



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO MULTI-INFORMATIVO DE ASCOMICETOS DE MANGLARES PARA LA OBTENCIÓN DE
INHIBIDORES DE *h*PTP1B (1-400)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ÁNGELES GUADALUPE ZAVALA SIERRA

TUTOR

DR. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ



CIUDAD DE MÉXICO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
VOCAL	DR. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ
SECRETARIO	DRA. LAURA CECILIA FLORES BOCANEGRA
SUPLENTE 1	DRA. SILVIA GRACIELA DÁVILA MANZANILLA
SUPLENTE 2	DR. GENARO JIMÉNEZ REYES

Lugar en dónde se realizó el trabajo de tesis:

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



Dr. José Alberto Rivera Chávez
Tutor



Dr. Carlos Antonio Fajardo Hernández
Supervisor técnico



Ángeles Guadalupe Zavala Sierra
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento autorizado a través del proyecto Ciencia de Frontera: CF-2019-263977.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) que a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422) proporcionó el financiamiento para la realización de algunas actividades experimentales de investigación presentadas en este trabajo.

Al personal técnico del Instituto de Química: Dra. Adriana Romo Pérez; M. en C. Everardo Tapia Mendoza por realizar el análisis de espectrometría de masas en tándem; M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y Quím. María de los Ángeles Peña González por el registro de espectros de RMN ^1H ; Dras. Beatriz Quiroz García y Nuria Esturau Escofet por el registro de espectros de RMN ^{13}C y bidimensionales; Dra. María del Carmen García González por los experimentos de espectrometría de masas; M. en I. Maricruz López López por su labor en el manejo de los residuos químicos y biológicos generados en esta investigación.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez por la expresión y purificación de la proteína *hPTP1B*₍₁₋₄₀₀₎.

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.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez por la dirección de este proyecto y los consejos otorgados durante el proceso.

A las Dras. Rachel Mata y Laura Flores Bocanegra por su valiosa retroalimentación y atención prestada a este trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Antonio Fajardo Hernández por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto, por compartir su conocimiento, tiempo, paciencia, confianza y sobre todo por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio 2-5 del Instituto de Química, por haberme apoyado durante mi estancia en ese lugar. Fue bastante grato trabajar con cada uno de ellos y agradezco todas las enseñanzas que me dejaron al igual que su amistad.

A Mariana, Fernanda, Leslie y Mafer, que gracias a este proyecto tuvimos la oportunidad de hacernos amigas y apoyarnos mutuamente tanto de manera profesional como emocional.

A mi amiga Guille, que gracias a su apoyo y amistad desde mis inicios académicos me fue más llevadera mi estancia tanto en la prepa como en la universidad, encontrando una amiga incondicional que me ha apoyado en todas las formas posibles.

A mi novio Christopher quien es y ha sido un completo apoyo especialmente en esos momentos en los que sentía que el mundo se me caía. Gracias por la paciencia y al cariño que día a día me demuestra.

Sobre todo, a mi familia, mis hermanas Laura, Irma y a mis papás, Arcadia y Arturo, mi sobrino Erick que sin ellos no habría podido cumplir todos mis logros y metas tanto académicas como personales pues creyeron en mí aún y cuando yo no lo hacía. Espero poder devolver algo de lo mucho que me han dado a lo largo de mi vida.

DEDICATORIA

A mi amado Dios

Por ser la fuente inagotable de sabiduría, fortaleza y guía en cada paso de este arduo camino académico. Este logro es testimonio de tu inmenso amor. Tu luz ha iluminado mi mente y mi corazón, brindándome la inspiración necesaria para alcanzar esta meta. Agradezco tu constante presencia, la cual me ha llenado de esperanza en los momentos más desafiantes.

Dedico esta tesis a Él, como un humilde acto de agradecimiento por Sus innumerables bendiciones.

ÍNDICE

Lista de Figuras	I
Lista de Tablas	III
Lista de Abreviaturas y Símbolos.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Panorama general de la Diabetes	2
2.2. Importancia de la enzima PTP1B	3
2.3. Inhibidores de la PTP1B.....	6
2.3.1 <i>Hongos aislados de Manglares</i>	13
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	15
5. PARTE EXPERIMENTAL	16
5.1. Obtención de muestras para el aislamiento fúngico	16
5.2. Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos	16
5.2.1 <i>A partir de sedimento</i>	16
5.2.2 <i>A partir de hojas</i>	17
5.3. Obtención de los extractos orgánicos (pequeña escala).....	23
5.3.1 <i>Obtención del extracto orgánico del hongo IQ-1620 (mediana escala)</i>	25
5.4 Ensayos de Actividad Biológica.....	25
5.4.1. <i>Viabilidad de la enzima hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎</i>	25
5.4.2 <i>Evaluación in vitro del efecto inhibitorio de los extractos sobre hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎</i> ...	25
5.5 Análisis metabolómico.....	26
5.5. Identificación de la especie fúngica	26
5.6. Procedimientos cromatográficos generales	27
5.7. Caracterización estructural.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1 Evaluación del potencial inhibitorio de los extractos orgánicos sobre hPTP1B ₍₁₋₄₀₀₎	29
6.3 Análisis por redes moleculares de los extractos orgánicos.....	30
6.4 Estudio químico de la especie fúngica IQ-1620.....	35
6.4.1 <i>Identificación taxonómica de la especie fúngica IQ-1620</i>	35

