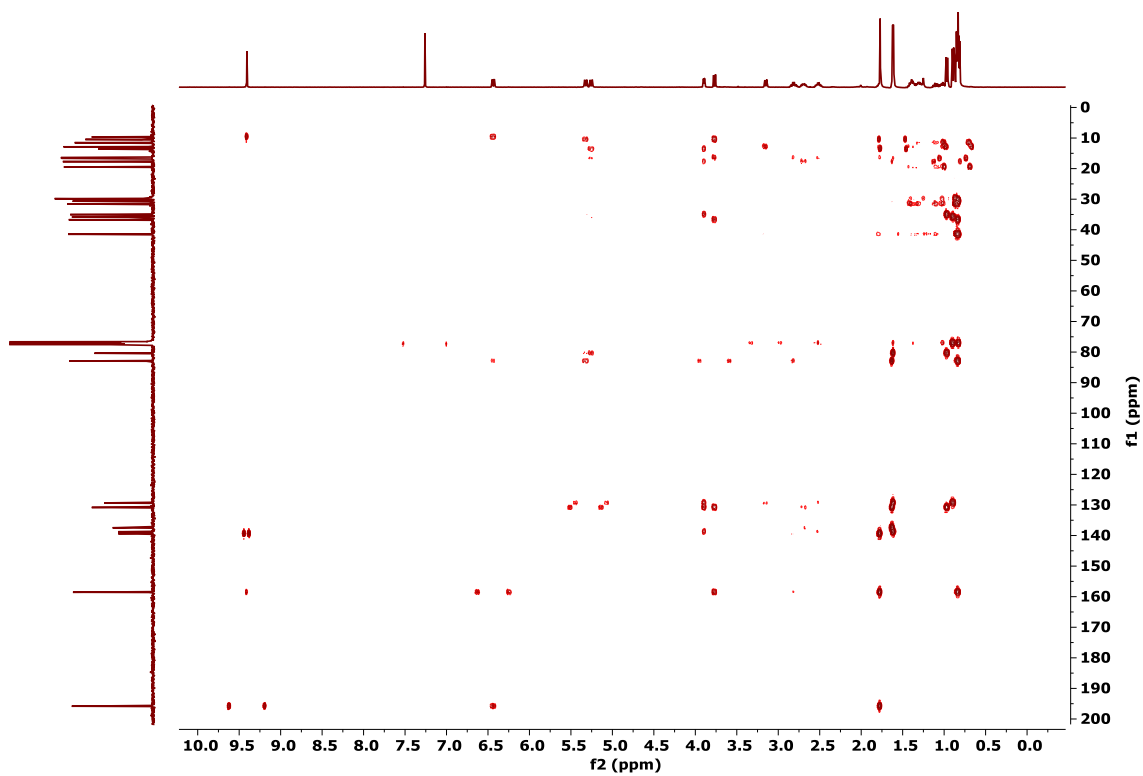


Figura S35. Espectro HMBC del scytalpoliol B (**23**) en  $\text{CDCl}_3$ .

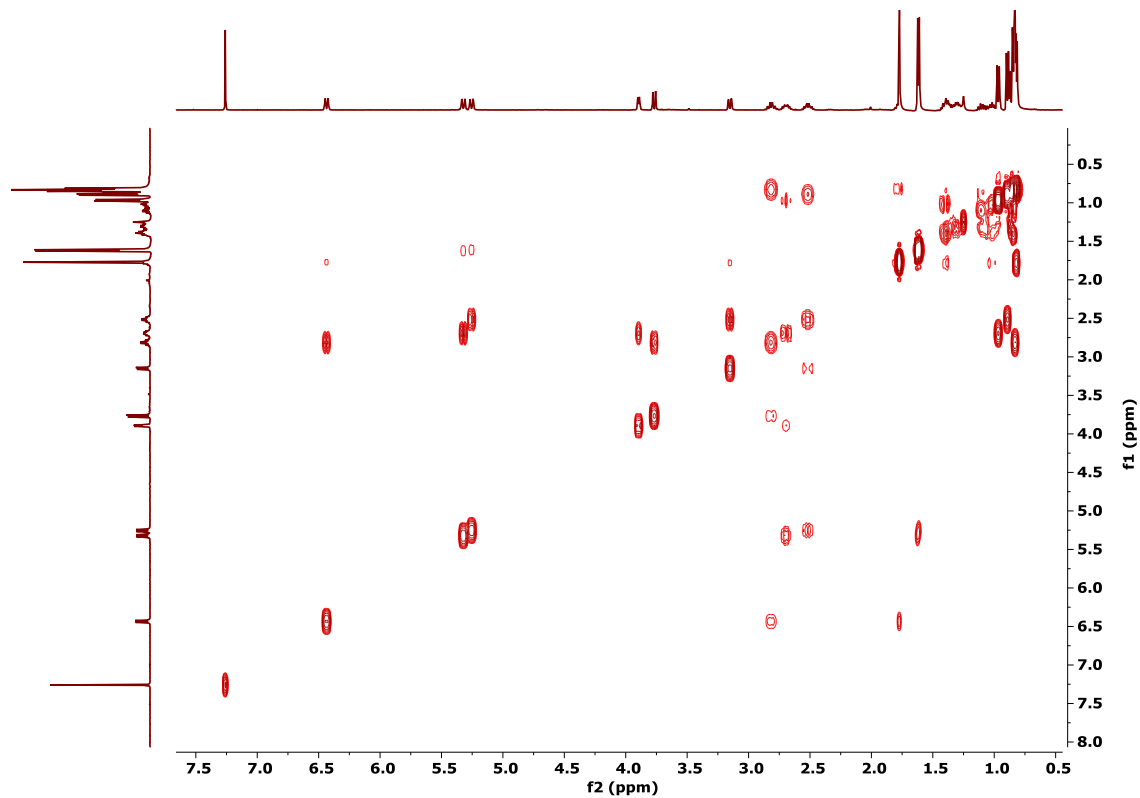
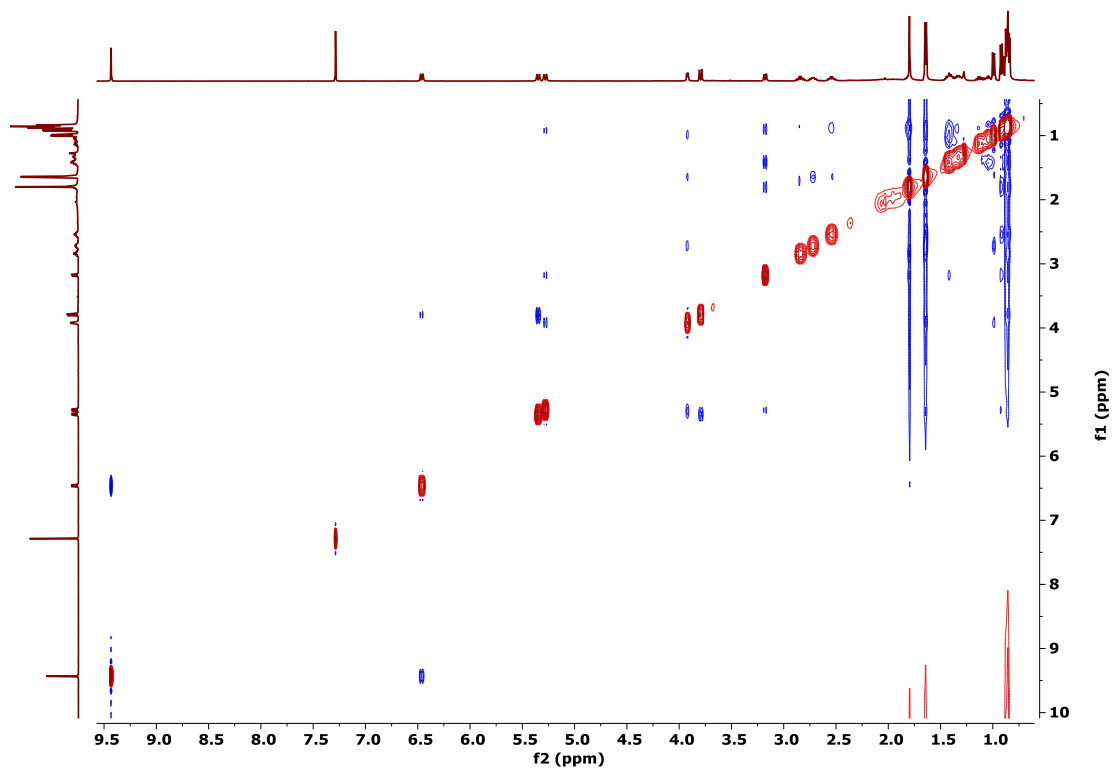
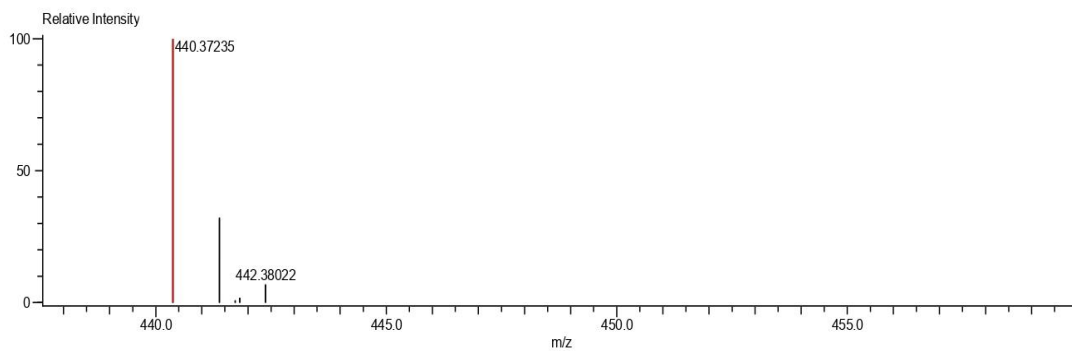


Figura S36. Espectro COSY del scytalpoliol B (**23**) en  $\text{CDCl}_3$ .



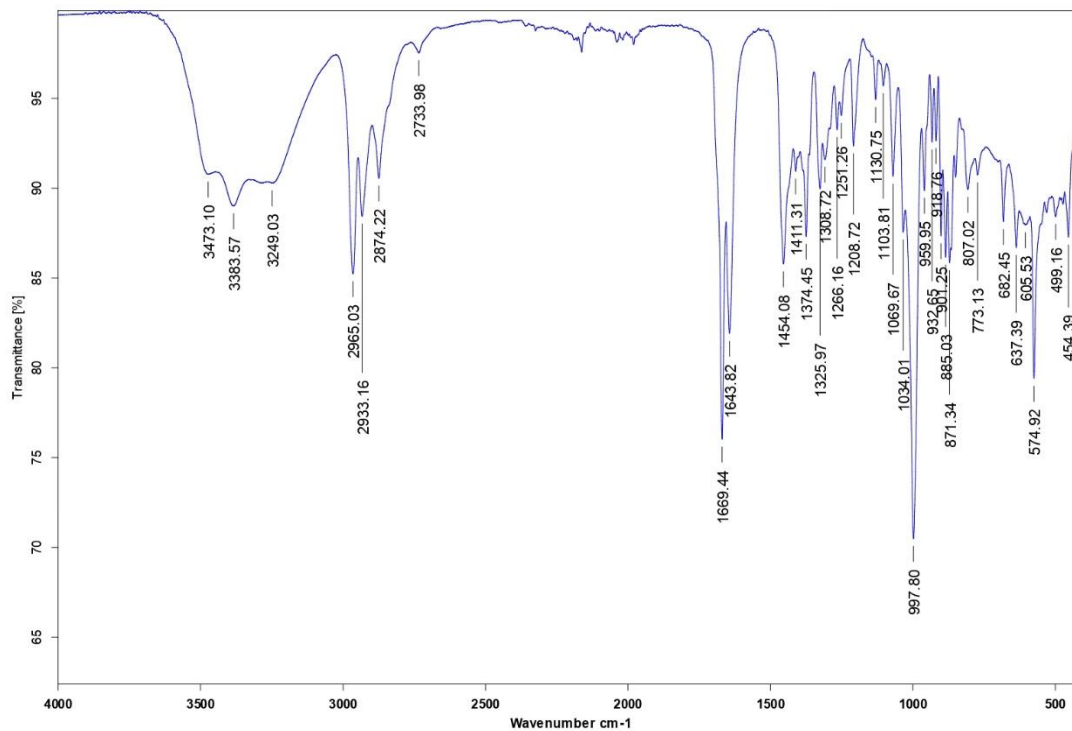
**Figura S37.** Espectro NOESY del scytalpoliol B (**23**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Charge number:1 Tolerance:3.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 40.0 (Fraction:Both)  
 Element: $^{12}\text{C}$ :0 .. 40,  $^1\text{H}$ :0 .. 70,  $^{14}\text{N}$ :0 .. 1,  $^{16}\text{O}$ :0 .. 7



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
440.37235	32158.83	440.37398	-1.63	-3.70	$^{12}\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{N}_1\text{O}_4$	2.5

**Figura S38.** Espectro EM-AR-DART del scytalpoliol B (**23**).



**Figura S39.** Espectro IR del scytopoliol B (23).

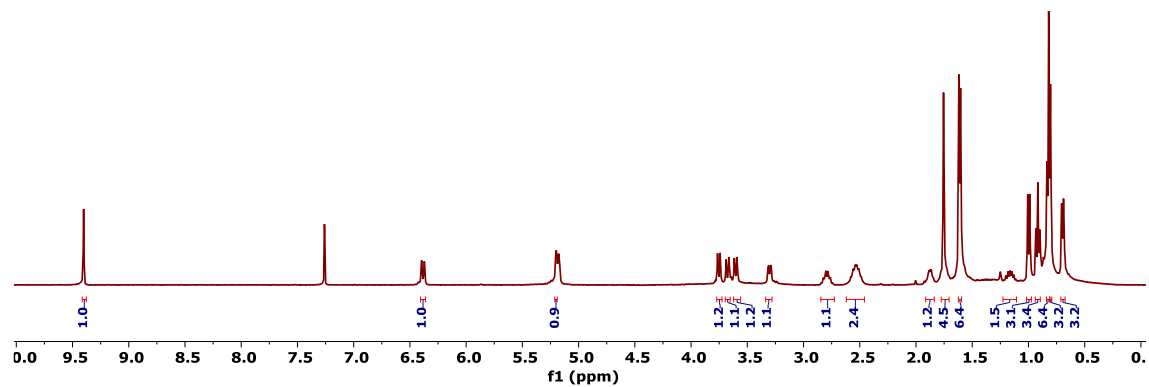


Figura S24. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del scytalpoliol C (**24**) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

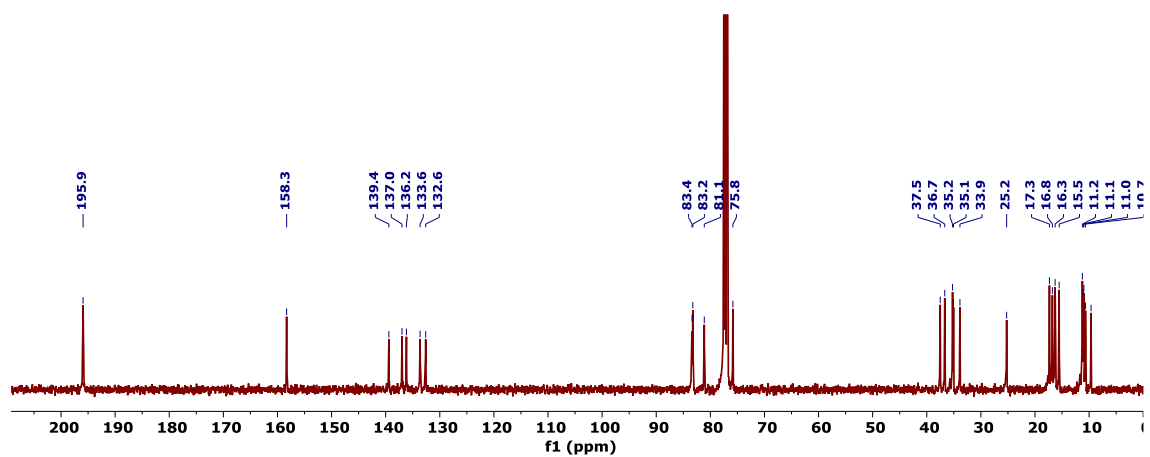


Figura S25. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del scytalpoliol C (**24**) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

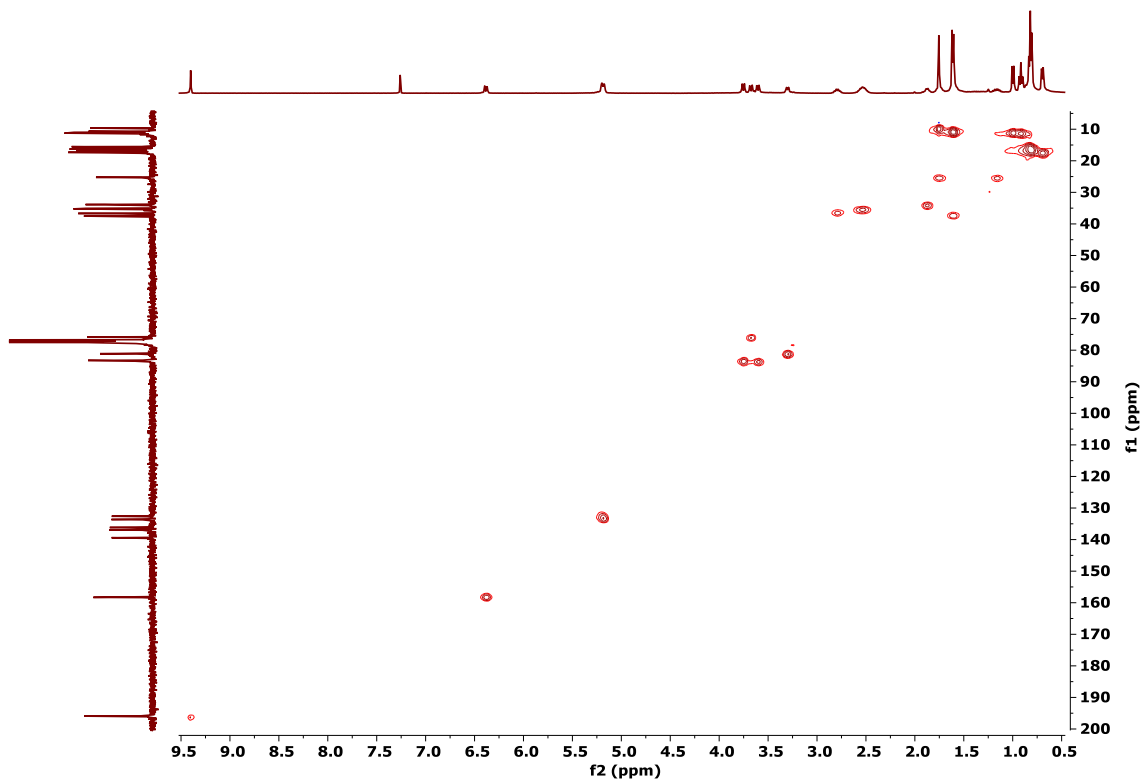


Figura S26. Espectro HSQC del scytalpoliol C (**24**) en  $\text{CDCl}_3$ .

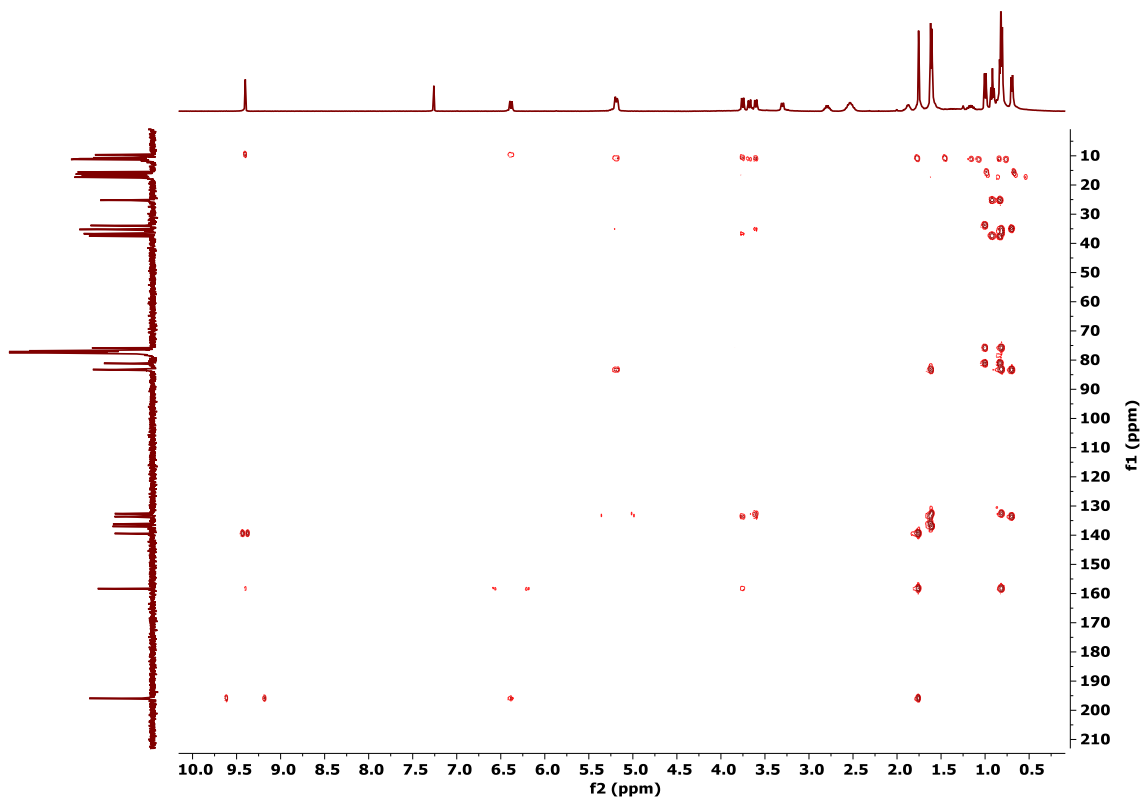


Figura S27. Espectro HMBC del scytalpoliol C (**24**) en  $\text{CDCl}_3$ .

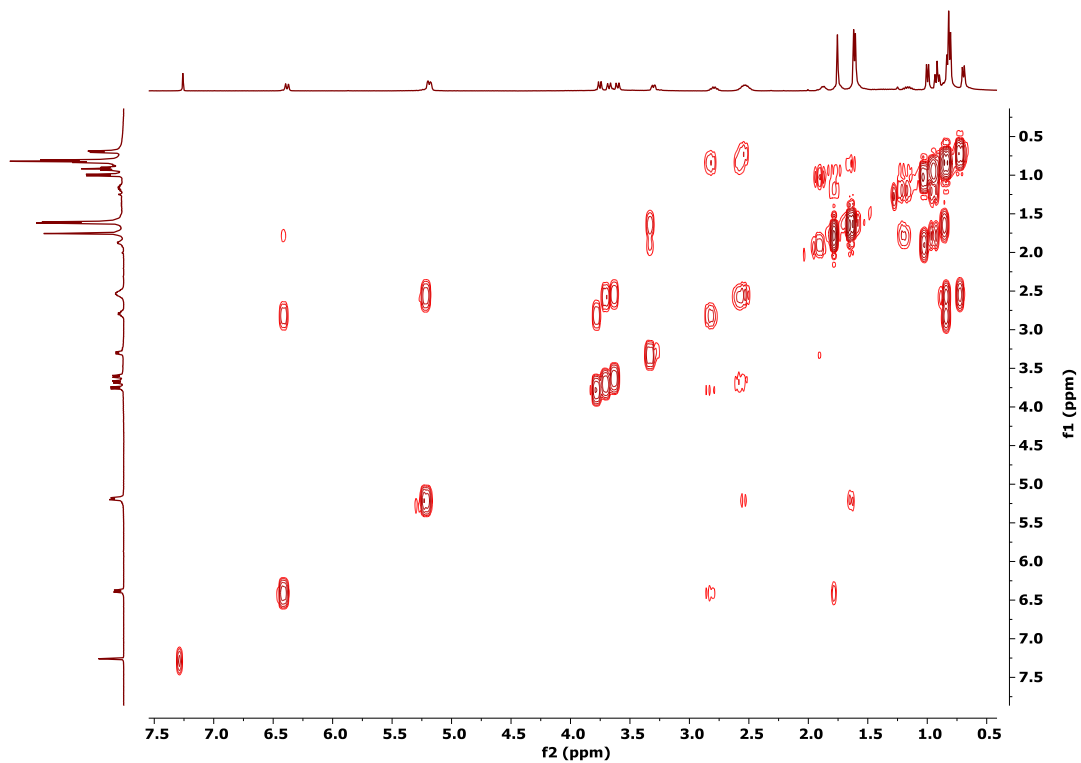


Figura S28. Espectro COSY del scytalpoliol C (**24**) en  $\text{CDCl}_3$ .