6.4.2 Comparación de los extractos en pequeña y mediana escala.....	35
6.5 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>Aspergillus</i> sp. IQ-1620.....	36
6.5.1 Evaluación del potencial inhibitorio sobre hPTP1B ₍₁₋₄₀₀₎ de las fracciones primarias.....	37
6.5.2 Separación por CLAE de la fracción IV y obtención de los productos 1–3.	37
6.5.3 Separación por CLAE de la fracción VII y obtención del compuesto 4.	39
6.5.4 Fraccionamiento secundario de la fracción VII.	40
6.5.5. Evaluación del potencial inhibitorio sobre hPTP1B ₍₁₋₄₀₀₎ de las fracciones VII-C a VII-E.	41
6.5.6. Separación por CLAE de la fracción VII-E y obtención del compuesto 5.....	42
6.6. Caracterización estructural de los productos puros	44
6.6.1. Caracterización estructural de los productos 1–3.....	44
6.6.2. Caracterización estructural del producto 4	56
6.6.3. Caracterización estructural del producto 5	63
6.7. Actividad inhibitoria sobre hPTP1B ₍₁₋₄₀₀₎ de los compuestos puros.	68
7. CONCLUSIONES	70
8. REFERENCIAS	71

Lista de Figuras

Figura 1. Regulación negativa de la tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)	5
Figura 2. Ejemplos selectos de inhibidores de PTP1B aislados de a partir de: hongo marino-antártico [1- 7], hongos endófitos de manglares [8-9], hongos endófitos [10-16], hongos entomógenos [17-20] y hongos de suelo [22-17]	11
Figura 3. Metalobitos aislados de <i>Talaromyces sp.</i> (IQ-313): duclauxina, talaromicesona B, xenoclauxina y bacillisporina F	11
Figura 4. Metalobitos aislados de <i>Aspergillus terreus</i> (IQ-046): butirrolactona I y butirrolactona IV	11
Figura 5. Xantoeopocina aislada de de <i>Penicillium sp.</i> (IQ-429)	12
Figura 6. Alboluteínas A, B y C aisladas de <i>Malbranchea albolutea</i>	12
Figura 7. Ubicación geográfica de los sitios de recolección de muestra	17
Figura 8. Ejemplo de crecimiento fúngico a pequeña escala	24
Figura 9. Ejemplos del proceso de extracción a pequeña escala	24
Figura 10. Resultados de inhibición de <i>hPTP1B</i> ₍₁₋₄₀₀₎ (Colección completa)	30
Figura 11. Compendio de extractos con mayor actividad inhibitoria sobre <i>hPTP1B</i> ₍₁₋₄₀₀₎	30
Figura 12. Red molecular generada a partir de la colección de extractos fúngicos	32
Figura 13. Análisis por MolNetEnhancer generado a partir de la colección de extractos fúngicos	33
Figura 14. Perfil cromatográfico por CLAE analítico del extracto a pequeña escala (A) y del extracto a mediana escala (B); PDA λ 254 nm	36
Figura 15. Cromatograma del fraccionamiento primario de <i>Aspergillus sp.</i> IQ-1620.	37
Figura 16. Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias	37
Figura 17. Cromatograma de la separación por CLAE preparativa de la fracción IV; PDA λ 254 nm	38
Figura 18. Cromatograma de la separación por CLAE preparativa de la fracción VII; PDA λ 254 nm	40
Figura 19. Cromatograma del fraccionamiento secundario por Cromatografía Flash (columna Sephadex LH-20) de la fracción VII	40
Figura 20. Comparación de los perfiles cromatográficos de las fracciones VII-C y VII-E; PDA λ 230 nm.	41
Figura 21. Cromatograma de la separación por CLAE preparativa de la fracción VII-E; PDA λ 254 nm	42
Figura 22. Resumen de los fraccionamientos realizados a partir del extracto <i>Aspergillus sp.</i> IQ-1620 para la obtención de los compuestos 1–5	43
Figura 23. Espectro de masas del compuesto 1 obtenido por DART	45
Figura 24. TMC-256A1 (1)	45
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H (Me ₂ CO- <i>d</i> ₆) registrado a 500 MHz del producto TMC-256A1 (1)	46
Figura 26. Espectro de RMN- ¹³ C (Me ₂ CO- <i>d</i> ₆) registrado a 175 MHz del producto TMC-256A1 (1)	47
Figura 27. Espectro de HSQC (Me ₂ CO- <i>d</i> ₆) del producto TMC-256A1 (1)	47
Figura 28. Espectro de HMBC (Me ₂ CO- <i>d</i> ₆) del producto TMC-256A1 (1)	48
Figura 29. Espectro de masas del compuesto 2 obtenido por DART	48
Figura 30. asperpirona A (2)	49

Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃) registrado a 500 MHz para la asperirona A (2)	50
Figura 32. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃) registrado a 175 MHz para la asperirona A (2)	51
Figura 33. Espectro de HSQC (CDCl ₃) del producto asperirona A (2)	51
Figura 34. Espectro de HMBC (CDCl ₃) del producto asperirona A (2)	52
Figura 35. Espectro de masas del compuesto 3 obtenido por DART	53
Figura 36. dianhidroaurasperona C (3)	53
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃) registrado a 500 MHz para la dianhidroaurasperona C (3)	54
Figura 38. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃) registrado a 175 MHz para la dianhidroaurasperona C (3)	55
Figura 39. Espectro de HSQC (CDCl ₃) del producto dianhidroaurasperona C (3)	55
Figura 40. Espectro de HMBC (CDCl ₃) del producto dianhidroaurasperona C (3)	56
Figura 41. Espectro de masas del compuesto 4 obtenido por DART	57
Figura 42. pestalazina A (4)	58
Figura 43. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃) registrado a 500 MHz para la pestalazina A (4)	59
Figura 44. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃) registrado a 125 MHz para producto pestalazina A (4)	60
Figura 45. Espectro de HSQC (CDCl ₃) del producto pestalazina A (4)	61
Figura 46. Espectro de HMBC (CDCl ₃) del producto pestalazina A (4)	61
Figura 47. Espectro de COSY (CDCl ₃) del producto pestalazina A (4)	62
Figura 48. Espectro de NOESY (CDCl ₃) del producto pestalazina A (4)	62
Figura 49. Espectro de masas del compuesto 5 obtenido por DART	63
Figura 50. funalenona (5)	63
Figura 51. Diferentes tautómeros propuestos para el compuesto 5	65
Figura 52. Espectro de RMN- ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) registrado a 700 MHz para la funalenona (5)	66
Figura 53. Espectro de RMN - ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆) registrado a 700 MHz para la funalenona (5)	66
Figura 54. Espectro de HSQC (A) y HMBC (B) (DMSO- <i>d</i> ₆) del producto funalenona (5)	67
Figura 55. Curva de concentración-respuesta de asperirona A (A) y dianhidroaurasperona C (B)	68

Lista de Tablas

Tabla 1. Ejemplos selectos de metabolitos aislados a partir de hongos provenientes de manglares	15
Tabla 2. Muestreo de diferentes regiones para la obtención de hongos axénicos	18
Tabla 3. Colección de hongos axénicos (IQ-1577 a IQ-1642)	19
Tabla 4. Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos	25
Tabla 5. Ejemplos representativos de compuestos de origen fúngico encontrados mediante el análisis de redes moleculares	33
Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>Aspergillus</i> sp. IQ-1620	36
Tabla 7. Rendimiento de las fracciones obtenidas a partir de la fracción IV	38
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de los productos 1–3	39
Tabla 9. Rendimientos del fraccionamiento secundario de la fracción VII	39
Tabla 10. Fraccionamiento secundario de la fracción VII	41
Tabla 11. Porcentaje de inhibición contra <i>h</i> PTP1B ₍₁₋₄₀₀₎ de las fracciones VII-E	42
Tabla 12. Fraccionamiento de VII-E	43
Tabla 13. Perfil en el ultravioleta y tiempo de retención de los productos 1–3	44
Tabla 14. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C observados para el compuesto 1	46
Tabla 15. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C observados para el compuesto 2	50
Tabla 16. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C observados para el compuesto 3	54
Tabla 17. Perfil en el ultravioleta y tiempo de retención del producto 4	56
Tabla 18. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C observados para el compuesto 4	58
Tabla 19. Perfil en el ultravioleta y tiempo de retención del producto 5	63
Tabla 20. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C observados para el compuesto 5	64
Tabla 21. Compendio del efecto inhibitorio de los compuestos aislados	67