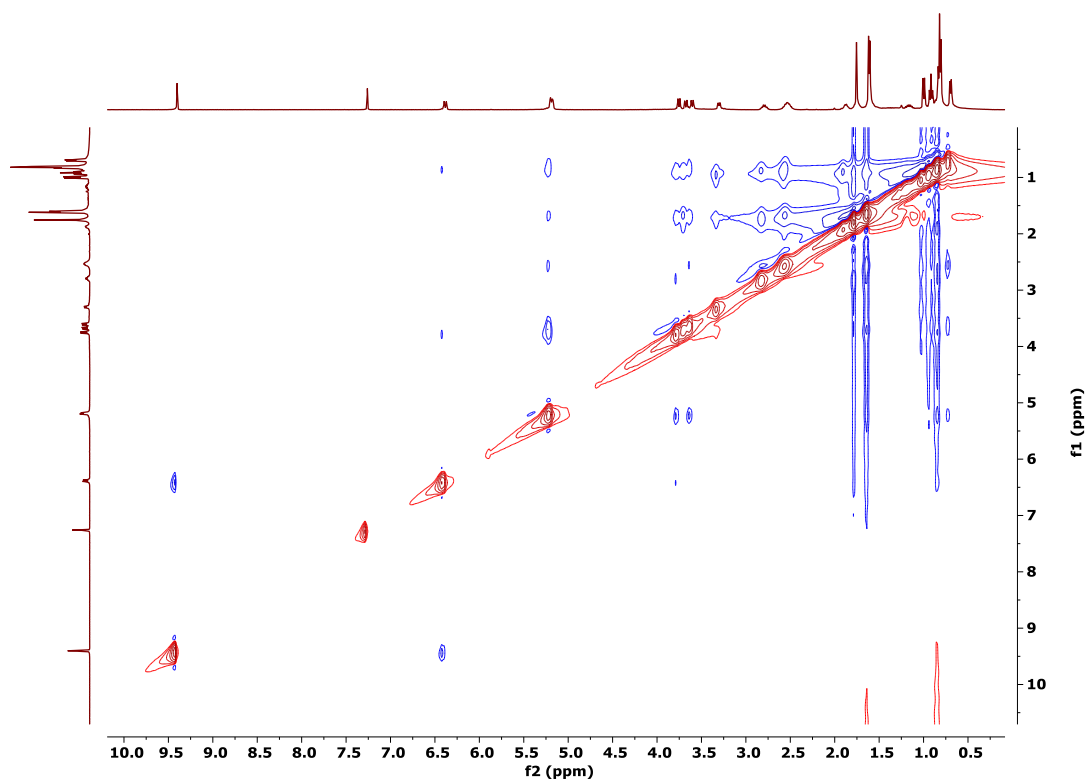
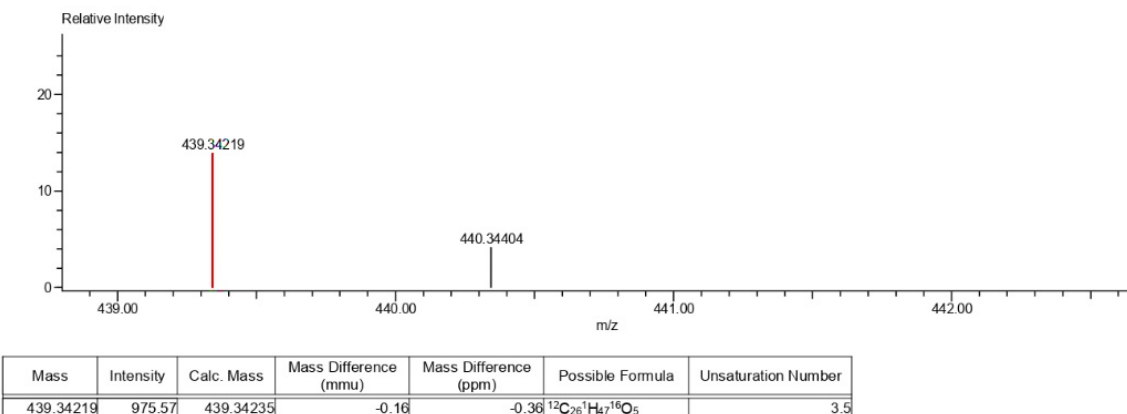
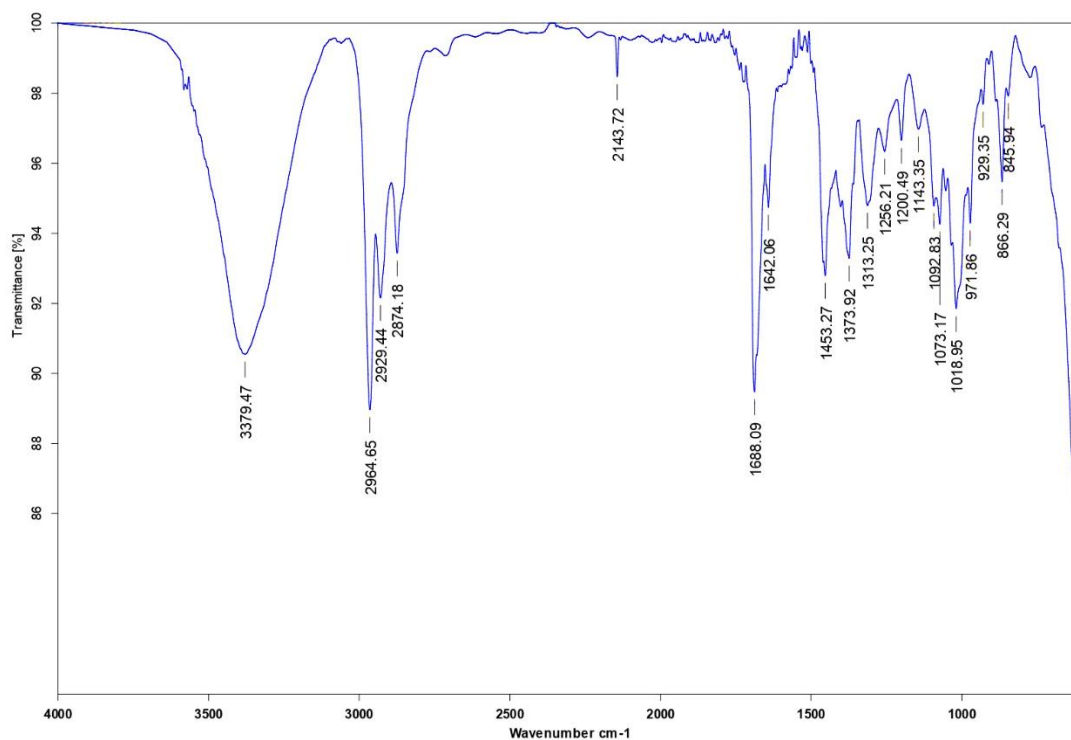


Figura S29. Espectro NOESY del scytalpoliol C (**24**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Charge number:1 Tolerance:3.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 40.0 (Fraction:Both)  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 40, <sup>1</sup>H:0 .. 70, <sup>14</sup>N:0 .. 0, <sup>16</sup>O:2 .. 5



**Figura S30.** Espectro EM-AR-DART del scytopoliol C (24).



**Figura S31.** Espectro IR del scytopoliol C (24).

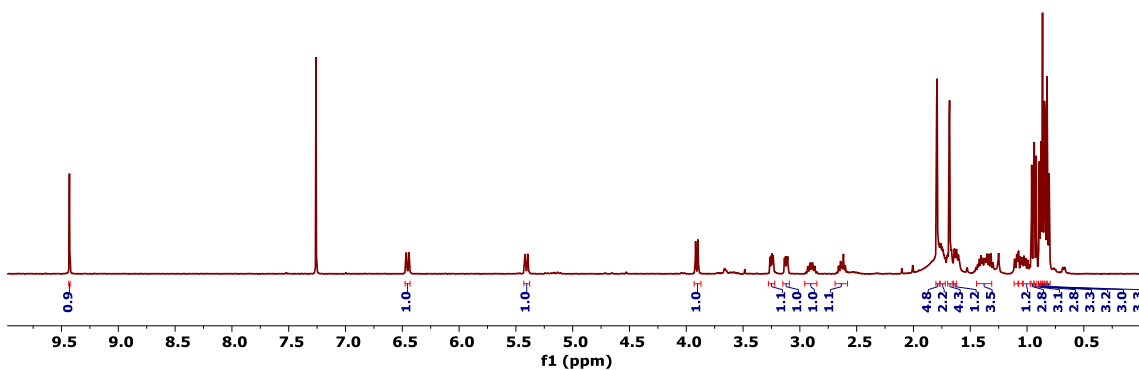


Figura S40. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del scytopoliol D (25) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

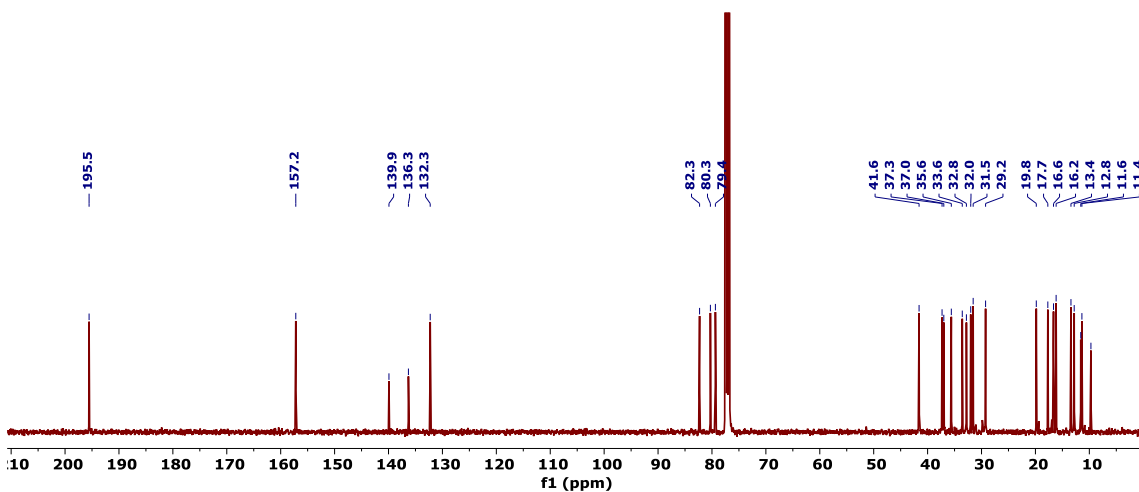


Figura S41. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del scytopoliol D (25) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.



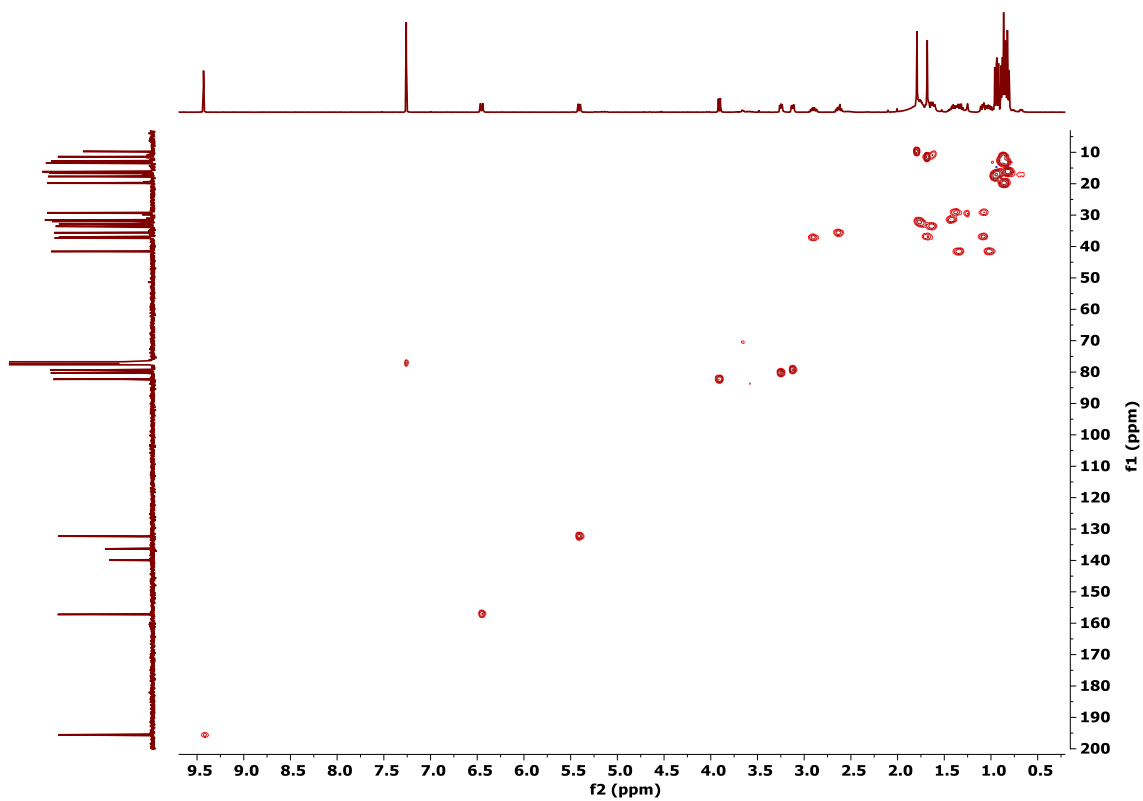


Figura S42. Espectro HSQC del scytalpoliol D (**25**) en  $\text{CDCl}_3$ .

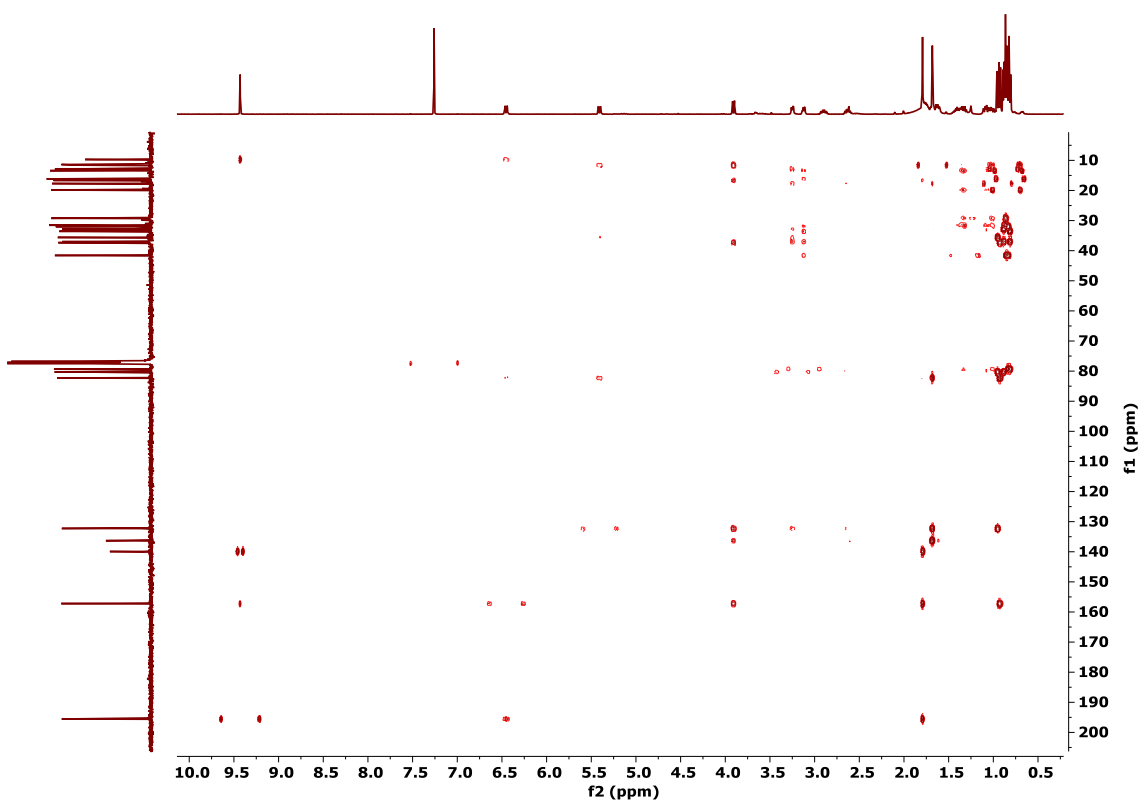


Figura S43. Espectro HMBC del scytalpoliol D (**25**) en  $\text{CDCl}_3$ .

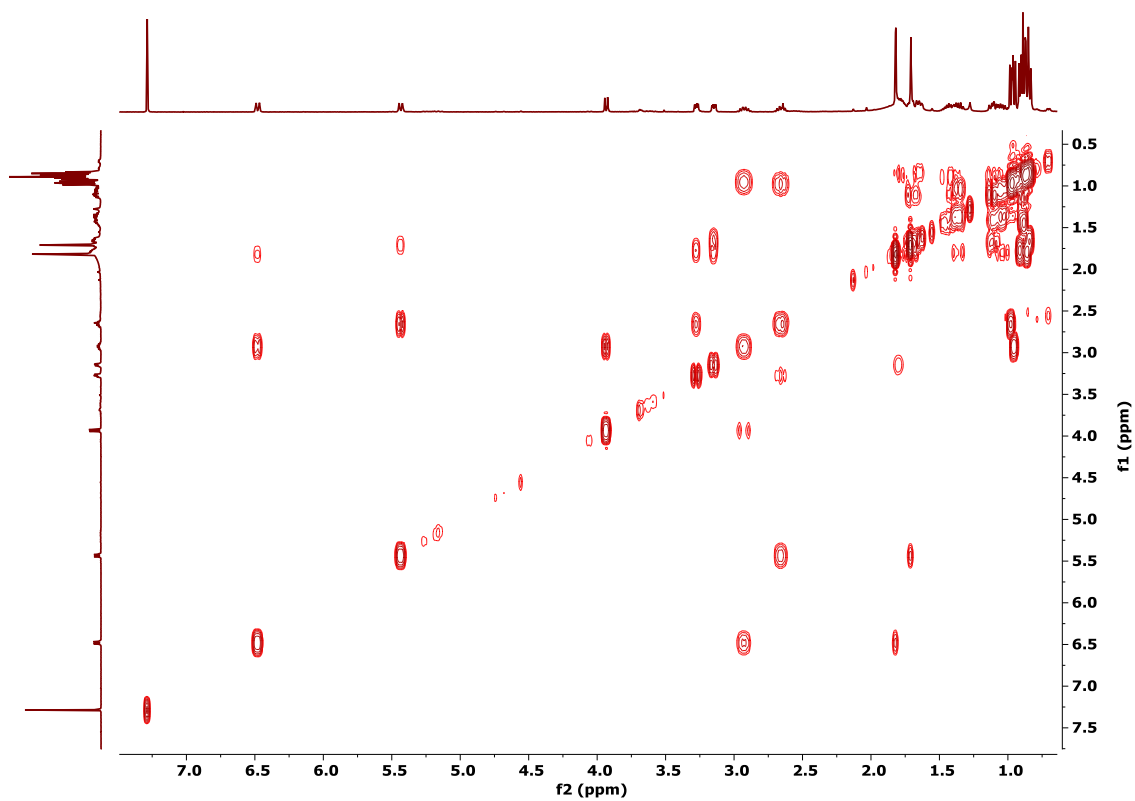


Figura S44. Espectro COSY del scytalpoliol D (**25**) en  $\text{CDCl}_3$ .