Lista de Abreviaturas y Símbolos

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
APD	Agar Papa Dextrosa
C	Carbono
Ca ²⁺	Ion Calcio
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50.
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopía de Correlación
CPD	Caldo Papa Dextrosa
d	Señal doble
dd	Señal doble duplicada
ddd	Señal doble de dobles duplicada
Da	Dalton
DART	Análisis Directo en Tiempo Real
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELSD	Detector de Dispersión de Luz Tras Evaporación
EM	Espectrometría de masas
FID	Federación Internacional de Diabetes
g	Gramos
GLUT4	Proteína Transportadora de Glucosa 4
GNPS	Global Natural Product Social Molecular Networking

H ₂ CO ₂	Ácido carbónico
HCl	Ácido clorhídrico
HDAC	Histona desacetilasa
hept	Señal héptuple
HMBC	Conectividad Heteronuclear a Enlaces Múltiples
hPTP1B ₍₁₋₄₀₀₎	Proteína Tirosina Fosfatasa 1B Humana de 400 Aminoácidos
HRESIMS ²	Espectrometría de Masas de Alta Resolución por Electrospray en Tandem
HSQC	Correlación Cuántica Única Heteronuclear
IMC	Índice de Masa Corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
kDA	Kilodalton
L	Litros
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
Me ₂ CO	Acetona
Me ₂ CO- <i>d</i> ₆	Acetona deuterada
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahercio
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
N	Norte
N	Nitrógeno
Na ₃ VO ₄	Metavanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
NOESY	Espectroscopia Nuclear de Efecto Overhauser
NyP	Nafto-gamma-pirona

O	Oeste
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDK-1	Proteína Cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido
PFM	Pentafluorofenilos
PI3K	Proteína fosfatidilinositol-3-cinasa
PIP2	Proteína fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Proteína fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína cinasa B
p-NPP	p-nitrofenil fosfato
ppm	Partes por millón
PTP	Proteína Tirosina Fosfatasa
RI	Receptor de Insulina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Señal simple
SAHA	Ácido suberoilánilido hidroxámico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SRI	Sustrato-Receptor de insulina
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of Flight</i>)
t	Señal triple
td	Señal triple duplicada
t _R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
δ _C	Desplazamiento químico en espectro de RMN- ¹³ C
δ _H	Desplazamiento químico en espectro de RMN- ¹ H
λ	Longitud de onda

1. INTRODUCCIÓN

México por su variedad geográfica y climática tiene una gran diversidad de ecosistemas, que van desde lo más alto de las montañas hasta los mares profundos. Estos ecosistemas albergan una amplia gama de especies de todas las ramas del árbol de la vida. Entre estos recursos naturales, los hongos, por su diversidad taxonómica y roles ecológicos han cautivado a científicos, investigadores y entusiastas de la naturaleza durante siglos.

Dentro de los ecosistemas de nuestro país, los manglares son únicos por su capacidad de adaptación a condiciones salinas y por su ubicación en las interfases ecológicas, que los posicionan como una barrera estabilizadora entre la tierra y el mar. Estas condiciones de estrés permiten el desarrollo de una gran diversidad de microorganismos únicos. Entre ellos, los hongos asociados a este nicho ecológico han demostrado ser una fuente valiosa de metabolitos secundarios con propiedades medicinales y farmacológicas, útiles en medicina humana.

Dentro de las múltiples enfermedades que aquejan a la humanidad, la diabetes se ha convertido en un problema de salud global. Esta condición metabólica crónica representa un desafío continuo para la salud pública, debido a su prevalencia creciente y a sus complicaciones, las cuales suelen ser fatídicas. Dentro de la fisiopatología de esta enfermedad, la desregulación de las enzimas tirosina fosfatasa ocasionan diferentes fenómenos, tales como la alteración de la secreción de insulina, la modulación de procesos inflamatorios y la respuesta al estrés oxidativo, el desarrollo de resistencia a la insulina y la señalización vascular y neural, contribuyendo a las complicaciones crónicas asociadas con la diabetes. Estas causas las convierten en dianas terapéuticas prometedoras. En especial, la enzima *hPTP1B*₍₁₋₄₀₀₎ (Proteína Tirosina Fosfatasa 1B), desempeña un papel clave en la regulación de la señalización de la insulina y está relacionada con la resistencia a la insulina en pacientes diabéticos.

En este contexto, el presente trabajo se centró en el estudio de productos naturales de origen fúngico en México, específicamente de hongos asociados a manglares, como una fuente potencial de compuestos capaces de inhibir la enzima PTP1B. La inhibición de esta enzima representa nuevas perspectivas en el tratamiento de la diabetes, ofreciendo una alternativa a las terapias convencionales. Se exploró la diversidad fúngica en los manglares mexicanos de la región de Barra de Coyuca y Marquelia en el estado de Guerrero y se evaluó el potencial de ciertos hongos para generar metabolitos bioactivos como inhibidores de la enzima PTP1B. A partir de un estudio multi-informativo, se seleccionó a una especie candidata para realizar un estudio químico biodirigido, obteniendo algunos productos naturales con actividad inhibitoria frente *hPTP1B*₍₁₋₄₀₀₎.

2. ANTECEDENTES

2.1. Panorama general de la Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el cuerpo no utiliza eficientemente la insulina que produce. Esta hormona regula la concentración de glucosa en sangre. Durante la diabetes no controlada es común que se presenten cuadros de hiperglucemia, es decir que la glucosa en sangre se encuentre en niveles altos, evento que con el tiempo provoca deterioro en órganos y sistemas, principalmente sobre los nervios y vasos sanguíneos. (OMS, 2023).

Existen tres tipos de diabetes, I, II y gestacional. La diabetes tipo I que se caracteriza por una producción deficiente de insulina que tiene como consecuencia la necesidad de la administración diaria de la hormona para nivelar la glucosa en sangre. Por otra parte, en la diabetes tipo II, la producción deficiente de insulina y su utilización inadecuada aumentan las concentraciones de glucosa en sangre. Por su parte, la diabetes gestacional es un tipo de diabetes que aparece durante el embarazo y se caracteriza por una hiperglucemia que, pese a mostrar niveles superiores a los normales, son significativamente inferiores a los establecidos para establecer un diagnóstico de diabetes. (OMS, 2023).

En el año 2019, la Diabetes en América del Norte y el Caribe representó el 13.8% de las causas de muertes en individuos de entre 20 y 79 años. En ese mismo año, en México se estimó que 12.8 millones de personas padecían diabetes mellitus, cifra que colocó al país en el sexto lugar a nivel mundial entre los países con mayor cantidad de adultos con la enfermedad (Vega-López *et. al.*, 2021).

Según el Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (FID), en 2021 el 10.5% de la población mundial adulta (20-79 años) padecía esta enfermedad, y aproximadamente la mitad de ese porcentaje desconocía su condición. Más del 90% de las personas con diabetes a nivel mundial padecen diabetes mellitus de tipo II. Las proyecciones de la FID muestran que para el 2045, uno de cada ocho adultos, aproximadamente 783 millones de personas vivirán con diabetes, pronosticando un aumento del 46% (FID, 2022).

Un estudio reciente reveló que en México las personas de 40 a 60 años tienen mayor probabilidad de tener diabetes diagnosticada, así como las personas con sobrepeso, obesidad, alto índice de masa corporal (IMC), hipertensión, colesterol alto e incluso aquellos con un nivel educativo menor al superior (Rojas-Martínez *et. al.*, 2018). De la misma manera que como ocurre en la mayoría de las enfermedades crónicas no transmisibles, la diabetes se produce como resultado de factores ambientales y genéticos; el estilo de vida juega un papel decisivo para determinar si la predisposición genética conducirá a la enfermedad (Bello-Chavolla *et. al.*, 2017). Por otra parte, se ha propuesto que existe un vínculo entre el medio ambiente y la presencia de diabetes en las personas. En general, los niveles más altos de accesibilidad a espacios verdes se asociaron con un menor riesgo de diabetes

mellitus de tipo II, mientras que niveles mayores de ruido y contaminación del aire se asocian con un riesgo mayor, sugiriendo que las características ambientales pueden influir en la prevención de la enfermedad (Dendup *et. al.*, 2018).

La diabetes tipo II es el principal problema de salud en México, de acuerdo con los crecientes casos y el evidente impacto económico de la enfermedad. En las últimas décadas se ha observado una tendencia alarmante y de rápido crecimiento en la prevalencia, que no solo se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular, sino que también confiere un mayor riesgo de retinopatía diabética, amputación de extremidades e insuficiencia renal (Bello-Chavolla *et. al.*, 2017), tal como lo indican las estadísticas para nuestro país (Rojas-Martínez *et. al.*, 2018).

La diabetes es una enfermedad muy común y tiene un efecto mayor sobre la mortalidad en México que en países de alto ingresos. (Alegre-Díaz *et. al.*, 2016). En México, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), a partir de las cifras de las Estadísticas de Defunciones Registradas, en 2021, 13% de las defunciones en todo el territorio nacional fueron a causa de diabetes (140,729 casos), de ese total 51 % de las defunciones corresponden a hombres (71,330 casos) y 49% a mujeres (69,396 casos). Durante el periodo de enero-junio de 2022 las defunciones por enfermedades del corazón fueron la primera causa de muerte a nivel nacional, con 105,864 casos. Siguiendo las causadas por diabetes mellitus con 59,996 casos. A nivel nacional, la tasa de mortalidad por diabetes mellitus fue de 11.0 por cada 10 mil habitantes (INEGI, 2021-2022).