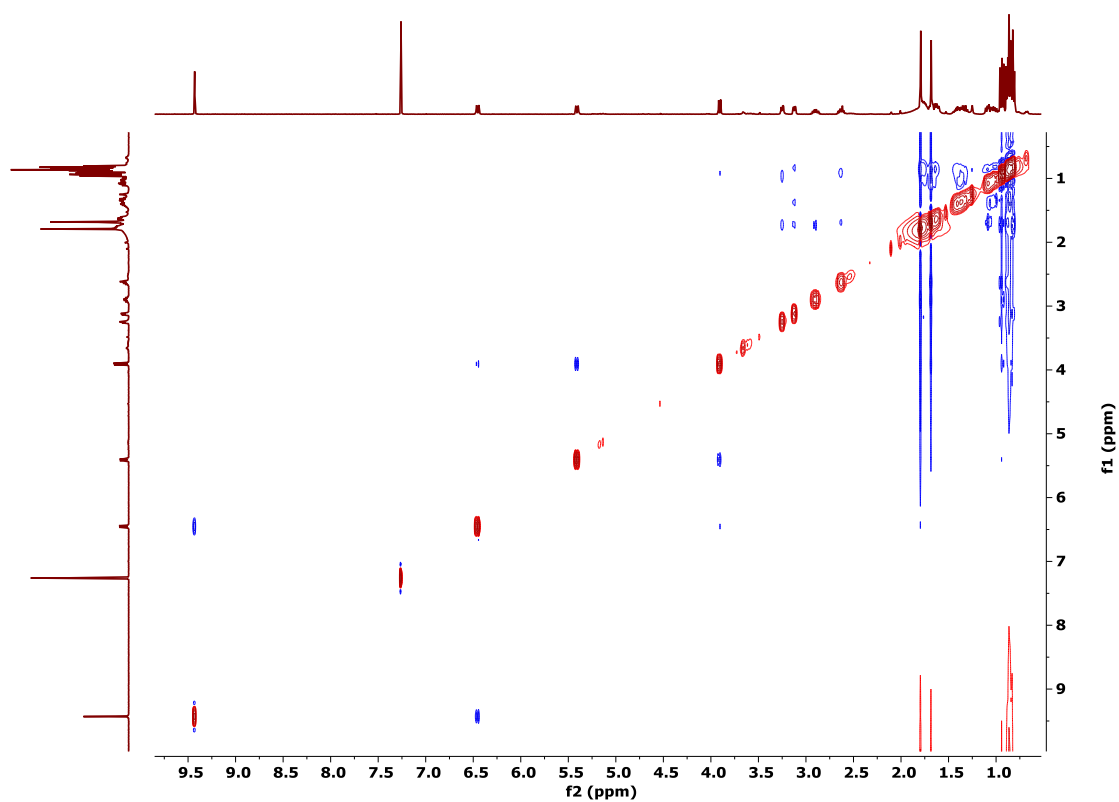
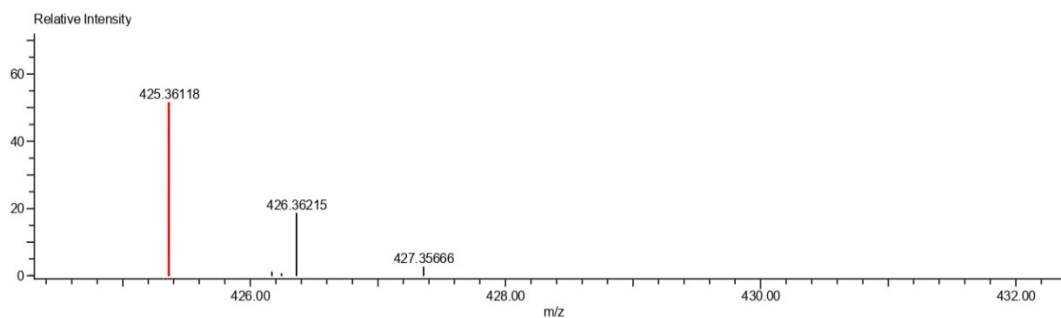


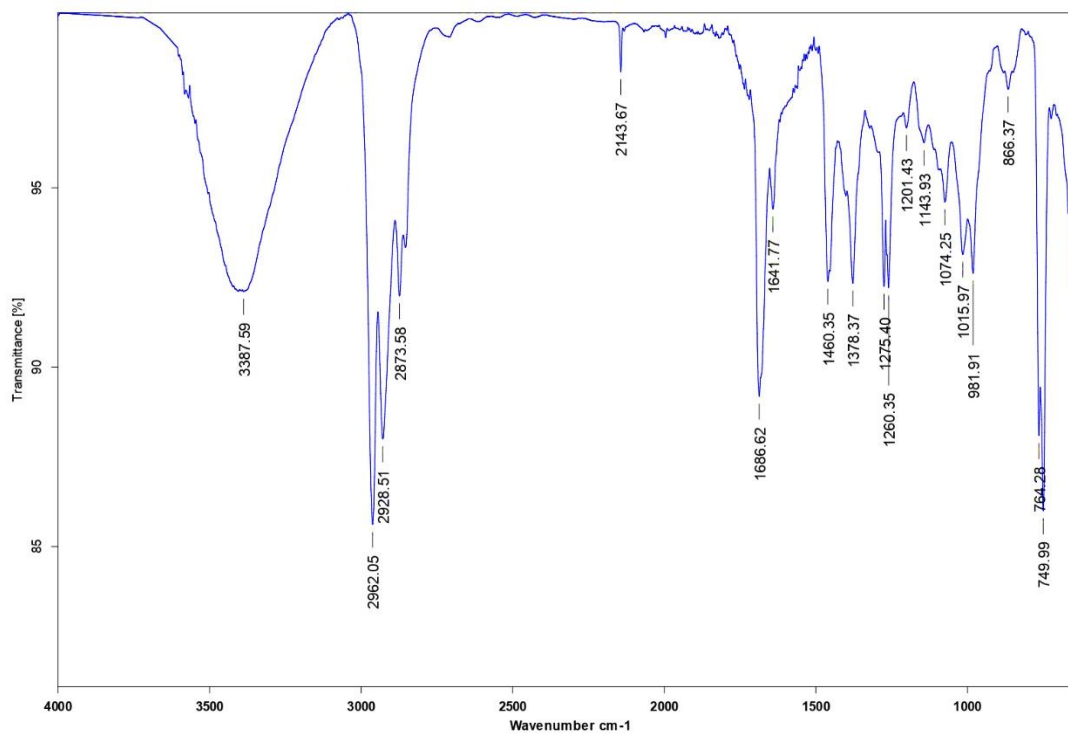
Figura S45. Espectro NOESY del scytalpoliol D (**25**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Charge number:1  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 40, <sup>1</sup>H:0 .. 70, <sup>16</sup>O:0 .. 5  
 Tolerance:5.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)  
 Unsaturation Number:0.0 .. 100.0 (Fraction:Both)

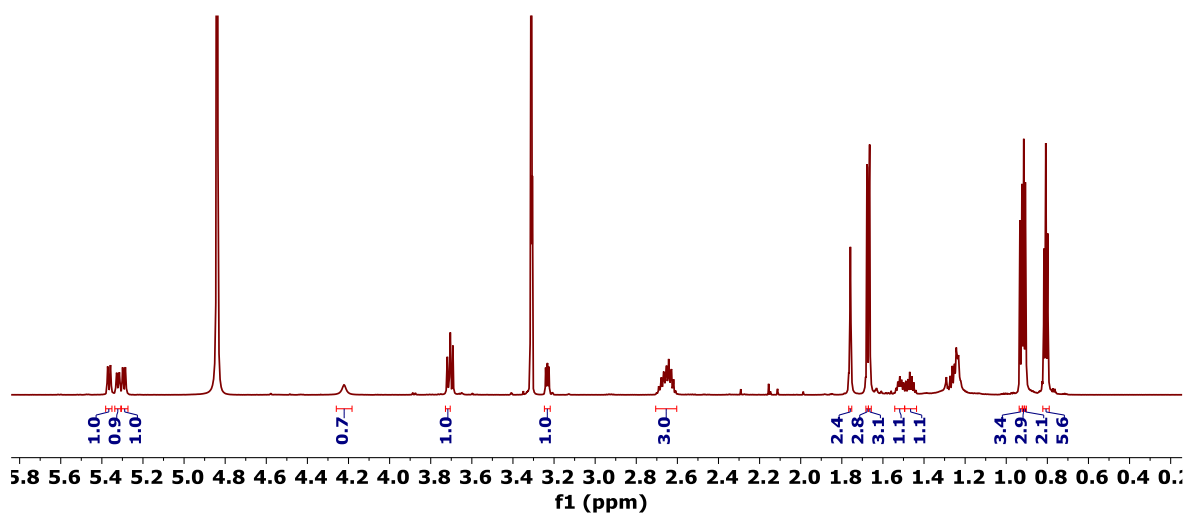


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
425.36118	5388.09	425.36308	-1.91	-4.48	<sup>12</sup> C <sub>26</sub> <sup>1</sup> H <sub>49</sub> <sup>16</sup> O <sub>4</sub>	2.5

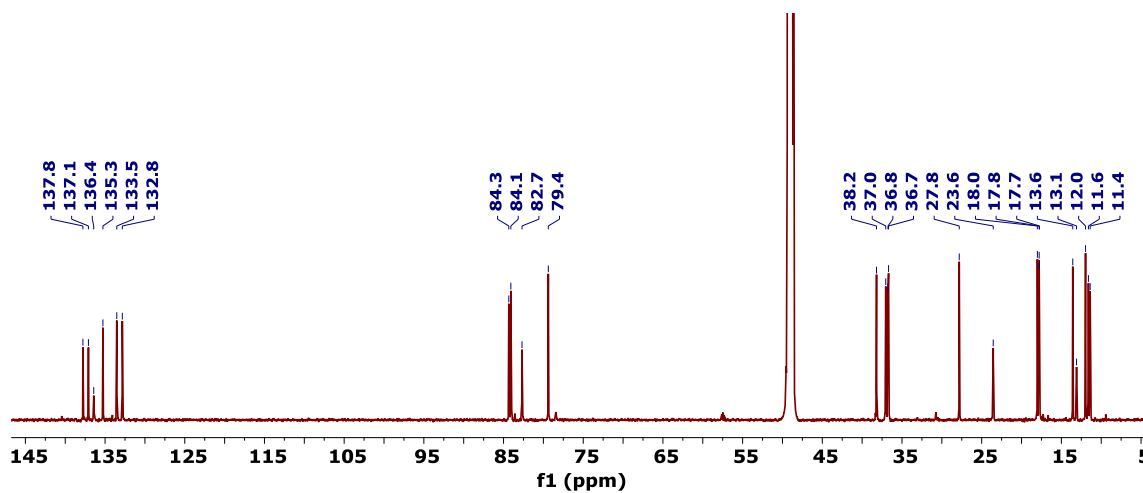
**Figura S46.** Espectro EM-AR-DART del scytalpoliol D (25).



**Figura S47.** Espectro IR del scytalpoliol D (25).



**Figura S48.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del scytalminol A (**26**) en MeOH-*d*<sub>4</sub> a 400 MHz.



**Figura S49.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del scytalminol A (**26**) en MeOH-*d*<sub>4</sub> a 100 MHz.

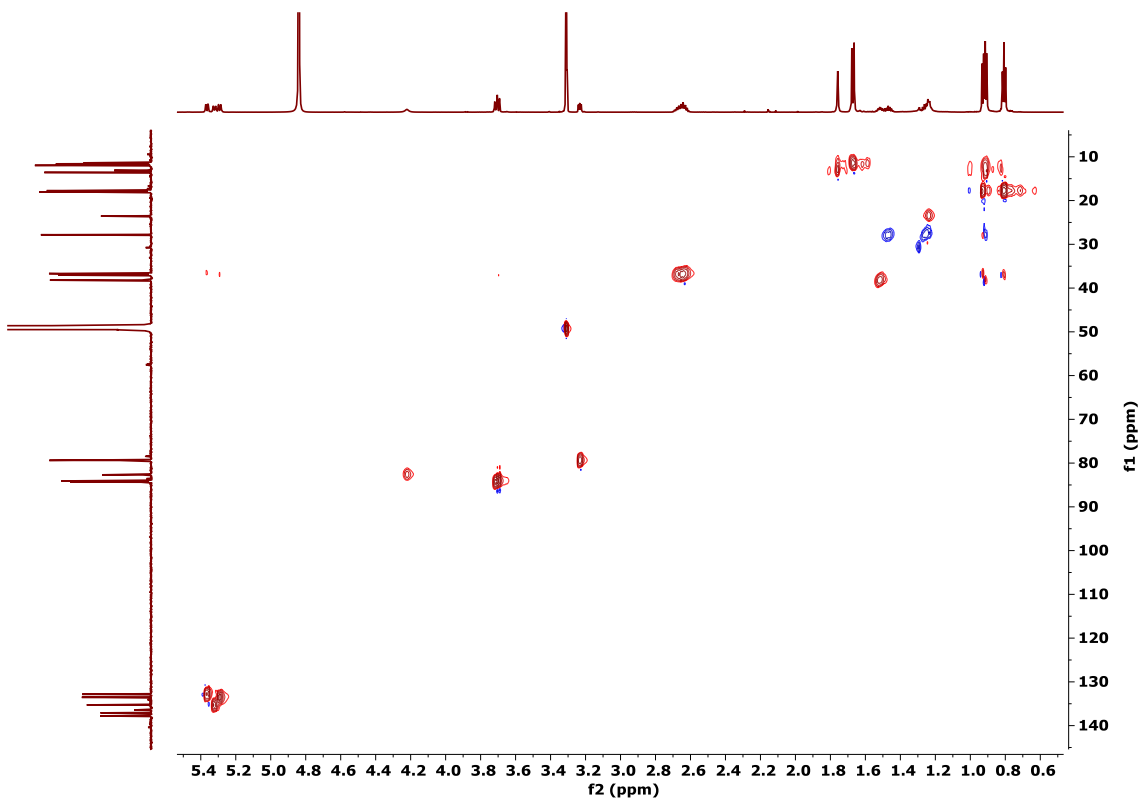


Figura S50. Espectro HSQC del scytalminol A (**26**) en MeOH- $d_4$ .

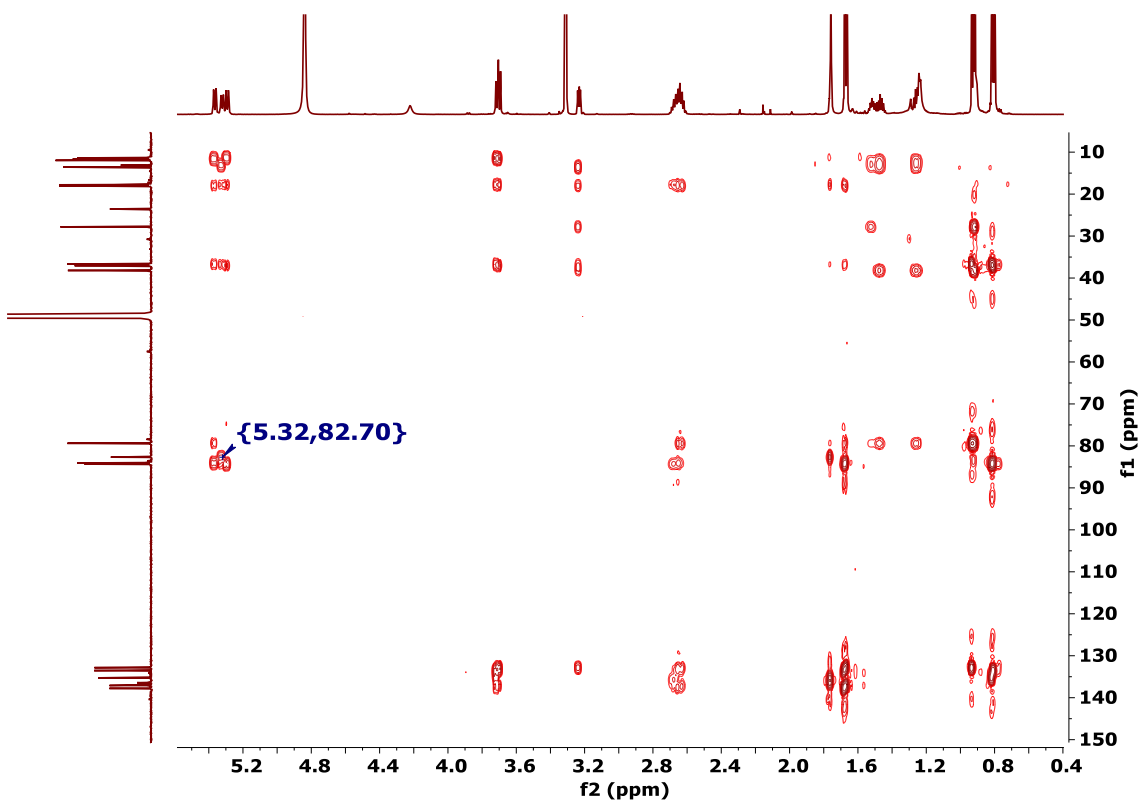


Figura S51. Espectro HMBC del scytalminol A (**26**) en MeOH- $d_4$ .

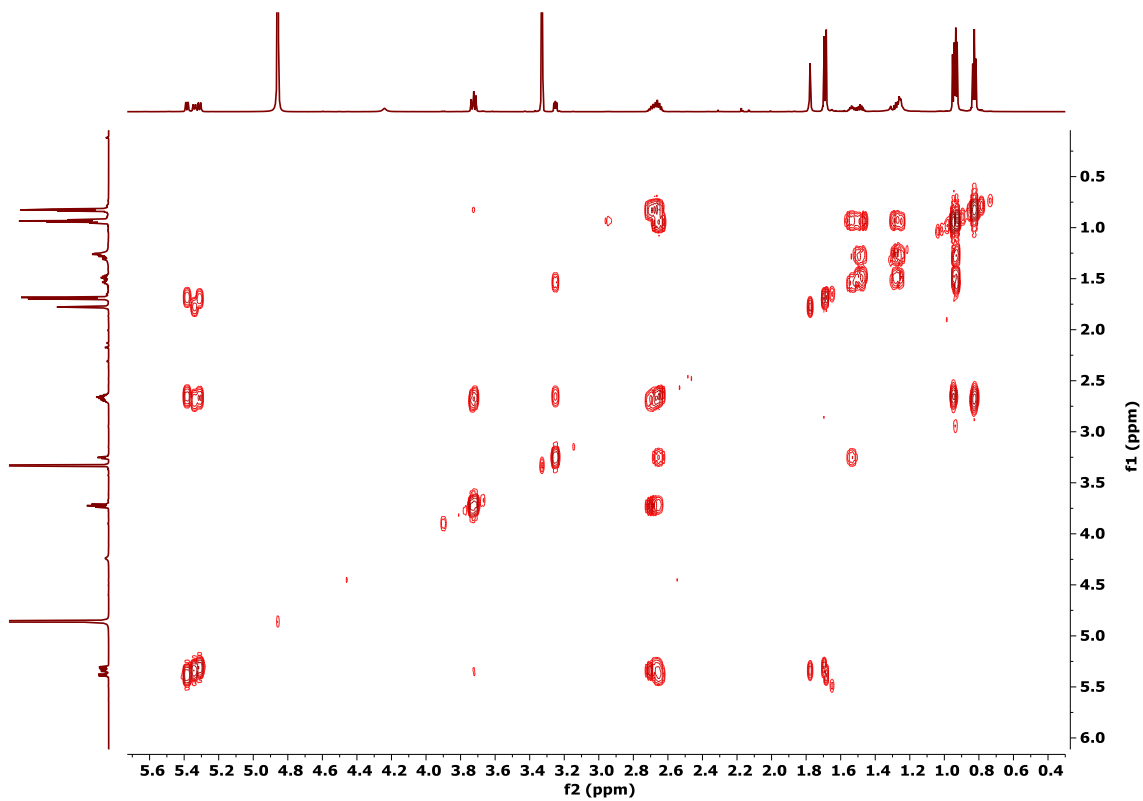


Figura S52. Espectro COSY del scytalminol A (**26**) en MeOH- $d_4$ .

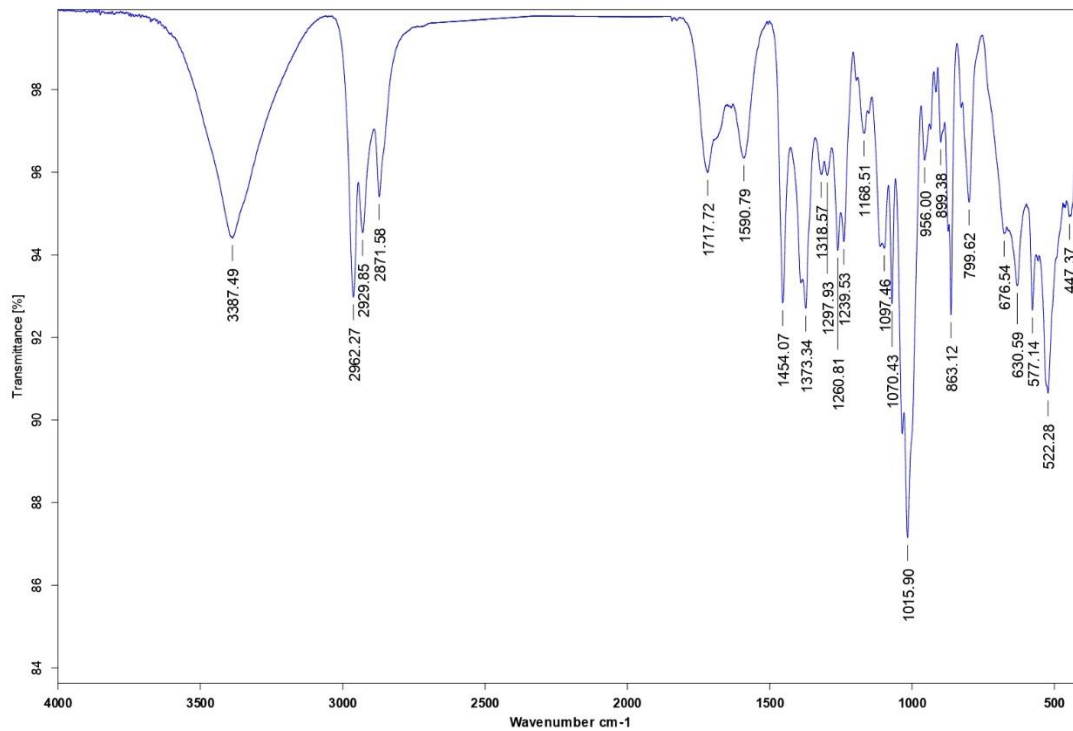
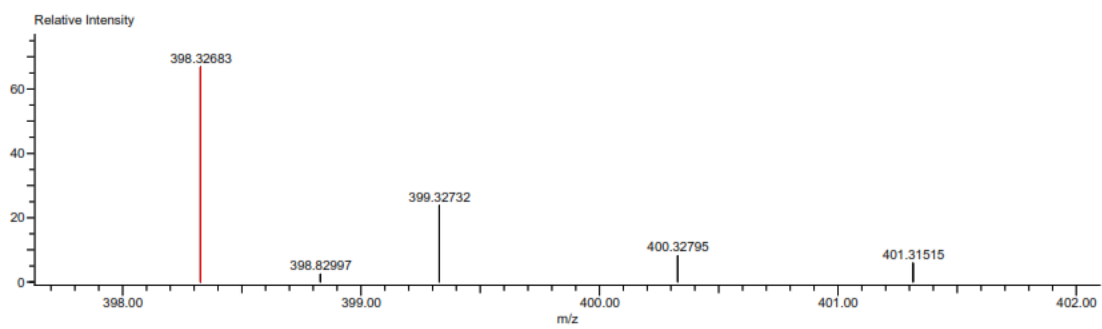


Figura S53. Espectro IR del scytalminol A (**26**).

Charge number:1  
Element:<sup>12</sup>C:0 .. 23, <sup>1</sup>H:0 .. 50, <sup>14</sup>N:0 .. 2, <sup>16</sup>O:0 .. 4  
Tolerance:2.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)  
Unsaturation Number:0.0 .. 100.0 (Fraction:Both)

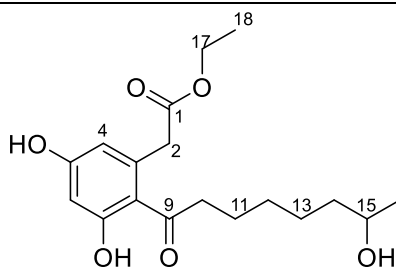


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
398.32683	3308.31	398.32703	-0.20	-0.51	<sup>12</sup> C <sub>23</sub> <sup>1</sup> H <sub>44</sub> <sup>14</sup> N <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>4</sub>	2.5

**Figura S54.** Espectro EM-AR-DART del scytalminol A (**26**).

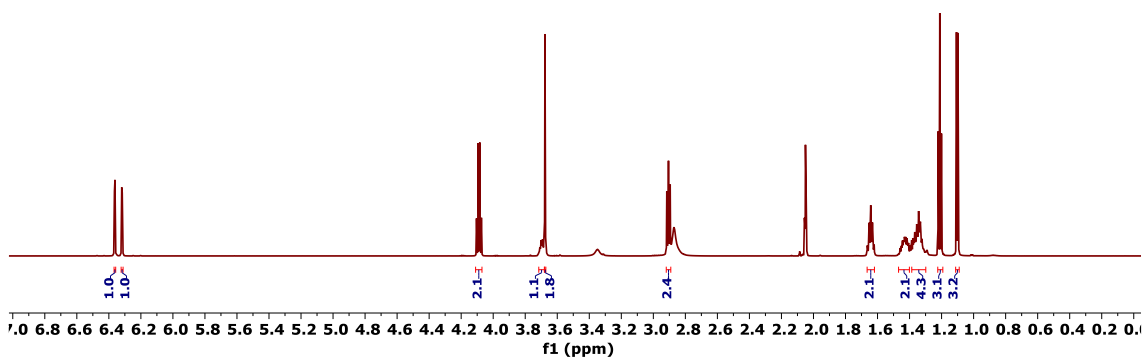
**Tabla S2.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de dotiorelona A (**27**) en acetona-d<sub>6</sub>.

Posición	δ <sub>C</sub> ppm	Tipo	δ <sub>H</sub> ppm, mult. (J en Hz)
1	171.7	C	-
2	40.2	CH <sub>2</sub>	3.67, s
3	137.3	C	-
4	111.9	CH	6.31, d (2.3)
5	160.8	C	-
6	102.8	CH	6.36, d (2.3)
7	159.9	C	-
8	121.0	C	-
9	206.5	C	-
10	44.6	CH <sub>2</sub>	2.90, t (7.7)
11	25.2	CH <sub>2</sub>	1.64, p (7.5)
12	30.3	CH <sub>2</sub>	1.36, m
13	26.6	CH <sub>2</sub>	1.43, m
14	26.6	CH <sub>2</sub>	1.35, m
15	40.3	CH <sub>2</sub>	1.39, m
16	67.6	CH <sub>2</sub>	3.70, m
17	24.1	CH <sub>3</sub>	1.10, d (6.2)
18	61.1	CH <sub>2</sub>	4.08, q (7.1)
19	14.6	CH <sub>3</sub>	1.21, t (7.15)

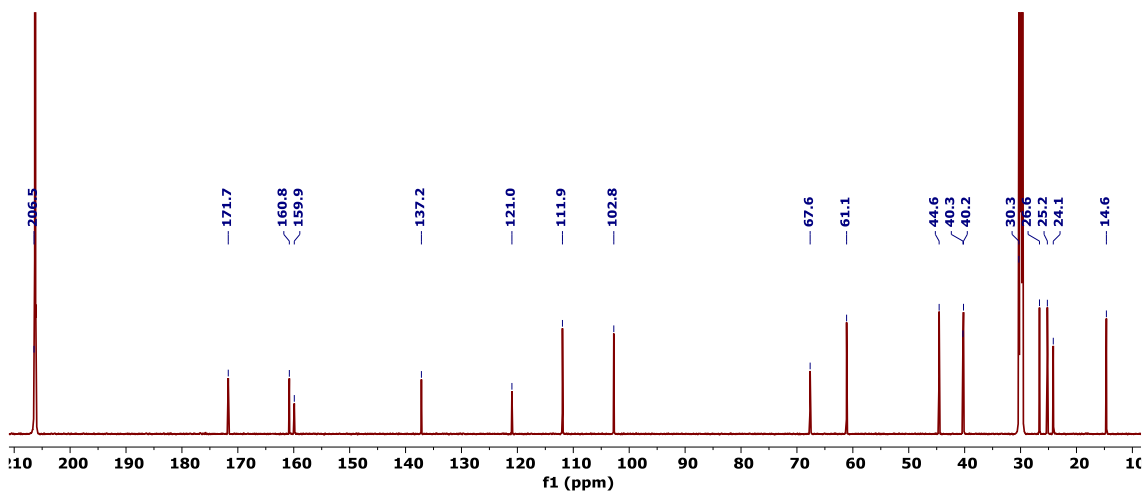


**27**

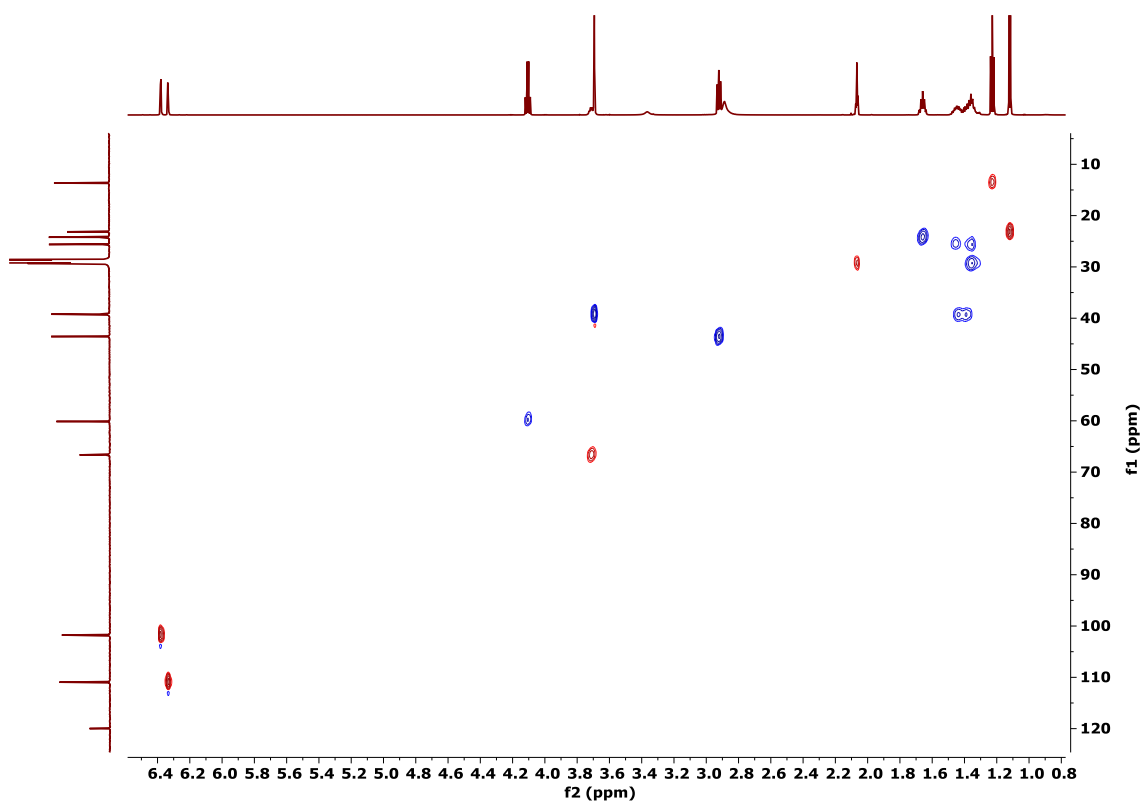




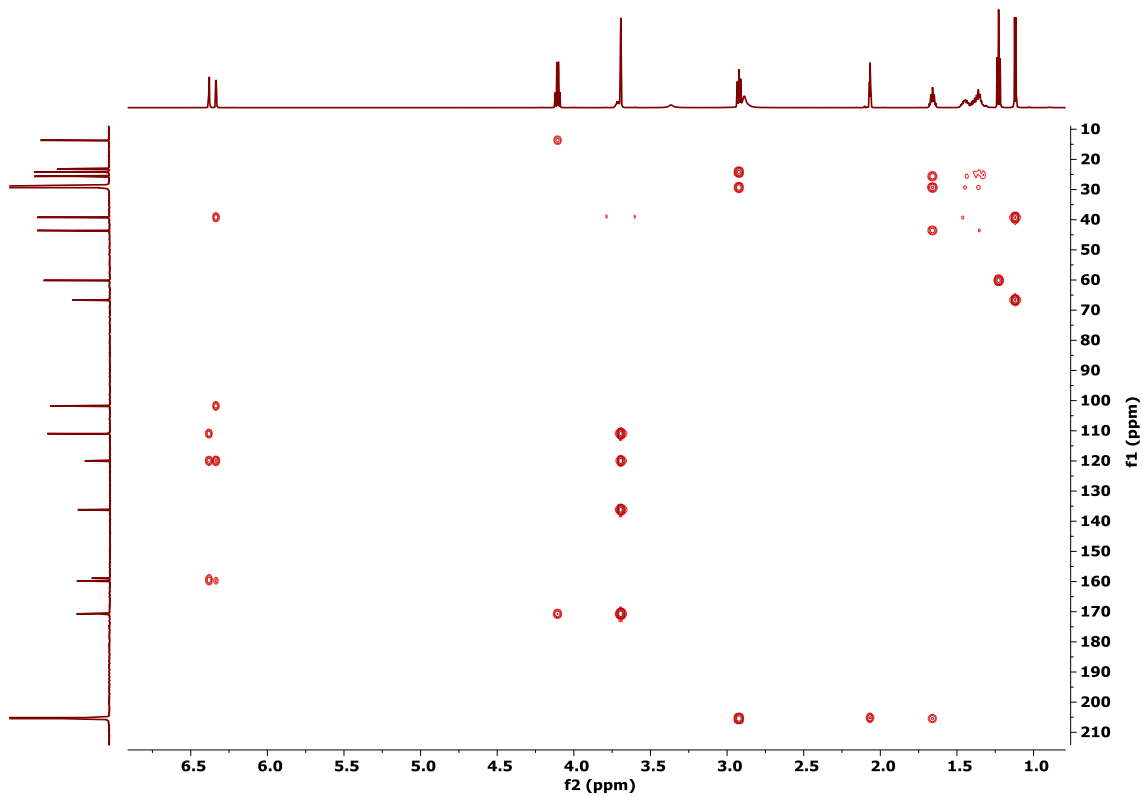
**Figura S55.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de dotiorelona A (**27**) en acetona-d<sub>6</sub> a 700 MHz.



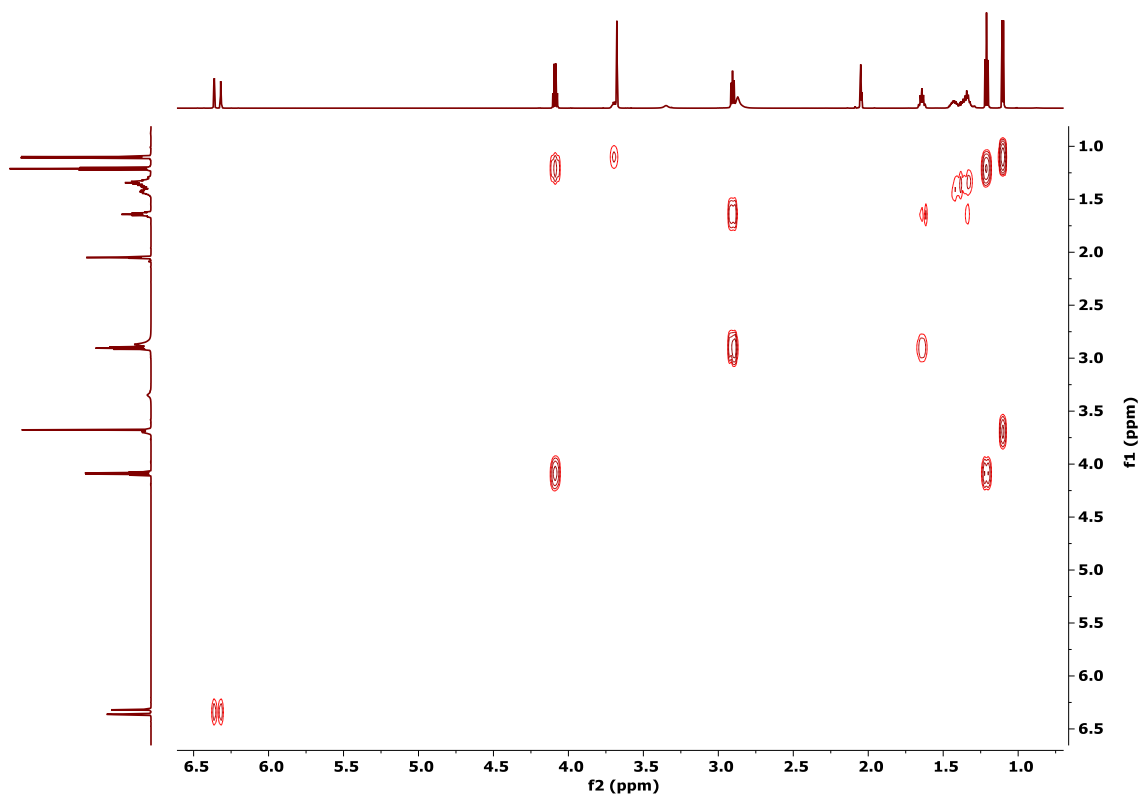
**Figura S56.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de dotiorelona A (**27**) en acetona-d<sub>6</sub> a 175 MHz.



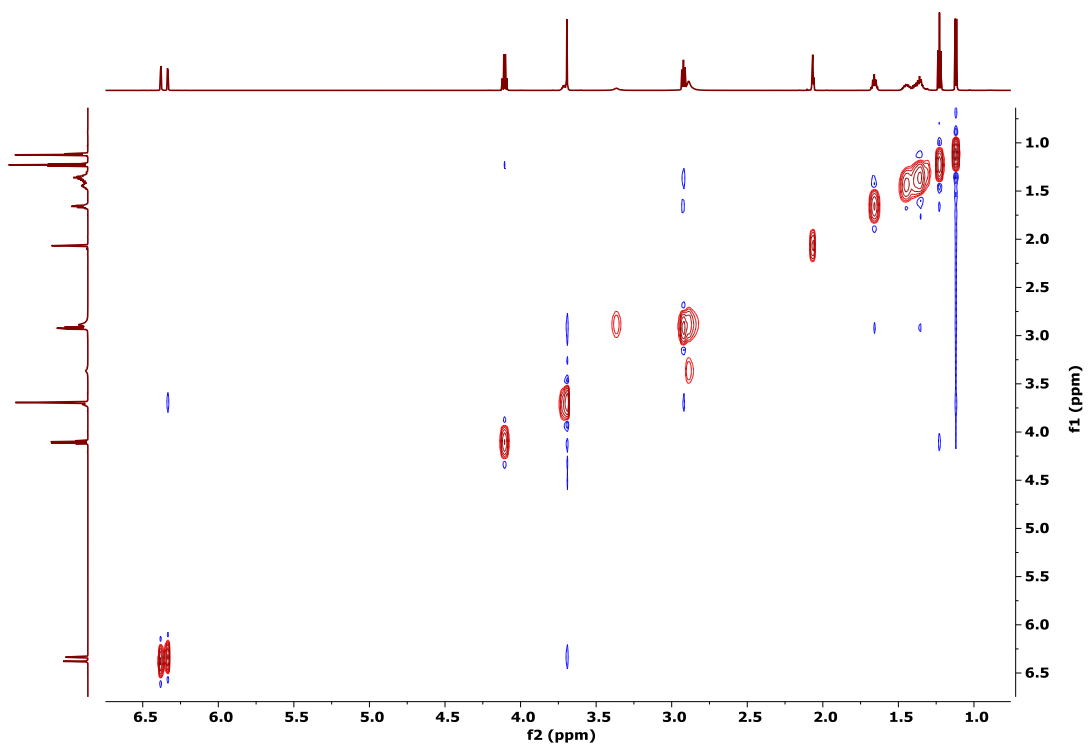
**Figura S57.** Espectro HSQC de dotiorelona A (**27**) en acetona- $d_6$ .



**Figura S58.** Espectro HMBC de dotiorelona A (**27**) en acetona- $d_6$ .



**Figura S59.** Espectro COSY de dotiorelona A (**27**) en acetona- $d_6$ .

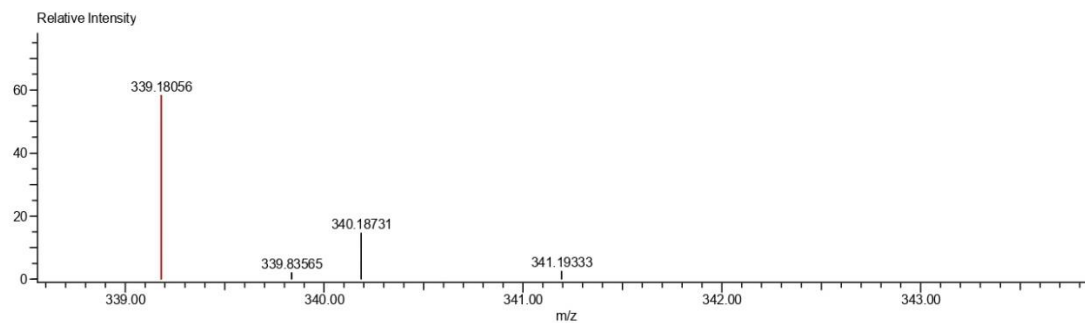


**Figura S60.** Espectro NOESY de dotiorelona A (**27**) en acetona- $d_6$ .

Charge number:1  
Element:<sup>12</sup>C:0 .. 20, <sup>1</sup>H:0 .. 100, <sup>16</sup>O:0 .. 10

Tolerance:1.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 100.0 (Fraction:Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
339.18056	10580.01	339.18076	-0.20	-0.60	<sup>12</sup> C <sub>18</sub> <sup>1</sup> H <sub>27</sub> <sup>16</sup> O <sub>6</sub>	5.5

Figura S61. Espectro EM-AR-DART de dotiorelona A (27).

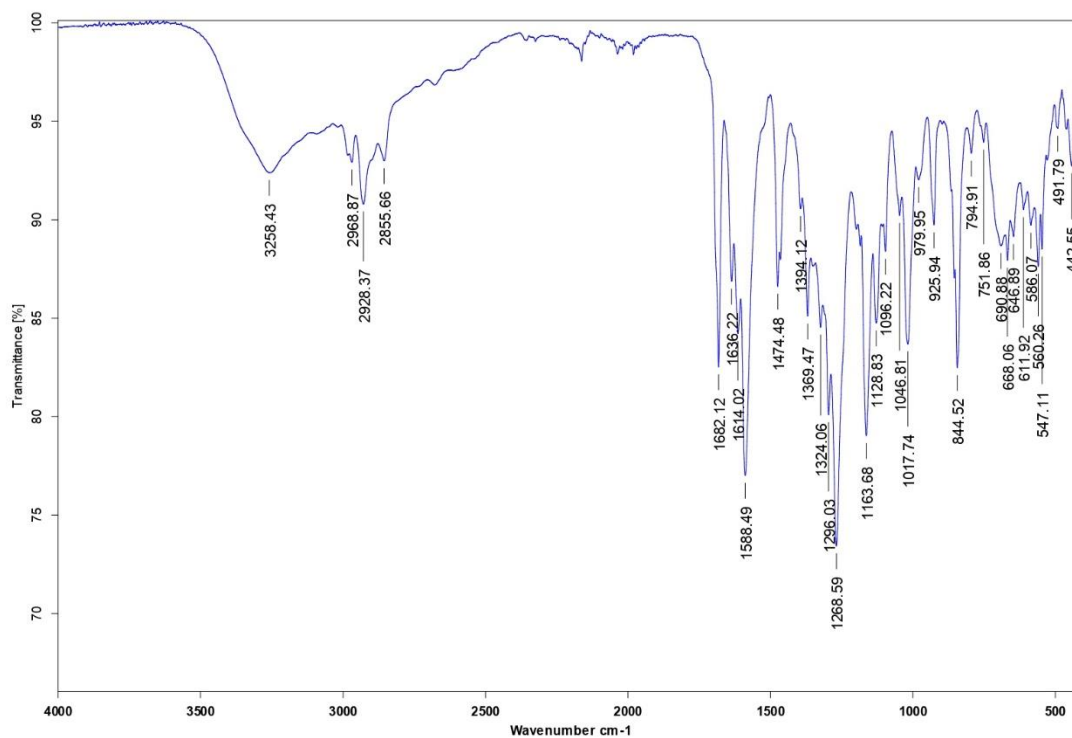
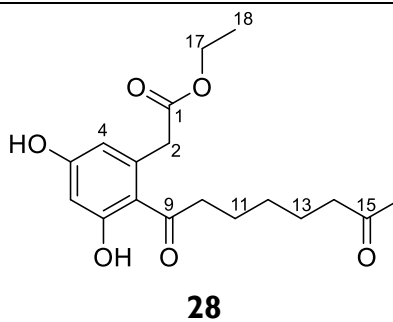
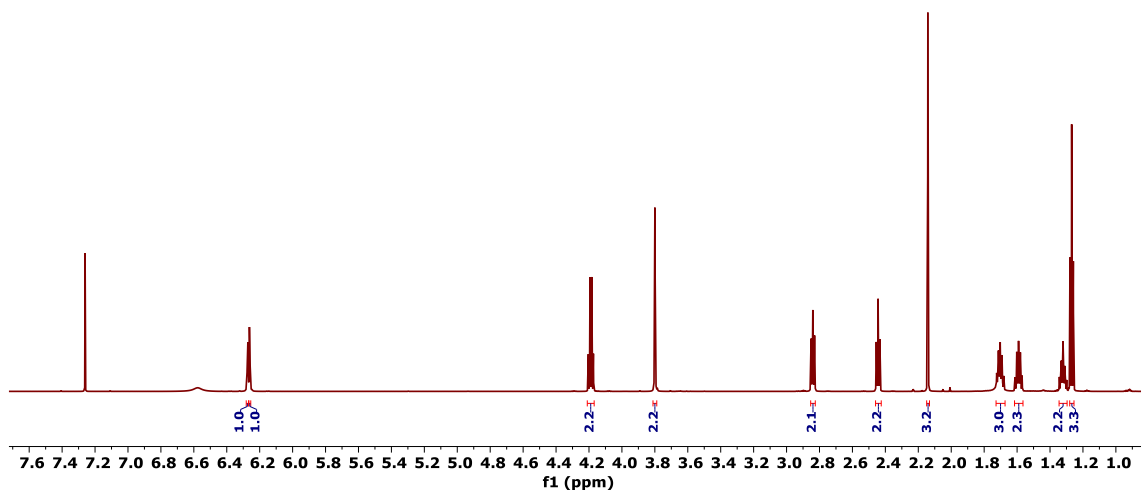


Figura S62. Espectro IR de dotiorelona A (27).

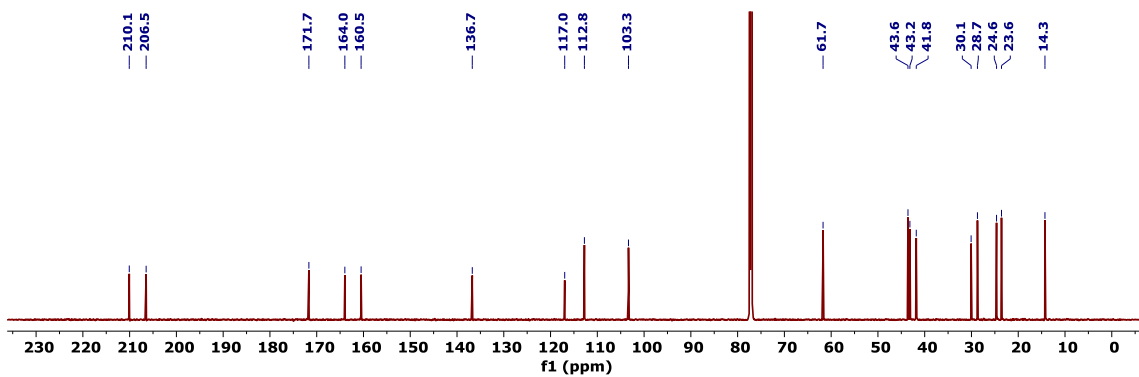
**Tabla S3.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de dotiorelona I (**28**) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	δ <sub>C</sub> ppm	tipo	δ <sub>H</sub> ppm, mult. (J en Hz)
1	171.7	C	-
2	41.8	CH <sub>2</sub>	3.78, s
3	136.7	C	-
4	112.8	CH	6.26, d (2.5)
5	160.5	C	-
6	103.3	CH	6.27, d (2.5)
7	164.0	C	-
8	117.0	C	-
9	206.5	C	-
10	43.1	CH <sub>2</sub>	2.84, t (7.3)
11	24.6	CH <sub>2</sub>	1.70, p (7.4)
12	28.7	CH <sub>2</sub>	1.32, m
13	23.6	CH <sub>2</sub>	1.59, p (7.4)
14	43.6	CH <sub>2</sub>	2.44, t (7.3)
15	210.1	C	-
16	30.1	CH <sub>3</sub>	2.14, s
17	61.7	CH <sub>2</sub>	4.18, q (7.1)
18	14.3	CH <sub>3</sub>	1.2, t (7.1)
7-OH	-	-	11.6, brs