En México, el gran exceso de mortalidad asociado con la diabetes reflejó que la alta prevalencia de diabetes y el mal pronóstico asociado a ella, se debe en parte a la obesidad generalizada, la cual también afecta su incidencia, y es ocasionada en parte a un tratamiento inadecuado, factores de riesgo asociados y complicaciones (Alegre-Díaz *et. al.*, 2016). Con el tiempo se ha modificado el tipo de tratamiento farmacológico destinado a las personas que viven con diabetes; en nuestro país el tratamiento exclusivo con hipoglucemiantes orales disminuyó, de 84.8% en 2006, a 72.4% y a 67.9 para 2016. Paralelamente en el mismo periodo, el uso de insulina, con o sin hipoglucemiantes orales, se incrementó de 3.2%, a 9.8 y 16.0% respectivamente (Rojas-Martínez *et. al.*, 2018).

Con base en las estadísticas, es evidente que la diabetes mellitus es una enfermedad importante a nivel tanto nacional como internacional, siendo tema de ocupación para diversas áreas de la medicina en donde se pretenden encontrar alternativas a los tratamientos actuales para disminuir la letalidad y/o simplemente para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad.

2.2. Importancia de la enzima PTP1B

La regulación anormal de las vías de transducción de señales y por lo tanto la interrupción de patrones normales de fosforilación de proteínas se encuentran involucrados en el origen de una gran variedad de enfermedad importantes, entre ellas, la diabetes y la obesidad. En

este sentido, la capacidad de dirigirse exclusivamente a dichas vías de señalización tiene un enorme potencial terapéutico (Krishnan *et. al.*, 2018).

La insulina es fundamental en la regulación de la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de los lípidos y el equilibrio energético. La cadena de señalización de la insulina inicia cuando ésta se une a su receptor (RI) de tirosina cinasa. Esta unión provoca una cascada en eventos de fosforilación, comenzando con el propio receptor de insulina en múltiples residuos de tirosina y la fosforilación de tirosina del sustrato del RI y otras moléculas adaptadas, que derivan en los efectos biológicos de la insulina. El grado de fosforilación de tirosina en una proteína determinada, está controlado por las acciones recíprocas de las actividades de proteína-tirosina-cinasa y proteína-tirosina fosfatasa (PTP). Dado que la estimulación de la insulina lleva a múltiples eventos de fosforilación de residuos de tirosina, la actividad aumentada de una o más PTP podría provocar resistencia a la insulina, por ellos se reporta aumento de la actividad de la PTP en varios estados de obesidad y en presencia de diabetes mellitus de tipo II. (Klama *et. al.*, 2000) (**Figura 1**).

En los adipocitos y las células musculares, la insulina se une a la subunidad α de su receptor, lo que conduce a la activación de RI por autofosforilación, seguida de una rápida fosforilación de SRI, que induce el reclutamiento y activación de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), que convierte el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Esto promueve el reclutamiento de la proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK-1) a la membrana plasmática y fosforila a la proteína cinasa B (PKB), la cual al fosforilarse y activarse, promueve la traslocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4), desde las vesículas de almacenamiento intracelular hasta la membrana plasmática y da como resultado una captación de glucosa en la célula. Por lo tanto, PTP1B, unida a retículo endoplásmico, desactiva el RI e SRI a través de la desfosforilación. (Proença *et. al.*, 2022).

Además de su papel destacado en la señalización de la insulina, la PTP1B se ha relacionado con la regulación de la leptina. Se tiene evidencia de que la PTP1B es capaz de desfosforilar JAK2, un conocido efector río abajo del receptor de leptina, lo que da como resultado una inhibición de la síntesis de la hormona estimulante del apetito (Villamar-Cruz *et. al.*, 2021) (**Figura 1**).