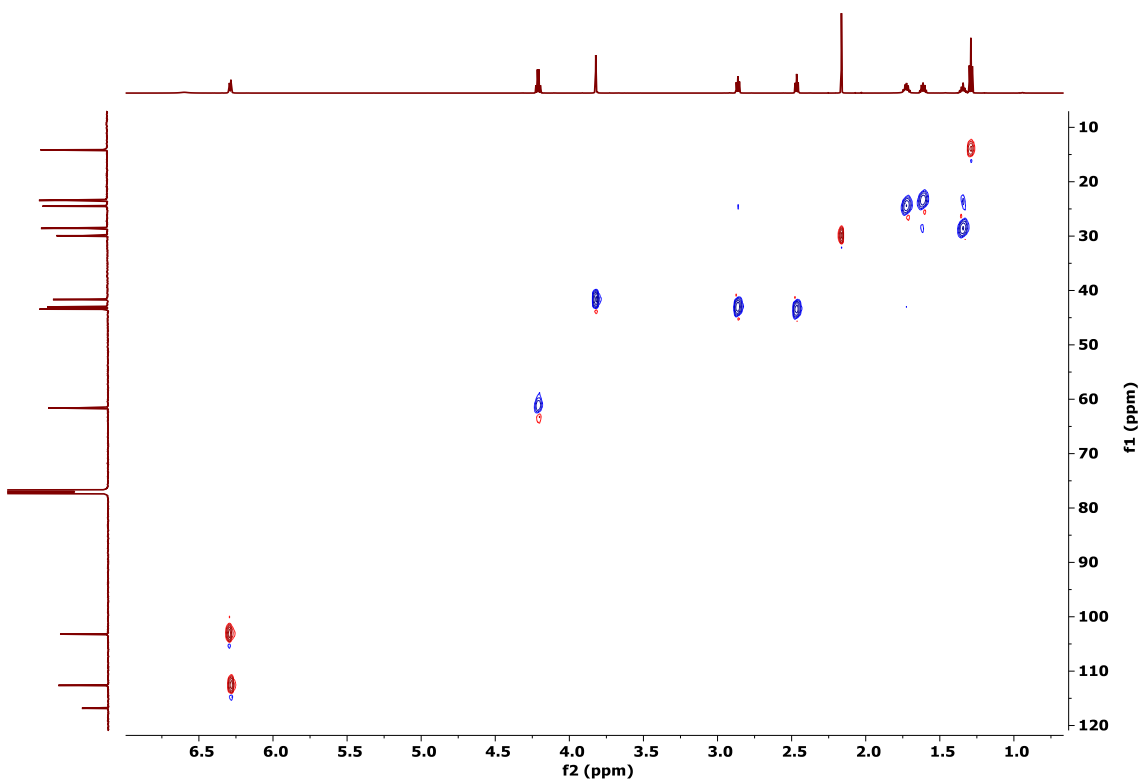




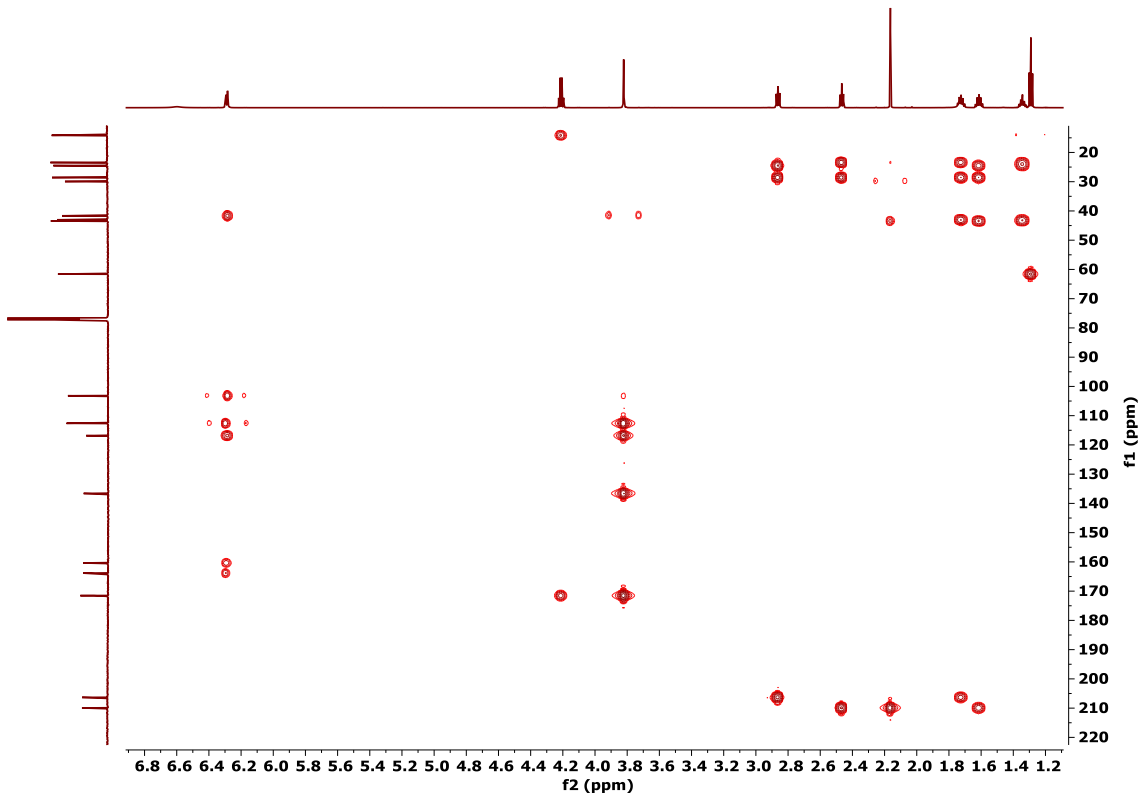
**Figura S63.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de dotiorelona I (**28**) en CDCl<sub>3</sub> a 700 MHz.



**Figura S64.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de dotiorelona I (**28**) en CDCl<sub>3</sub> a 175 MHz.



**Figura S65.** Espectro HSQC de dotiorelona I (**28**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S66.** Espectro HMBC de dotiorelona I (**28**) en  $\text{CDCl}_3$ .

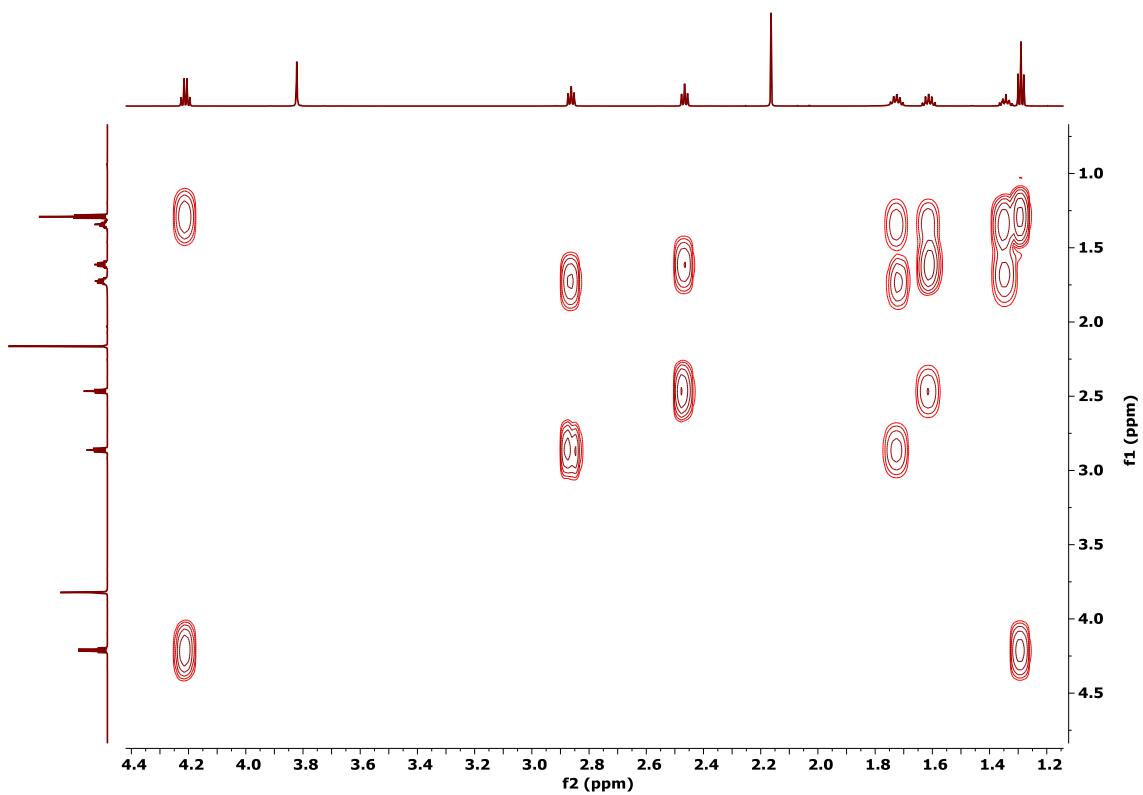


Figura S67. Espectro COSY de dotiorelona I (**28**) en  $\text{CDCl}_3$ .

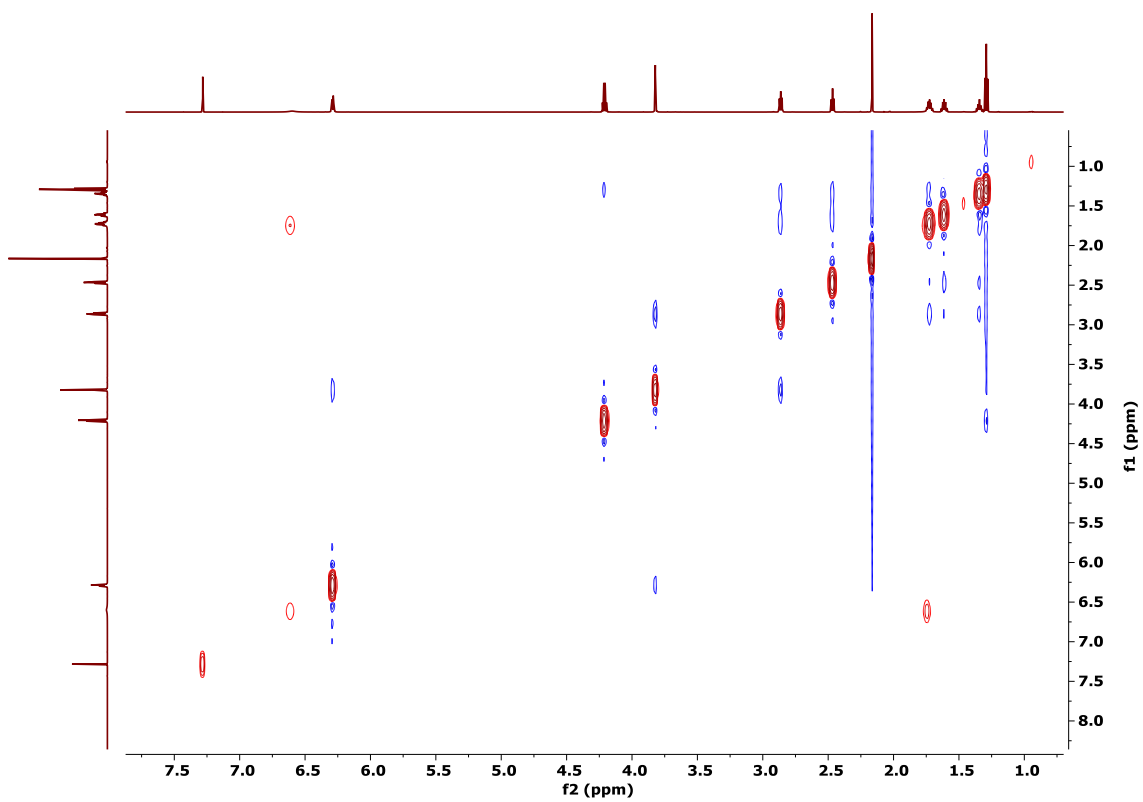


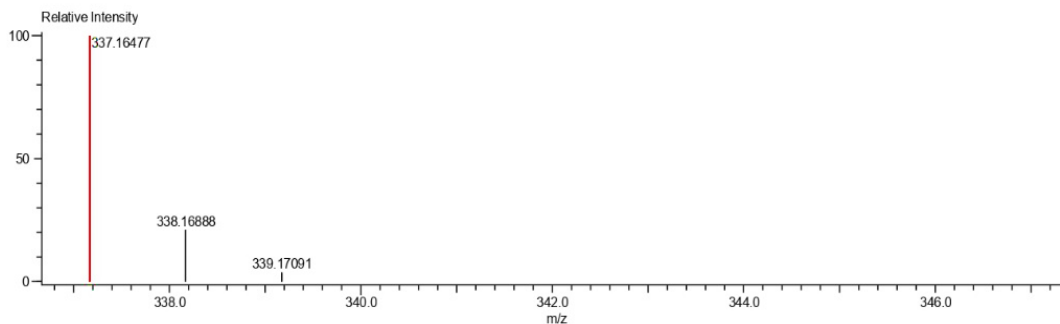
Figura S68. Espectro NOESY de dotiorelona I (**28**) en  $\text{CDCl}_3$ .



Charge number:1  
Element:<sup>12</sup>C:0.30, <sup>1</sup>H:0.50, <sup>16</sup>O:0.6

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0..24.0 (Fraction:Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
337.16477	105023.72	337.16511	-0.34	-1.02	<sup>12</sup> C <sub>18</sub> <sup>1</sup> H <sub>25</sub> <sup>16</sup> O <sub>6</sub>	6.5

Figura S69. Espectro EM-AR-DART de dotiarelona I (28).

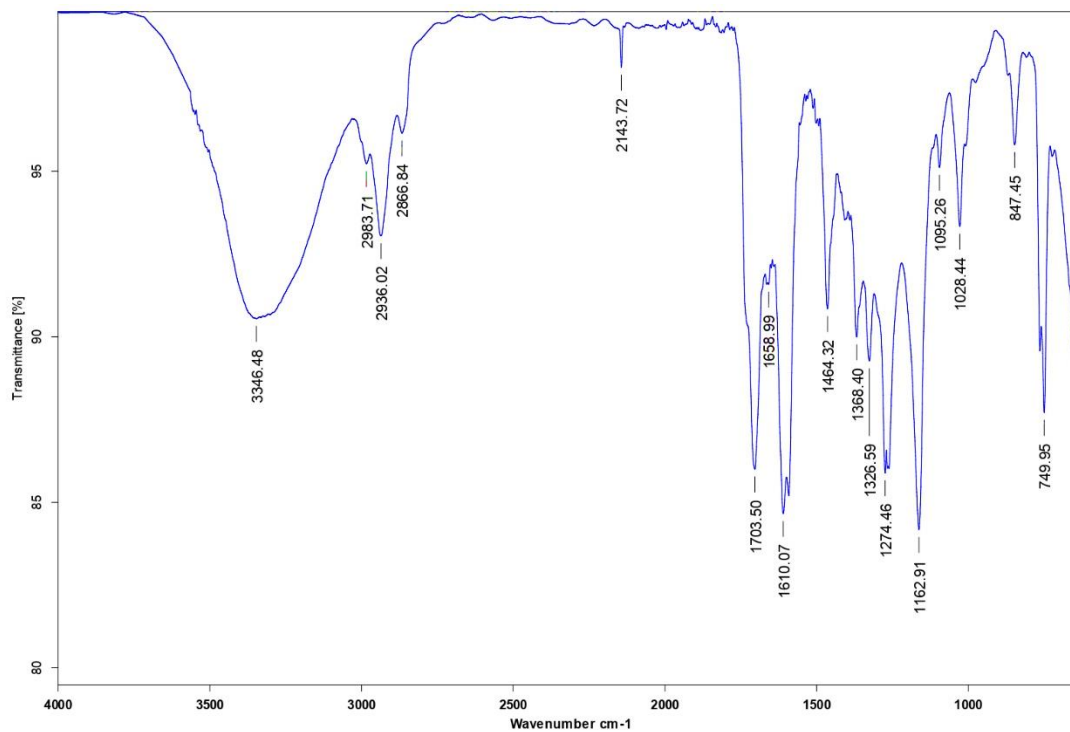
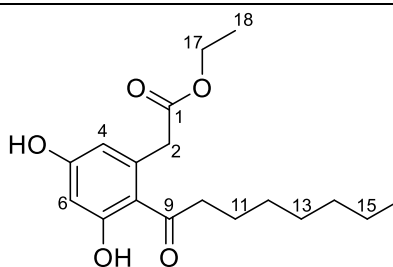


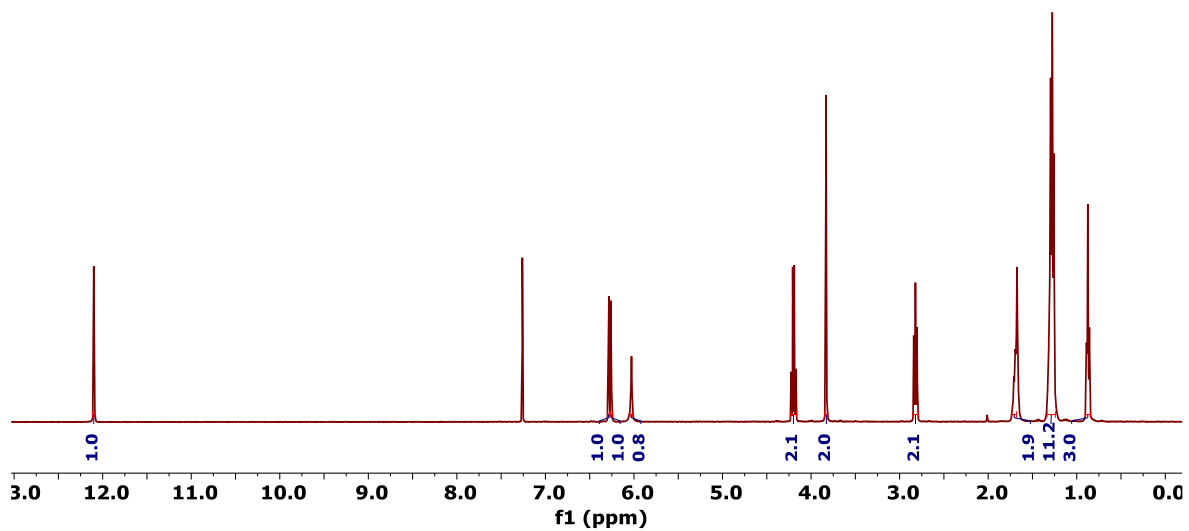
Figura S70. Espectro IR de dotiarelona I (28).

**Tabla S4.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H- (400 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) de citosporona B (**29**) en CDCl<sub>3</sub>.

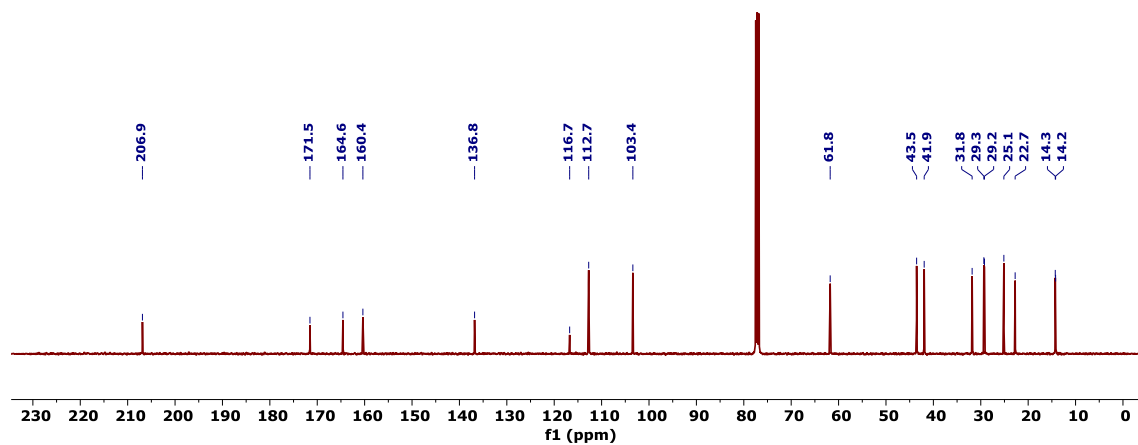
Posición	$\delta_C$ ppm	tipo	$\delta_H$ ppm, mult. (J en Hz)
1	171.5	C	-
2	41.9	CH <sub>2</sub>	3.83, s
3	136.8	C	-
4	112.7	CH	6.25, d (2.3)
5	160.4	C	-
6	103.4	CH	6.28, d (2.7)
7	164.6	C	-
8	116.7	C	-
9	206.9	C	-
10	43.5	CH <sub>2</sub>	2.82, t (7.4)
11	25.1	CH <sub>2</sub>	1.73, m
12	29.3	CH <sub>2</sub>	1.31, m
13	29.2	CH <sub>2</sub>	1.31, m
14	31.8	CH <sub>2</sub>	2.27, m
15	22.7	CH <sub>2</sub>	1.29, m
16	14.3	CH <sub>3</sub>	0.87, brt (6.8)
17	61.8	CH <sub>2</sub>	4.19, q (7.1)
18	14.2	CH <sub>3</sub>	1.27, t (7.1)
5-OH	-	-	6.02, s
7-OH	-	-	12.10, s



**29**



**Figura S71.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de citosporona B (**29**) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



**Figura S72.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de citosporona B (**29**) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

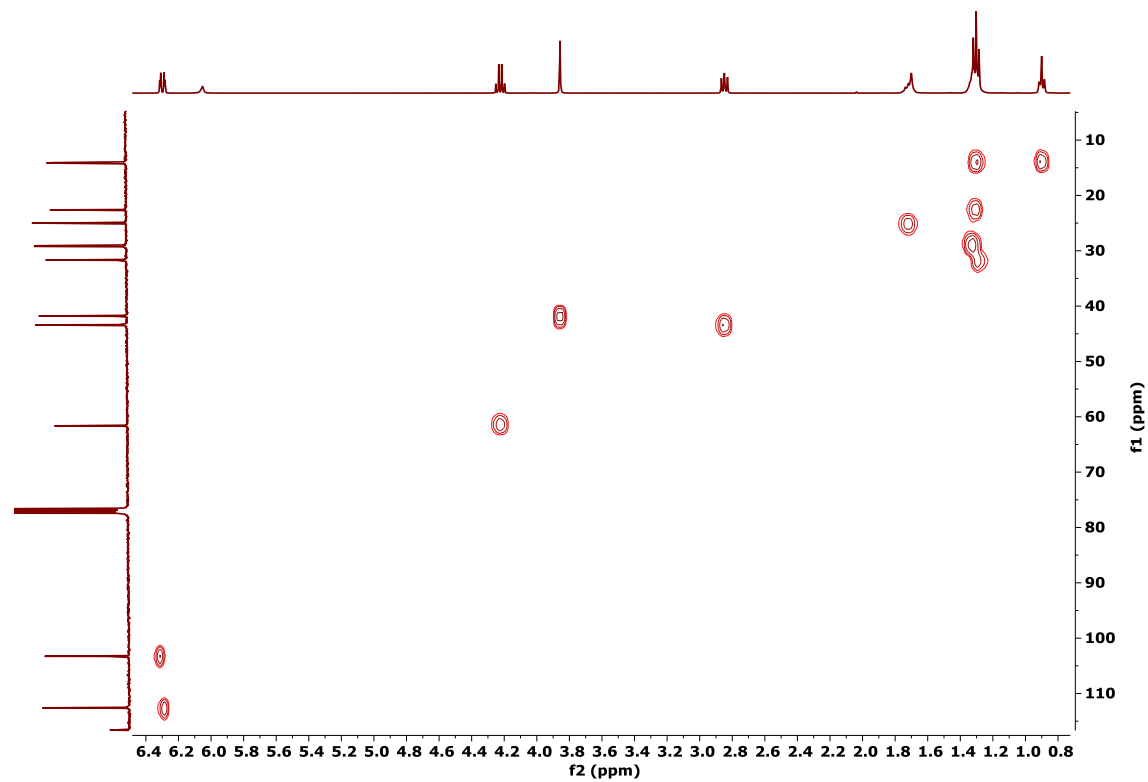


Figura S73. Espectro de HSQC de citosporona B (**29**) en  $\text{CDCl}_3$ .