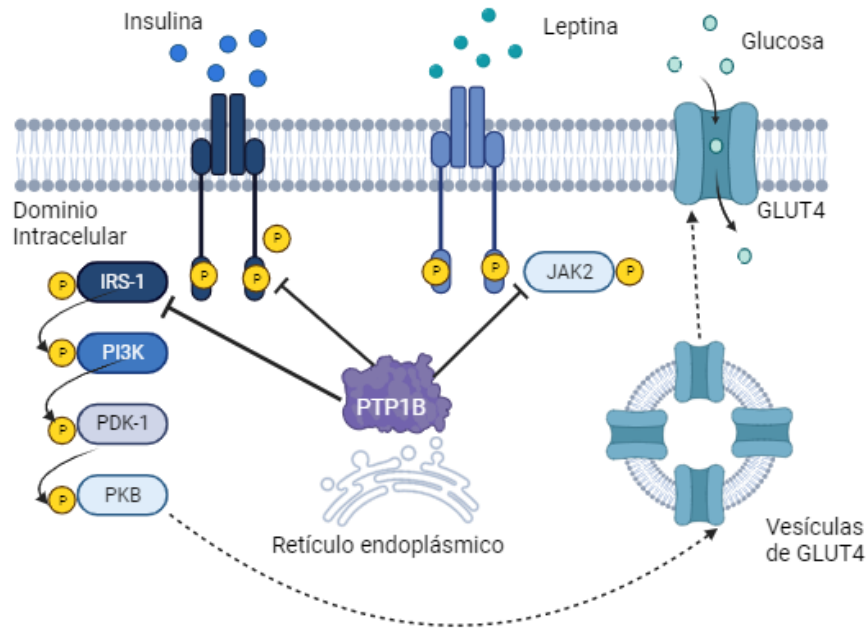


Figura 1. Regulación negativa de la tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) en la vía de señalización de la insulina, a través de la inhibición del receptor insulina (IR) y sustratos del receptor insulina (IRS), lo que impide la activación de PI3K y PKB, por lo tanto, no se produce la translocación de GLUT4, lo que provoca una reducción del transporte de glucosa al interior de la célula (adaptado de Proença *et. al.*, 2022).

Las PTP, LAR, SHP-2 y PTP1B, regulan la señalización de los receptores de insulina de manera normal y/o en la resistencia a la insulina. De estas, PTP1B es una enzima abundante que se expresa en todos los tejidos. También es un regulador negativo clave en las vías de señalización de la leptina. En células cultivadas, la sobreexpresión de PTP1B inhibe la fosforilación estimulada por insulina del RI y del sustrato del receptor de insulina (SRI-1), mientras que la carga osmótica de anticuerpos anti-PTP1B en las células mejora la señalización de insulina (Klama *et. al.*, 2000).

La PTP1B es una fosfatasa no receptora codificada por el gen PTPN1. Es una PTP clásica no receptora expresada de manera ubicua, con 435 aminoácidos y un peso molecular de 50 kDa. Tiene un dominio catalítico N-terminal, dos secuencias ricas en prolina y una región hidrofóbica C-terminal (He *et. al.*, 2014). Después de ser sintetizada, la PTP1B se ancla al retículo endoplásmico con el C-terminal 35 residuos de aminoácidos, mismo que al ser hidrofóbicos, ayudan a dirigir la enzima hacia la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático (Proença *et. al.*, 2022).

No obstante, la PTP1B también implicada en la regulación de otras vías, incluido el receptor del factor de crecimiento epidémico, la cadherina y las vías de señalización integrina, la regulación del ciclo celular y la respuesta a diversos estreses celulares. (Klama *et. al.*, 2000), e incluso la aparición de diversos tipos de cáncer.

Las propiedades supresoras de tumores de PTP1B se atribuyeron a observaciones realizadas en experimentos de cultivos celulares, que demuestran que su sobreexpresión previene la transformación celular y disminuye la carcinogénesis de fibroblastos transformados (Villamar-Cruz *et. al.*, 2021). Se ha demostrado que PTP1B activa c-Src en líneas celulares de cáncer de mama al desfosforilar su residuo regulador negativo Y530. Además, se ha registrado sobreexpresión de PTP1B en muestras de cáncer de mama, en comparación con controle sanos. Esta sobreexpresión se detectó en todas las etapas del desarrollo del tumor y se correlacionó con la sobreexpresión de ERBB2, un receptor de tirosina cinasa frecuentemente amplificado en el cáncer de mama. De la misma forma, se encontró que la sobreexpresión de PTP1B en tejidos de cáncer colorrectal, y su expresión se correlacionó con la diferenciación tumoral, la invasión, la metástasis en ganglios linfático y el estadio TNM, lo que sugiere que PTP1B también puede desempeñar un papel positivo en el cáncer colorrectal. Por lo tanto, la inhibición de PTP1B puede ser una estrategia novedosa para tratar esos importantes cánceres humano (He *et. al.*, 2014).

Aunque el papel oncogénico de PTP1B se ha estudiado ampliamente para el cáncer de mama, algunas pruebas demuestran que PTP1B desempeña un papel importante en el desarrollo de otros tipos de cáncer, por ejemplo, se ha asociado con el estudio de tumores y la supervivencia general de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Por otra parte, el mecanismo molecular por el cual PTP1B también actúa como supresor tumoral solo ha sido descrito a detalle para melanoma y glioblastoma. En el melanoma, la PTP1B desfosforila la caveolina y regula a la baja un eje de señalización Rab5/Rac1, que es esencial en la migración celular. Por otro lado, en los glioblastomas, el tratamiento con un inhibidor de PTP1B provocó una disminución significativa en la adhesión, migración e invasión por IL-13, al inhibir la desfosforilación de Src y, en consecuencia, la inactivación de Src/Ras/Raf/MEK (Villamar-Cruz *et. al.*, 2021).