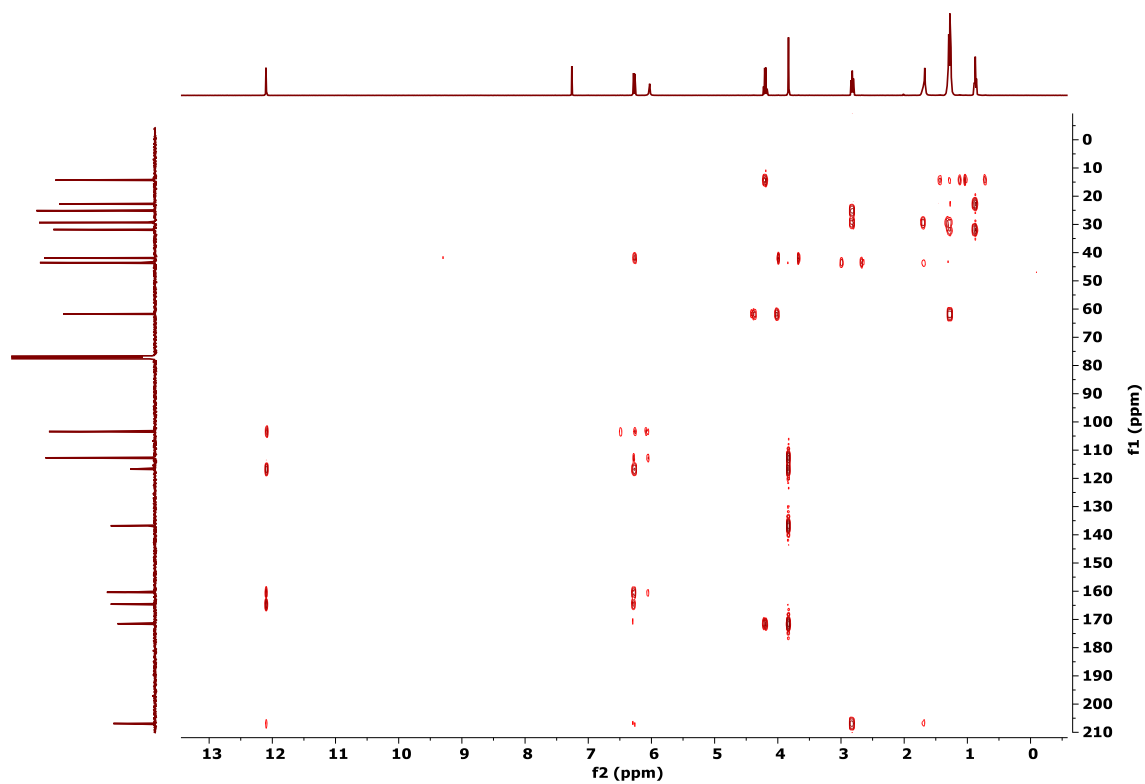


Figura S74. Espectro de HMBC de citosporona B (**29**) en  $\text{CDCl}_3$ .

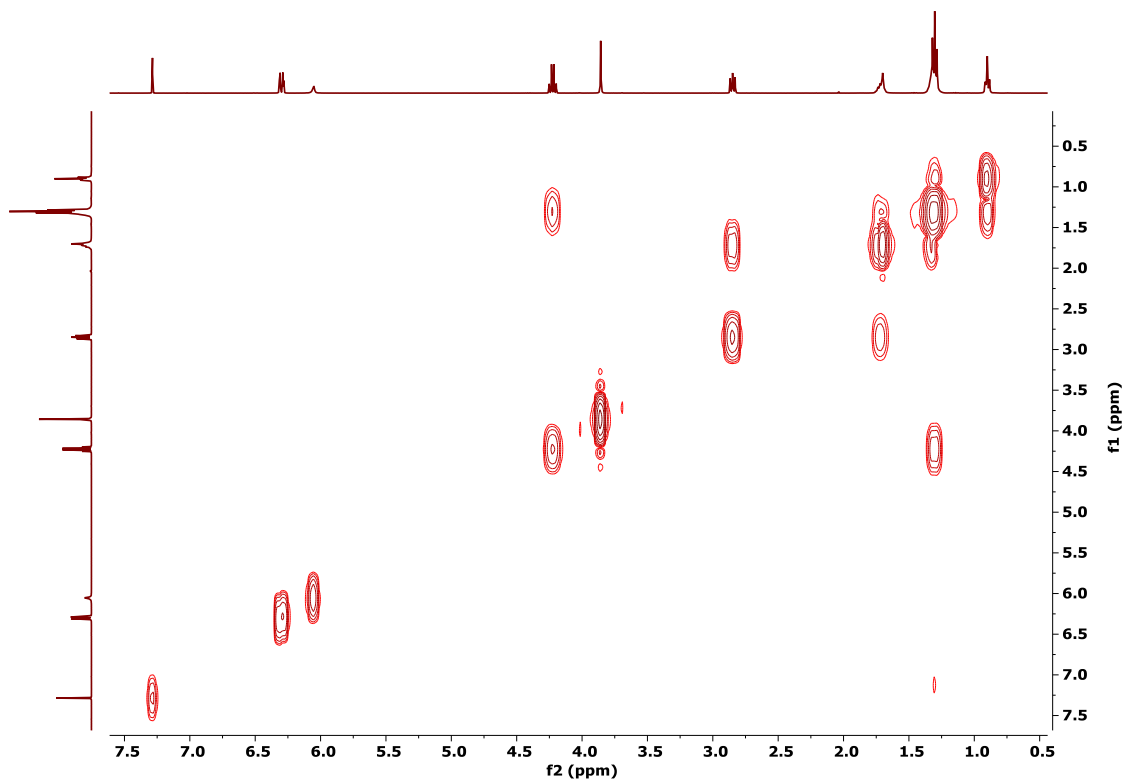


Figura S75. Espectro de COSY de citosporona B (**29**) en  $\text{CDCl}_3$ .

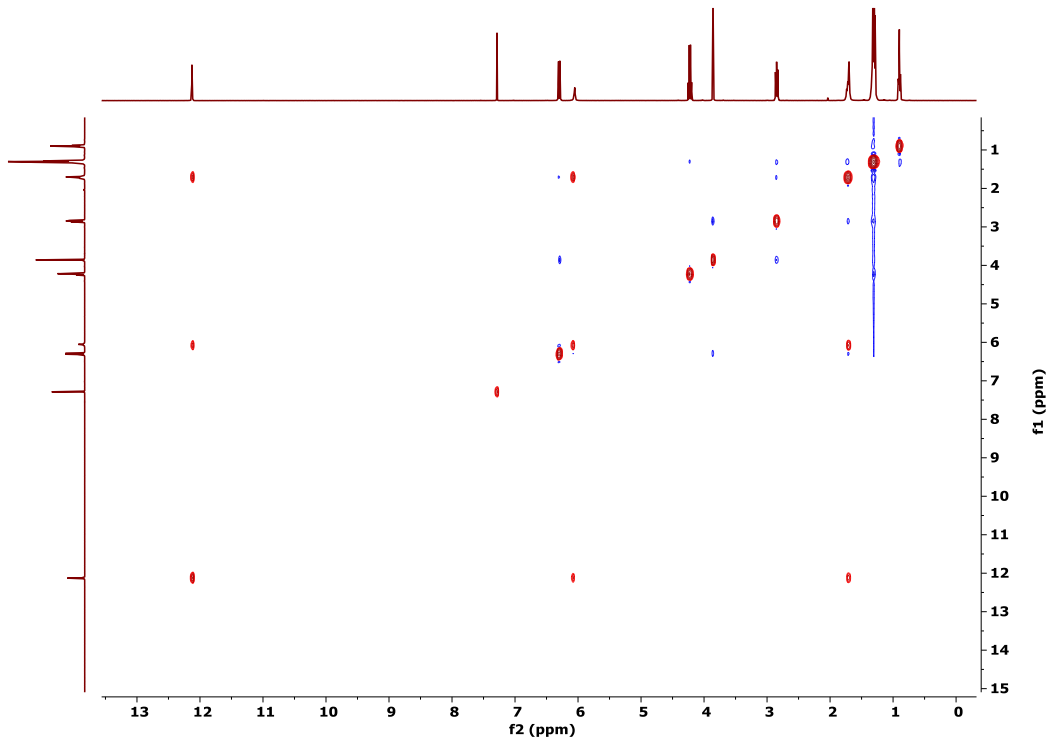
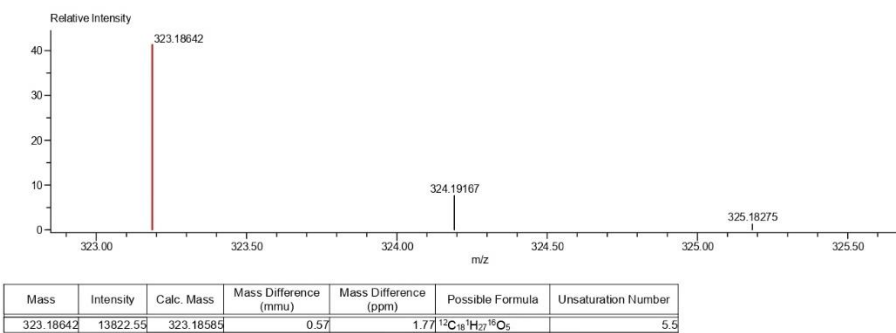
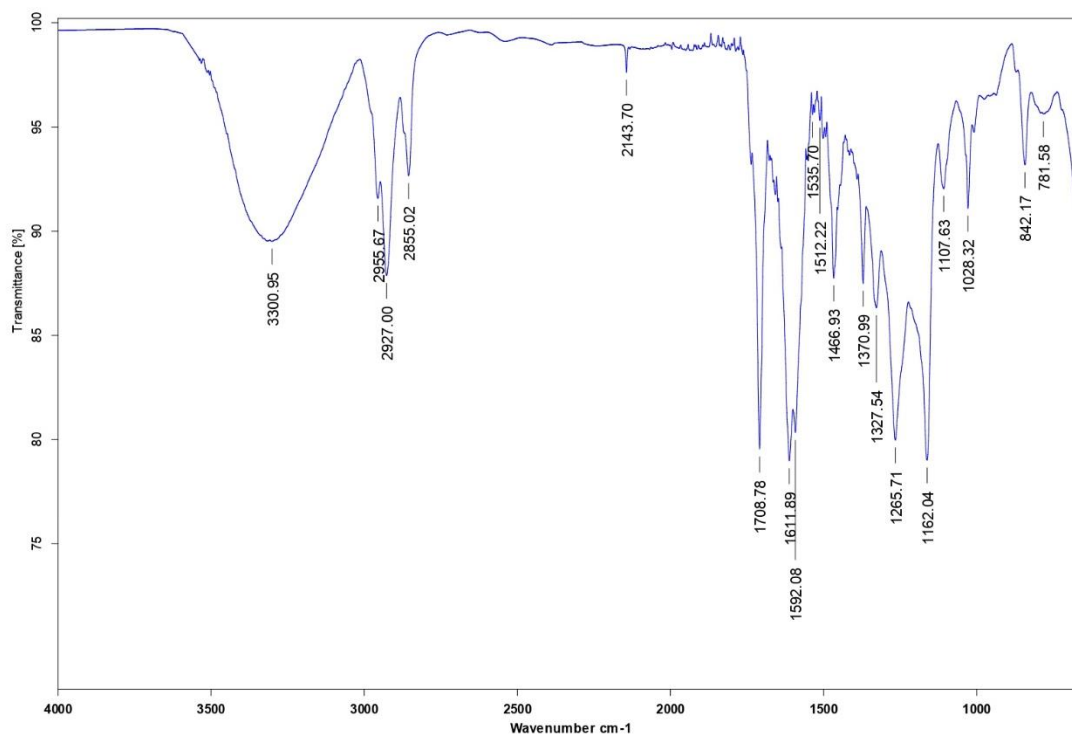


Figura S76. Espectro de NOESY de citosporona B (**29**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Charge number: 1  
Element:  $^{12}\text{C}$ : 0 .. 27,  $^1\text{H}$ : 0 .. 50,  $^{16}\text{O}$ : 2 .. 5  
Tolerance: 1.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu)  
Unsaturation Number: 0.0 .. 16.0 (Fraction: Both)



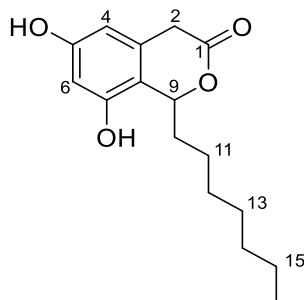
**Figura S77.** Espectro EM-AR-DART de citosporona B (29).



**Figura S78.** Espectro IR de citosporona B (29).

**Tabla S5.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de citosporona C (**30**) en acetona-d<sub>6</sub>.

Posición	δ <sub>C</sub> ppm	tipo	δ <sub>H</sub> ppm, mult. (J en Hz)
1	170.6	C	-
2	35.5	CH <sub>2</sub>	3.79, dd (19.2, 0.9) 3.46, d (19.3)
3	133.7	C	-
4	106.4	CH <sub>2</sub>	6.24, m (br)
5	159.2	C	-
6	102.0	CH	6.35, dd (2.3, 0.9)
7	154.6	C	-
8	114.2	C	-
9	78.5	CH	5.56, dd (8.9, 5.0)
10	36.6	CH <sub>2</sub>	1.88, m 1.79, m
11	26.5	CH <sub>2</sub>	1.55, m 1.42, m
12	29.8	CH <sub>2</sub>	1.30, m, superpuesto
13	29.8	CH <sub>2</sub>	1.30, m, superpuesto
14	23.4	CH <sub>2</sub>	1.29, m
15	32.7	CH <sub>2</sub>	1.28, m
16	14.4	CH <sub>3</sub>	0.87, t (7.0)



**30**





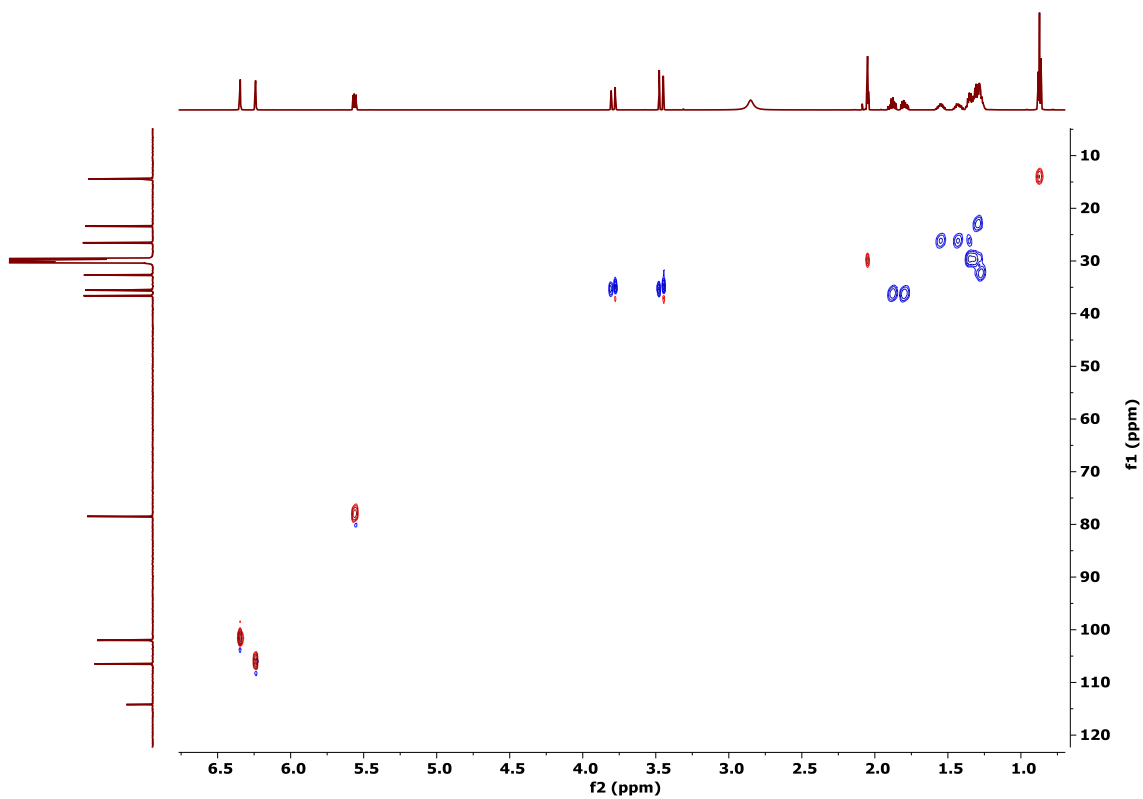


Figura S89. Espectro de HSQC de citosporona C (30) en acetona- $d_6$ .

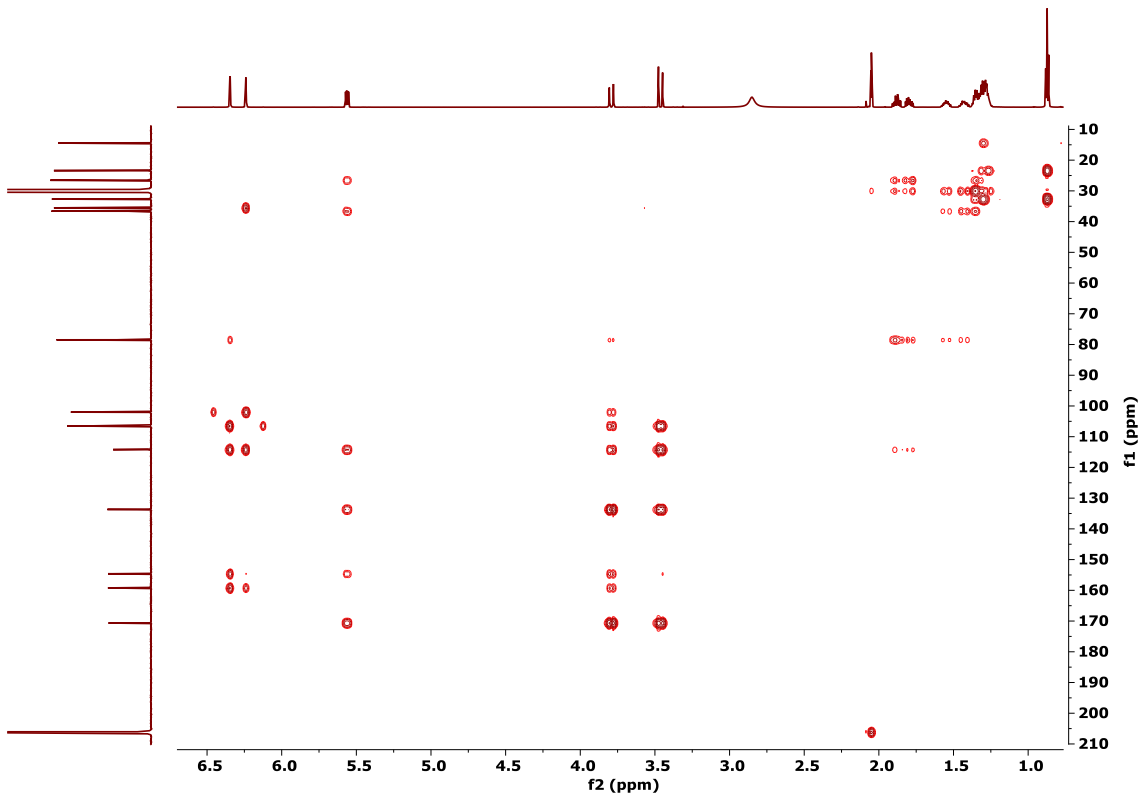


Figura S90. Espectro de HMBC de citosporona C (30) en acetona- $d_6$ .

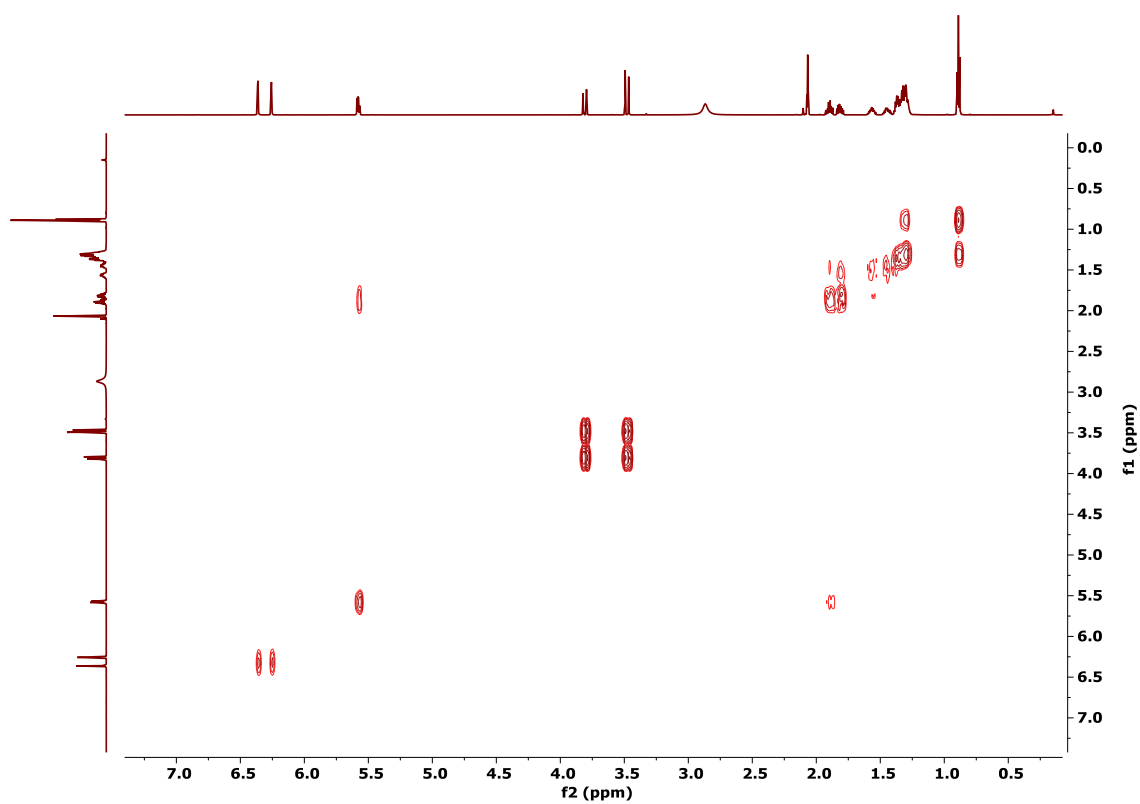


Figura S91. Espectro de COSY de citosporona C (**30**) en acetona- $d_6$ .

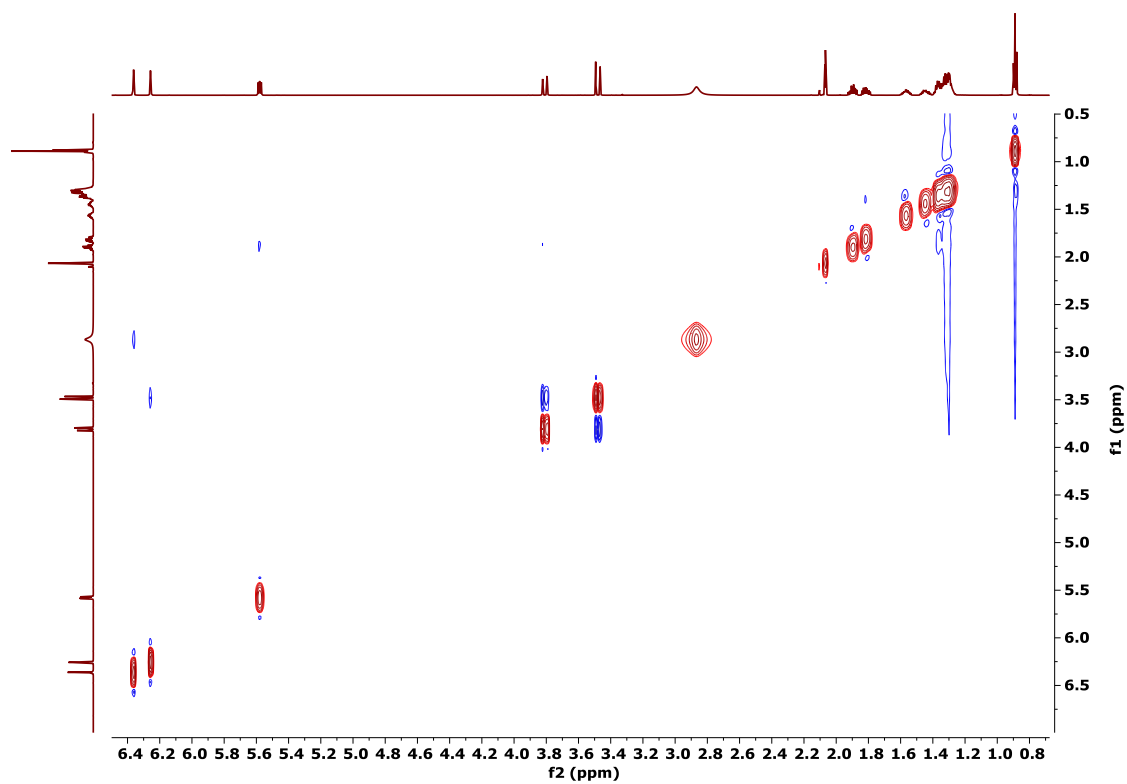
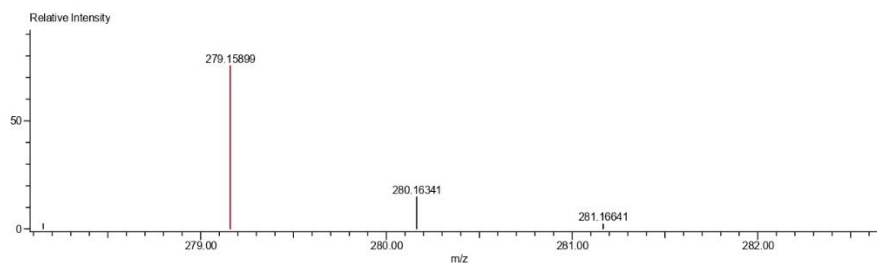


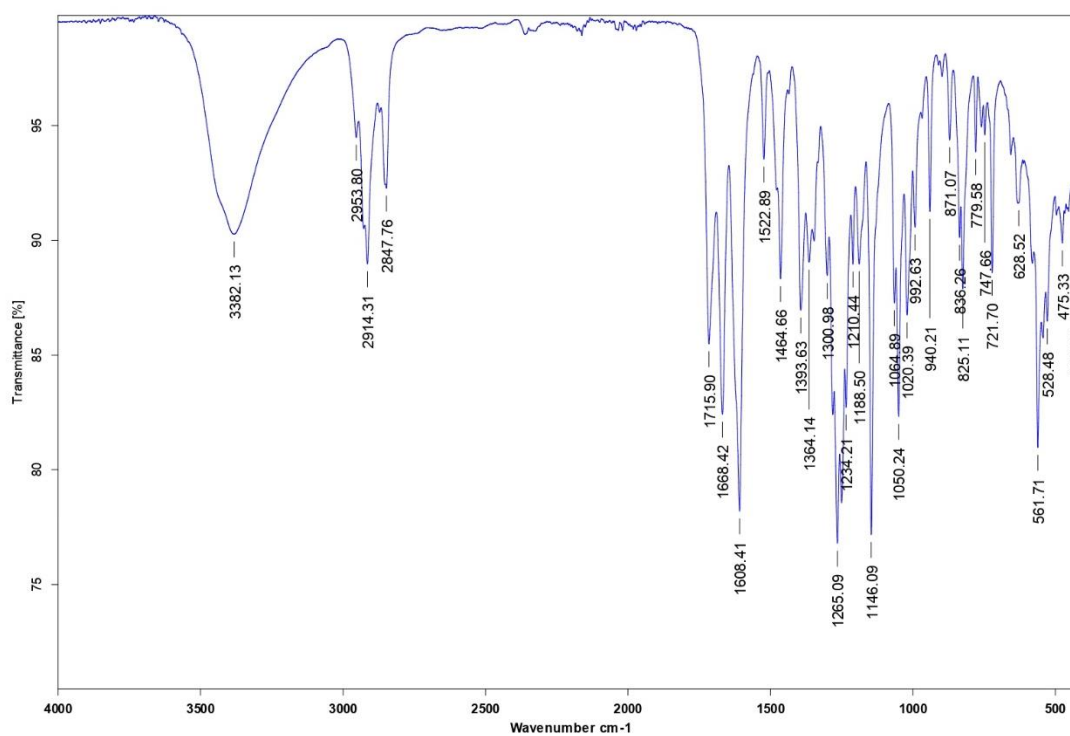
Figura S92. Espectro de NOESY de citosporona C (**30**) en acetona- $d_6$ .

Charge number:1 Tolerance:100.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturacion Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 27, <sup>1</sup>H:0 .. 50, <sup>16</sup>O:2 .. 5



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
279.15899	32721.78	279.15963	-0.64	-2.30	<sup>12</sup> C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> <sup>16</sup> O <sub>4</sub>	5.5

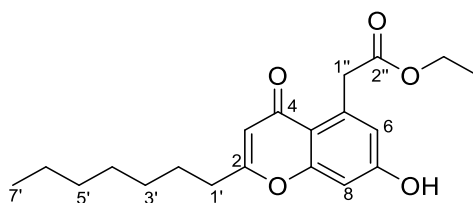
**Figura S93.** Espectro EM-AR-DART de citosporona C (30).



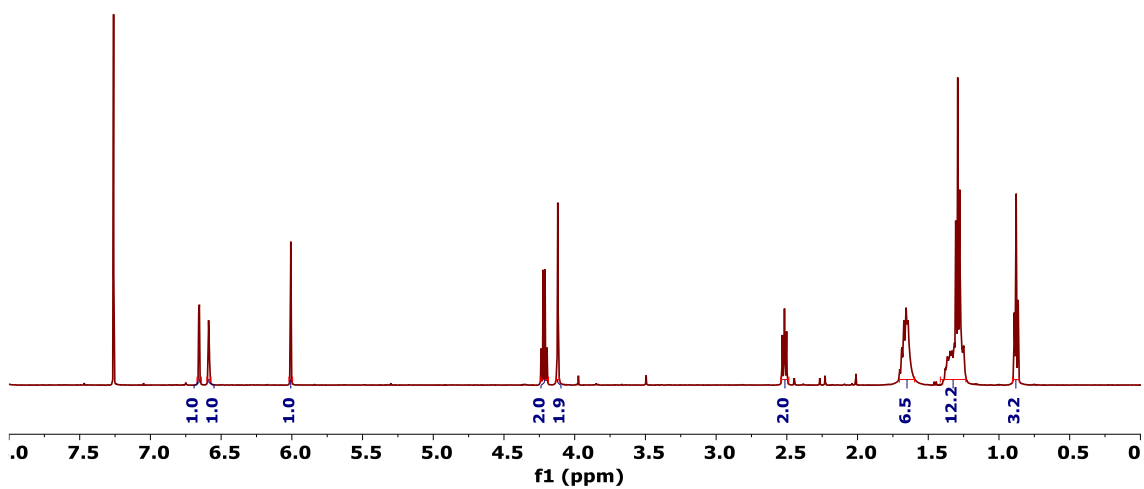
**Figura S94.** Espectro IR de citosporona C (30).

**Tabla S6.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de pestalotiopsona B (**31**) en CDCl<sub>3</sub>.

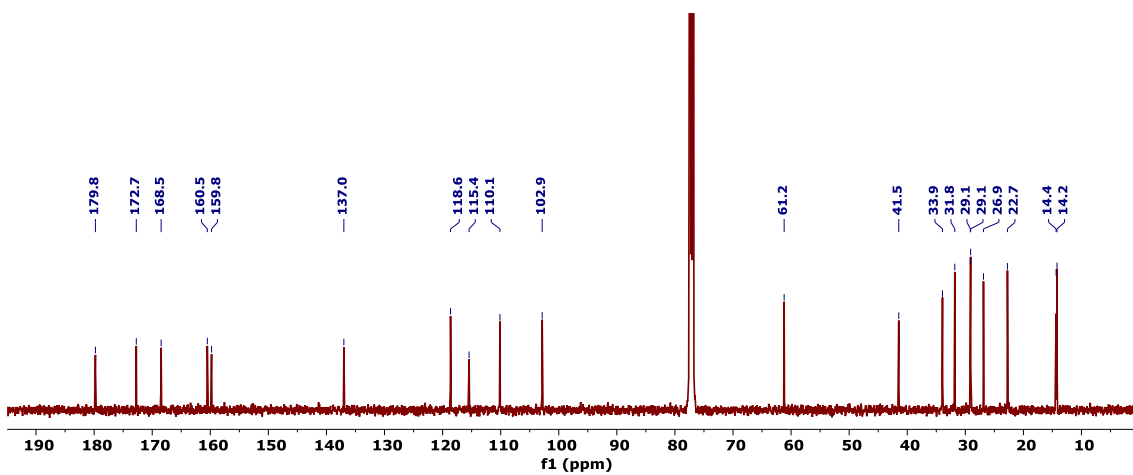
Posición	$\delta_C$ ppm	tipo	$\delta_H$ ppm, mult. (J en Hz)
2	168.5	C	-
3	110.1	CH <sub>2</sub>	6.00, s
4	179.8	C	-
5	137.0	C	-
6	118.6	CH	6.58, d (2.4)
7	160.5	C	-
8	102.9	C	6.65, d (2.4)
9	115.4	C	-
10	159.8	C	-
1'	33.9	CH <sub>2</sub>	2.50, t (7.6)
2'	26.9	CH <sub>2</sub>	1.70, m
3'	29.1	CH <sub>2</sub>	1.40, m
4'	29.1	CH <sub>2</sub>	1.40, m
5'	31.8	CH <sub>2</sub>	1.30, m
6'	22.7	CH <sub>2</sub>	1.30, m
7'	14.2	CH <sub>3</sub>	0.87, brt (6.9)
1''	41.5	CH <sub>2</sub>	4.10, s
2''	172.7	C	-
2''- OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	61.2	CH <sub>2</sub>	4.20, q (7.1)
2''- OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	14.4	CH <sub>3</sub>	1.29, t (7.1)



**31**



**Figura S95.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de pestalotiopsona B (**31**) en CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz.



**Figura S96.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de pestalotiopsona B (**31**) en CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz.

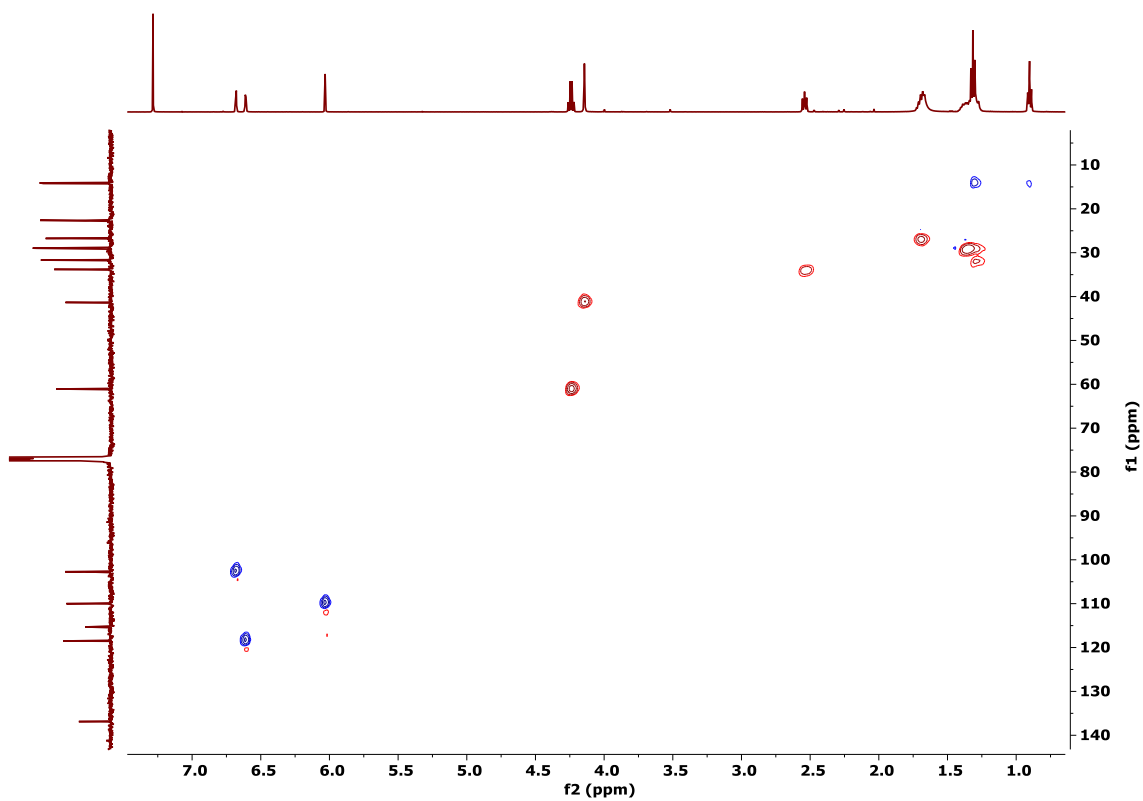


Figura S97. Espectro de HSQC de pestalotiopsona B (**31**) en  $\text{CDCl}_3$ .

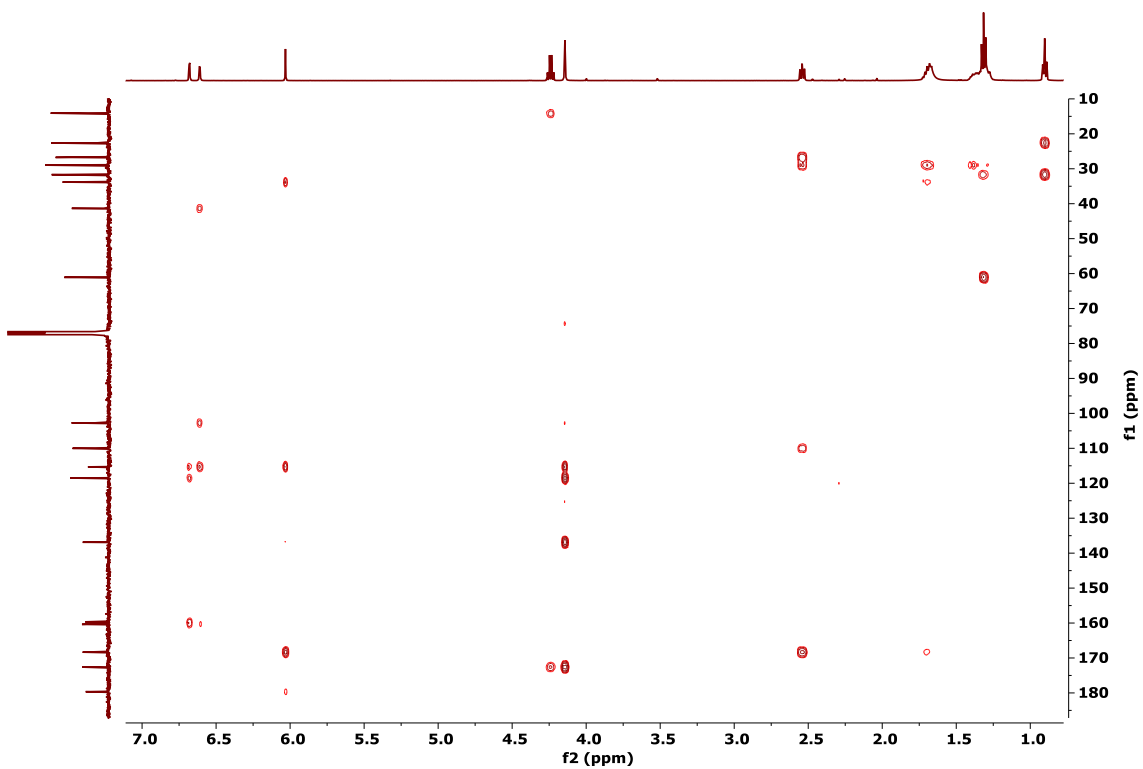


Figura S98. Espectro de HMBC de pestalotiopsona B (**31**) en  $\text{CDCl}_3$ .

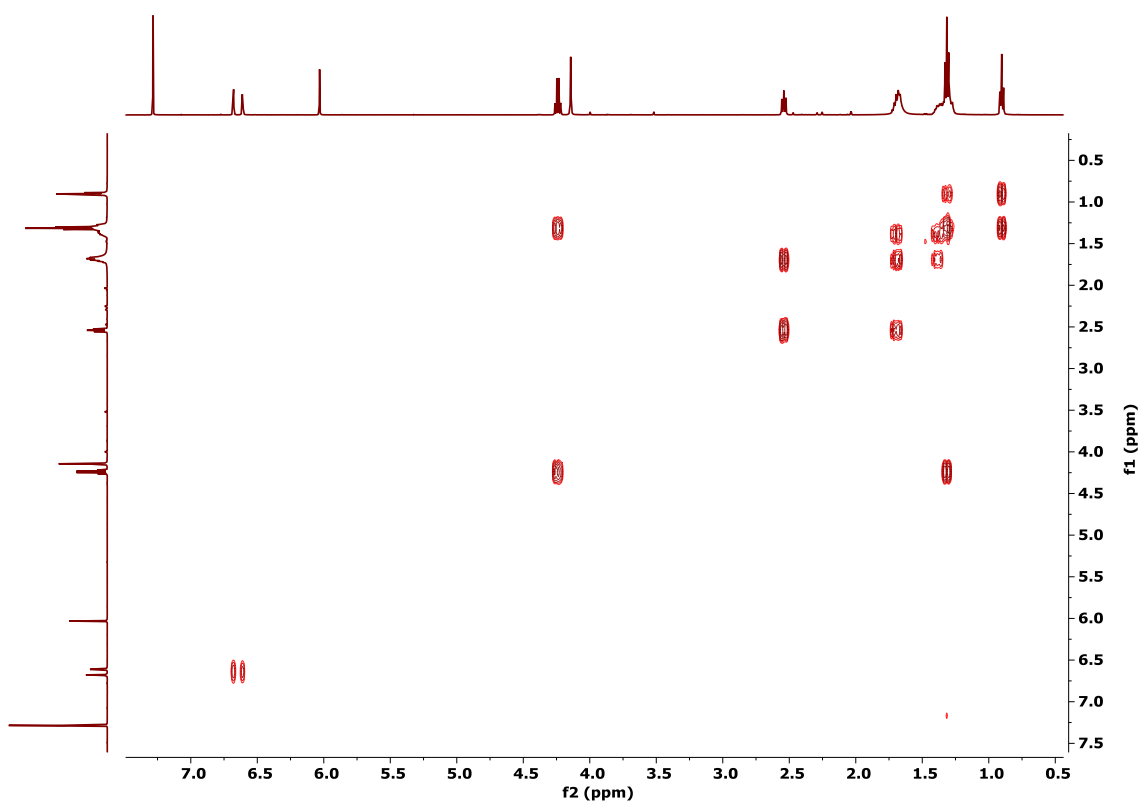


Figura S99. Espectro de COSY de pestalotiopsona B (**31**) en CDCl<sub>3</sub>.

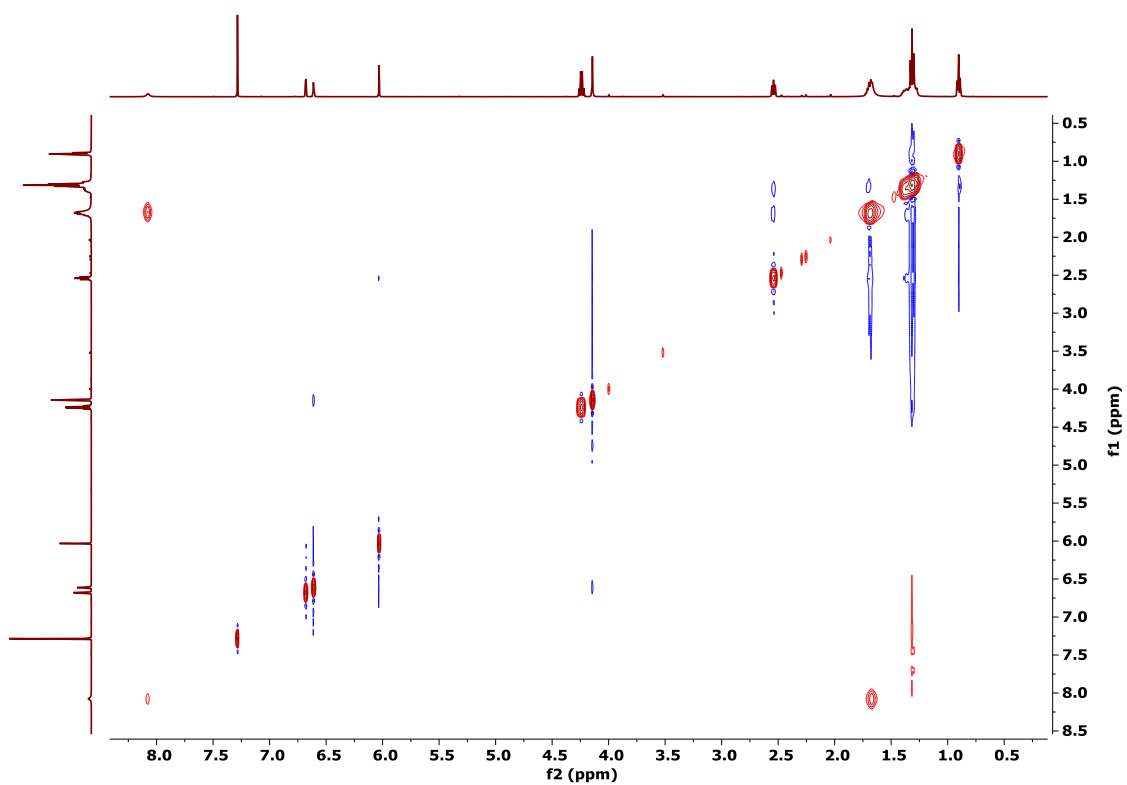
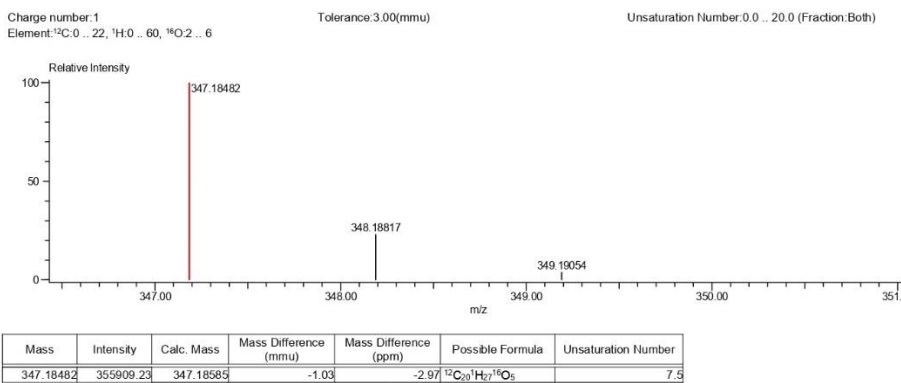
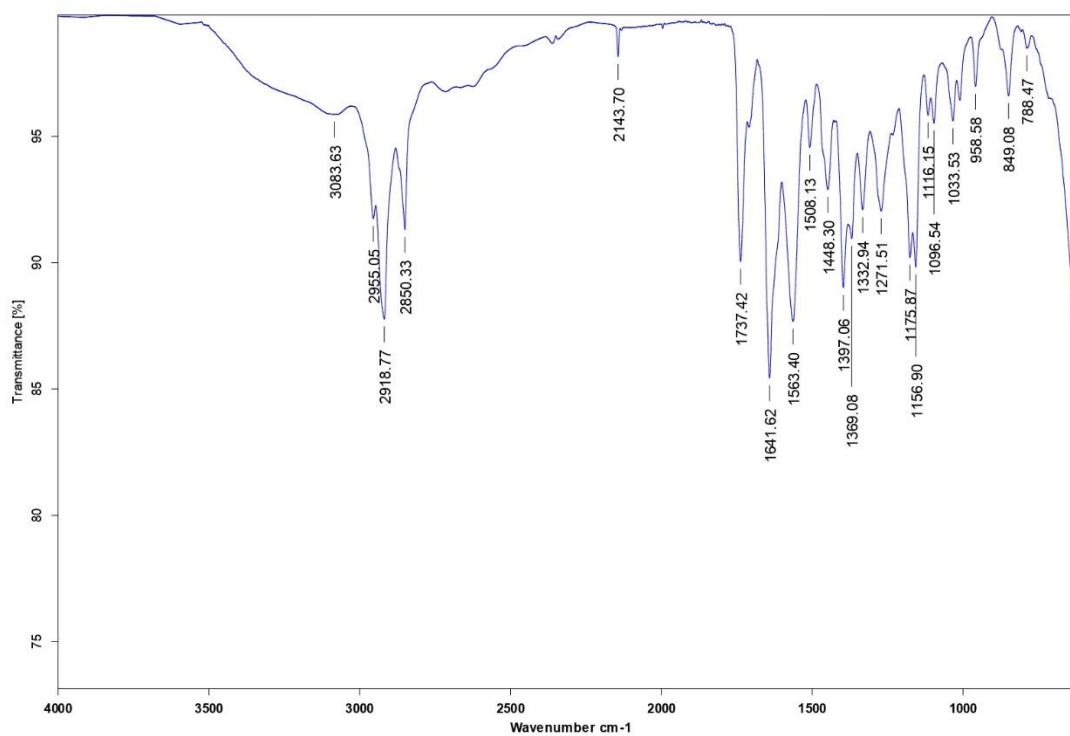


Figura S100. Espectro de NOESY de pestalotiopsona B (**31**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura S101.** Espectro EM-AR-DART de pestalotiopsina B (**31**).

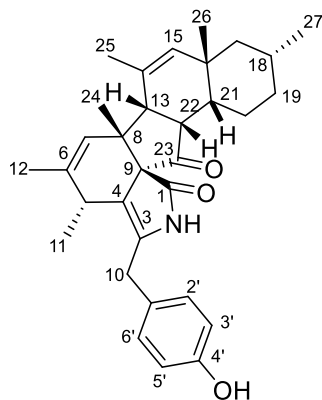


**Figura S102.** Espectro IR de pestalotiopsina B (**31**).



**Tabla S7.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) de diaportalasina (**32**) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	δ <sub>C</sub> ppm	Tipo	δ <sub>H</sub> ppm, mult. (J en Hz)
1	176.8	C	-
2	-	-	-
3	134.3	C	-
4	118.2	C	-
5	32.7	CH	2.95, q (7.1)
6	136.7	C	-
7	127.8	CH	5.27, s
8	48.2	C	-
9	71.5	C	-
10	30.9	CH <sub>2</sub>	3.63, s
11	19.9	CH <sub>3</sub>	1.07, d (7.3)
12	21.6	CH <sub>3</sub>	-
13	49.1	CH	3.27, d (8.5)
14	128.2	C	-
15	139.0	CH	5.40, s
16	36.3	C	-
17	48.4	CH <sub>2</sub>	1.47, dd (12.5, 2.5) 0.77, t (12.5)
18	27.4	CH	1.62, m
19	36.08	CH <sub>2</sub>	1.76, superpuesto 0.64, qd (12.5, 4.2)
20	23.7	CH <sub>2</sub>	1.62, m 1.20, m
21	42.2	CH	1.50, td (12.6, 2.7)
22	49.6	CH	2.48, dd (12.9, 8.5)
23	215.4	C	-
24	24.8	CH <sub>3</sub>	1.22, s
25	24.5	CH <sub>3</sub>	1.86, s
26	19.8	CH <sub>3</sub>	0.82, s
27	22.8	CH <sub>3</sub>	0.83, d (6.6)
1'	128.2	C	-
2', 6'	129.8	CH	7.08, d (8.5)
3', 5'	116.0	CH	6.76, d (8.5)
4'	155.0	C	-



**32**

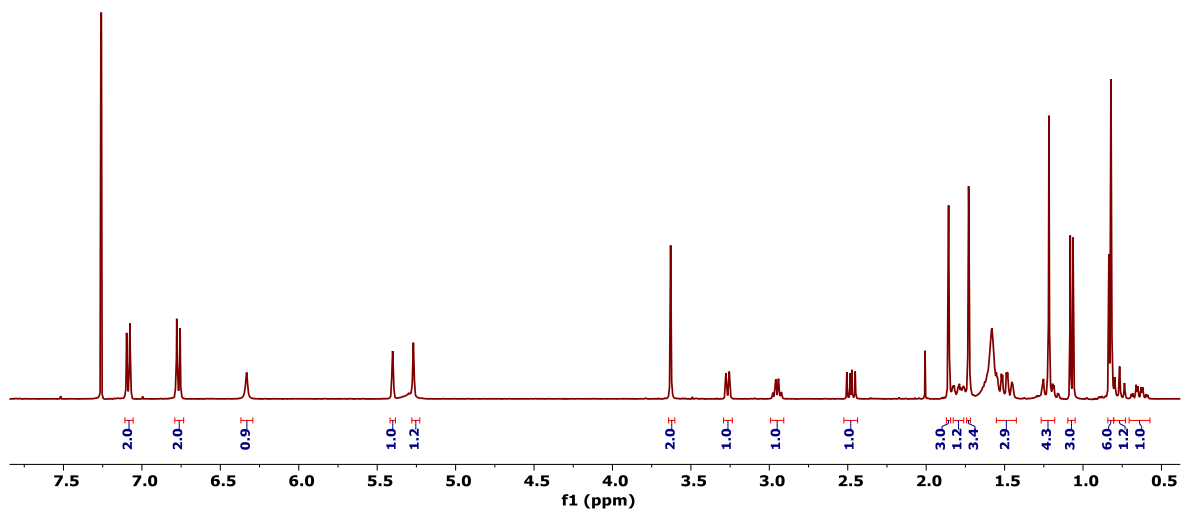


Figura S103. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de diaportalasina (32) en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

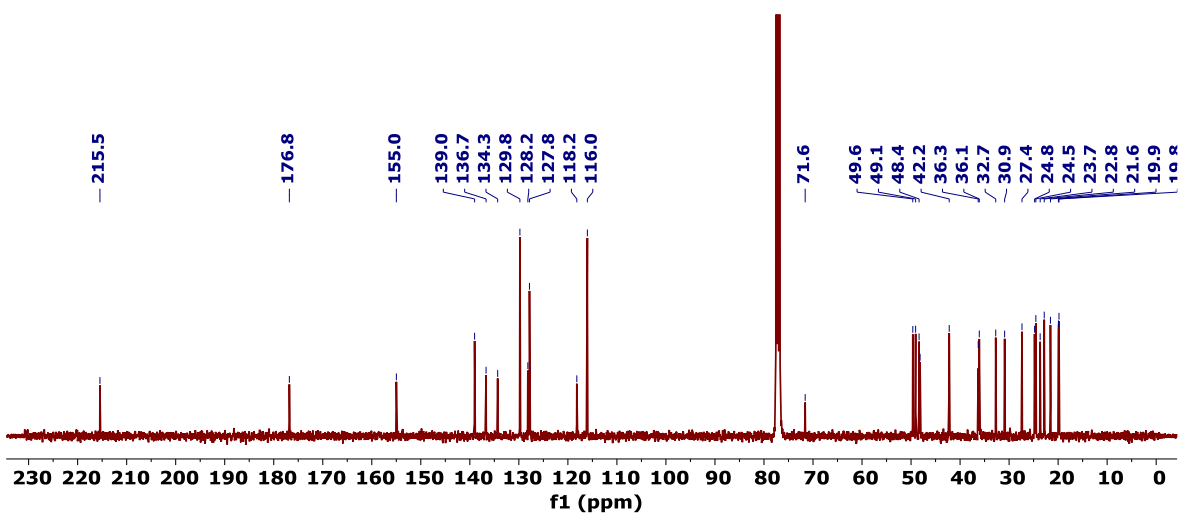


Figura S104. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de diaportalasina (32) en CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

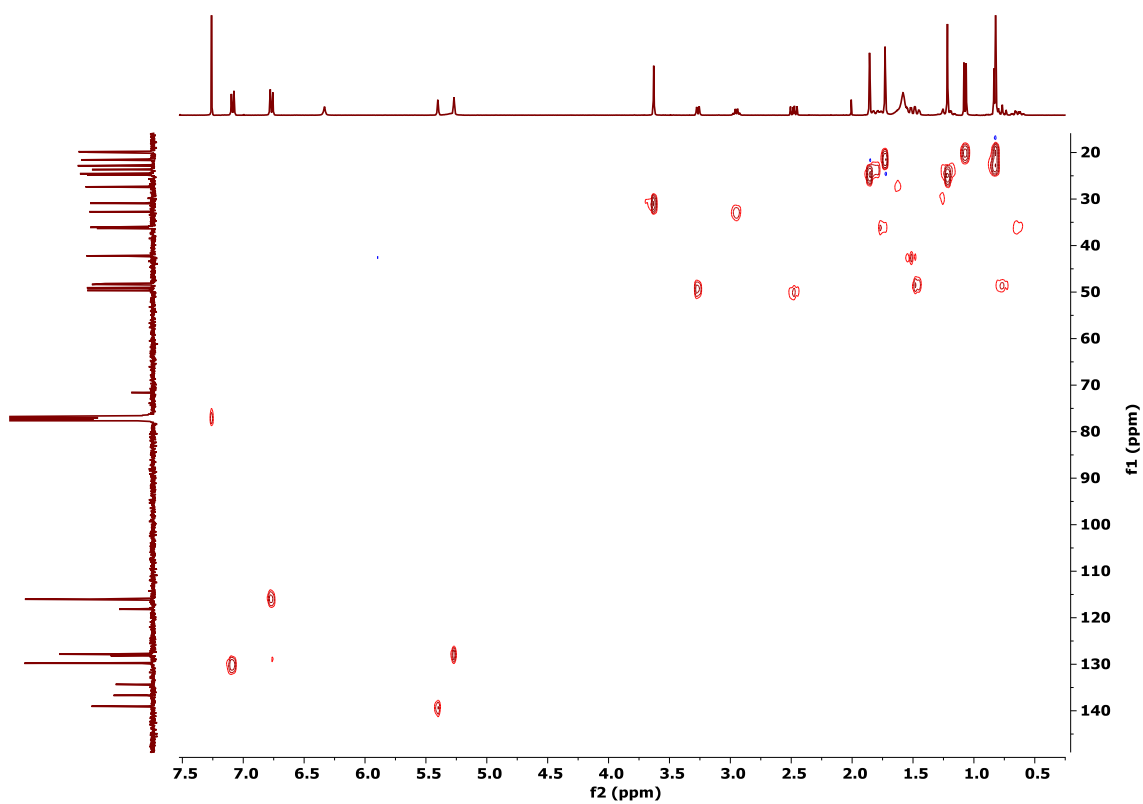


Figura S105. Espectro de HSQC de diaportalasina (**32**) en  $\text{CDCl}_3$ .

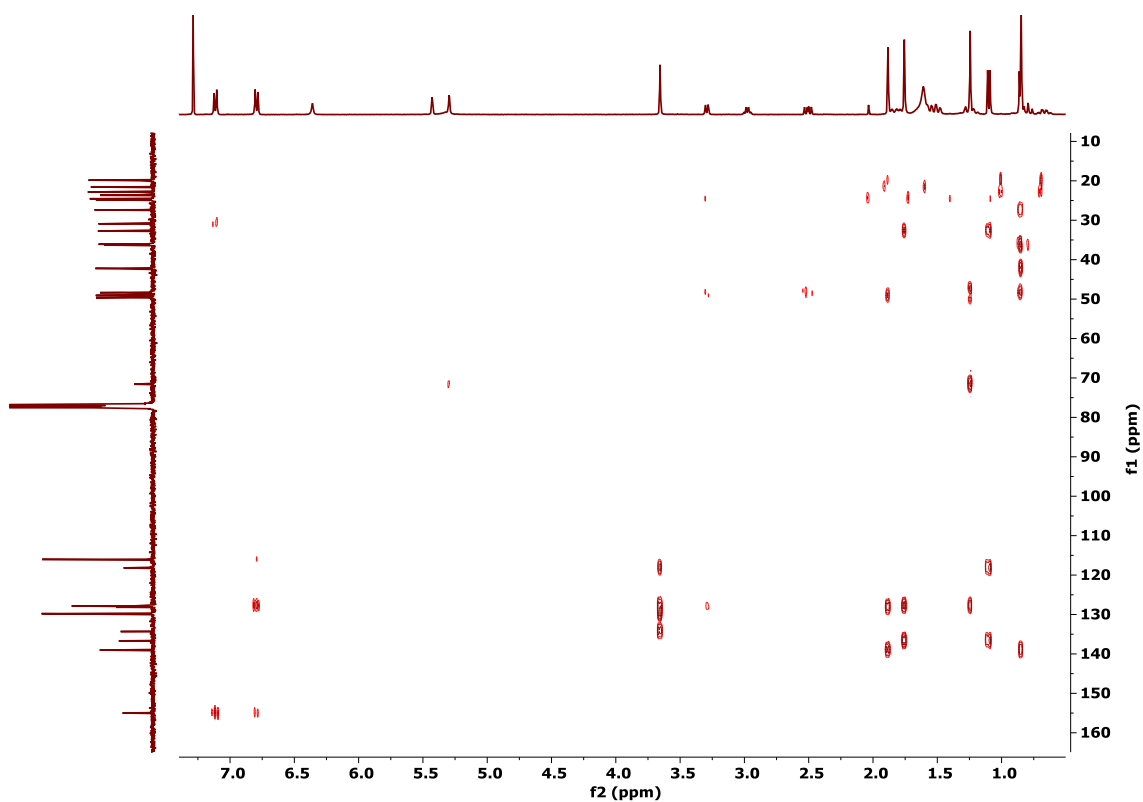


Figura S106. Espectro de HMBC de diaportalasina (**32**) en  $\text{CDCl}_3$ .

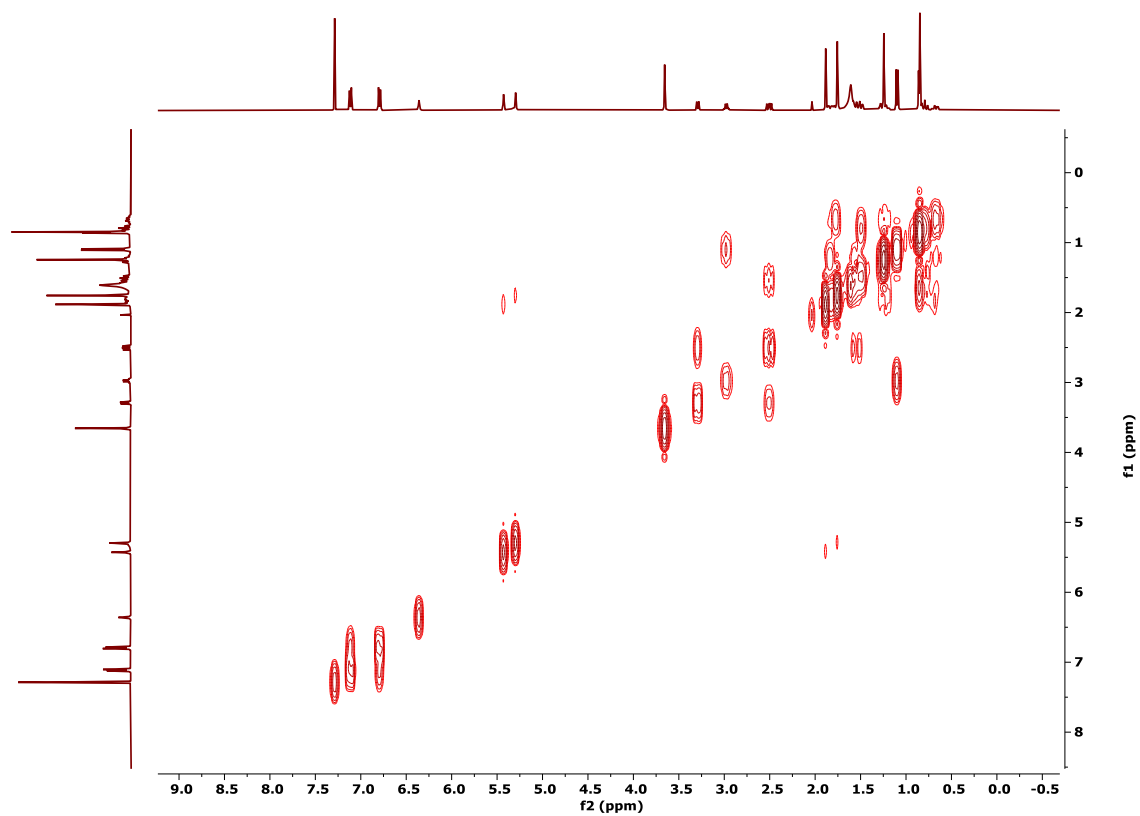
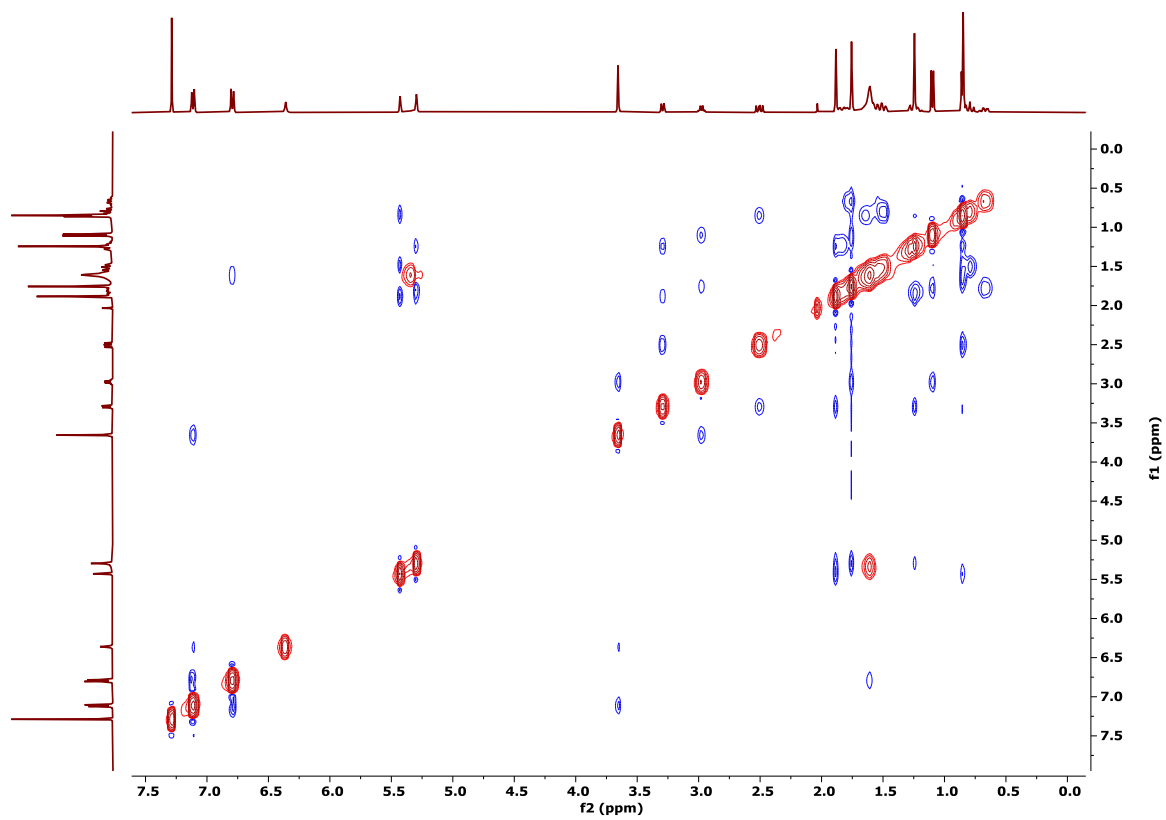
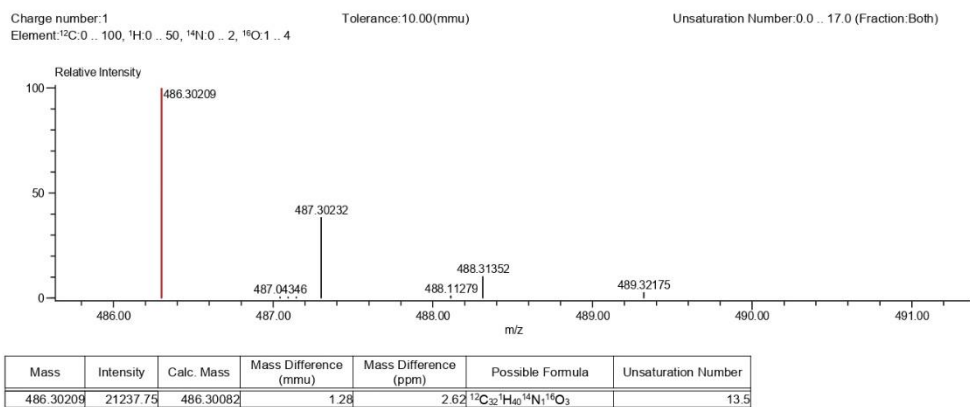


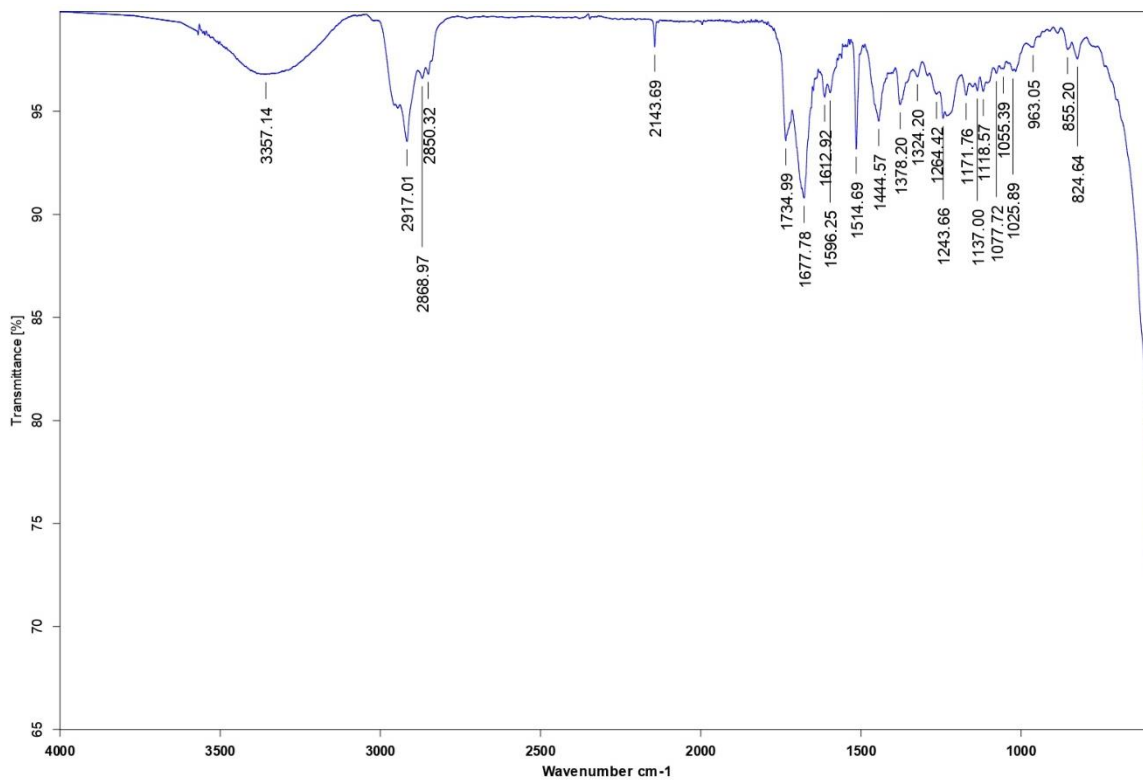
Figura S107. Espectro de COSY de diaportalasina (32) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura S108.** Espectro de NOESY de diaportalasina (**32**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura S109.** Espectro EM-AR-DART de Diaportalasina (**32**).



**Figura S110.** Espectro IR de diaportalasina (**32**).

**I0 PUBLICACIÓN EN REVISIÓN**

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

**Taxonomic and chemical diversity of Mexican mangrove-associated ascomycetes to discover new or repositioning bioactive natural products**

Journal:	<i>Journal of Natural Products</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Martínez-Aldino, Ingrid ; Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Natural Products Rivera-Chávez, José; Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Natural Products Morales-Jiménez, Jesús ; Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, El Hombre y su Ambiente

SCHOLARONE™  
Manuscripts