2.3. Inhibidores de la PTP1B

Teniendo en cuenta la extensa validación de la PTP1B como diana terapéutica, tanto en la industria como en el ámbito académico se establecieron muchos programas para generar inhibidores dirigidos al sitio activo de la enzima (Krishnan *et. al.*, 2018). En las últimas dos décadas, se han descubierto numerosos inhibidores de PTP1B con gran diversidad estructural, la mayoría de ellos incorporan miméticos de fosfotirosina (pTyr) y se unen al sitio catalítico. La selectividad es uno de los principales problemas en el desarrollo de inhibidores de PTP1B debido a que todas las PTP tienen un alto grado de conservación estructural en el sitio activo, el sitio de unión de pTyr (fosfotirosina). Los estudios de especificidad de sustrato de PTP han demostrado que no únicamente es suficiente pTyr para la unión de alta afinidad, sino que también los residuos que intervienen en el reconocimiento del sustrato son importantes (Zhang *et. al.*, 2007).

Los productos naturales son una fuente importante de compuestos que contribuyen a la lucha contra ciertas enfermedades de interés, como la diabetes. En el pasado y hoy en día, los compuestos derivados de recursos naturales constituyen un recurso invaluable para

el desarrollo de nuevos medicamentos. La intensa investigación científica sobre plantas, animales y microorganismos en los últimos 100 años revela que los recursos naturales son una fuente esencial de moléculas bioactivas sobre diferentes objetivos fisiológicos (Mata *et. al.*, 2023).

La Medicina Tradicional China es un ejemplo de la contribución de los recursos naturales como fuente de obtención de moléculas inhibidoras de PTP1B. En un estudio realizado por Zhan y colaboradores donde se integró una colección de más 200 extractos antidiabéticos extractos y productos naturales puros aislados, se detectaron el ácido ursólico, ácido corosólico y ácido oleanólico aislado de *Cornus officinails*, como inhibidores de la proteína (Zhan *et. al.*, 2008).

En cuanto a los productos naturales de origen microbiano, el reino de los hongos posee una gran diversidad y está reconocido como una fuente valiosa de moléculas terapéuticamente activas. Por ejemplo, se han aislado numerosos metabolitos secundarios a partir de hongos marinos y entre el 70% y el 80% de ellos poseen actividades biológicas diversas, como anticancerígenos, antibacterianos, antiparasitarios, y eliminadores de radicales libres (Sun *et. al.*, 2021). En los últimos años, grupos de investigación de todas partes del mundo han descrito clases diferentes de metabolitos secundarios fúngicos como potentes inhibidores de la PTP1B. Los hongos marinos, los hongos endófitos de los manglares, los hongos entomógenos, los hongos del suelo y las setas se identificaron como la fuente principal de varias clases de inhibidores de PTP1B (Deshukh *et. al.*, 2023). A continuación, se presentan algunos ejemplos de los compuestos que se han aislado a partir de hongos y que poseen actividad inhibitoria frente la enzima PTP1B:

- Hongos marinos antárticos
 - ◇ A partir de *Aspergillus sp.* SF5929, aislado de muestras de coral del Mar de Ross, Antártida, se encontraron un racemato de un derivado difenólico denominado (\pm)-tilopilusina D [1], Funalenona [2], Rubrofusarina B [3], TMC-256A-1 [4], Aurasperona F [5], Fonsecaina [6] y Malformina A1 [7], los cuales mostraron actividad contra PTP1B con valores de CI_{50} que oscilaban entre 3.3 y 8.1 μ M. Los estudios cinéticos sugieren que la tilopilusina D, Funalenona y Aurasperona F tienen efectos inhibidores no competitivos contra PTP1B (Kim *et. al.*, 2020).
- Hongos de Manglares Endofíticos
 - ◇ Se extrajo un polihidroxi terfenilo, la asperterfenilina A [8] a partir de *Aspergillus candidus* LDJ-5, especie endófito de la raíz de *Rhizophora apiculata* Blume en el parque Sanya Bailu de la provincia de China de Hainan. La asperterfenilina A mostró una actividad inhibitoria de PTP1B con valor de CI_{50} de 21 μ M, presentando también actividad contra el virus de la influenza A (H1N1) con valor de CI_{50} de 53 μ M (Zhou *et. al.*, 2021).
 - ◇ Un nuevo policétido que contiene una γ -pirona, fusarester B [9], fue aislado del hongo marino *Fusarium sp.* Hungel en una muestra de suelo colectada en la Reserva de manglares de Futian en Shenzhen, provincia de Guangdong, China.

Muestra una actividad débil anti-PTP1B con una tasa de inhibición del 56 % a 40 μM (Gong *et. al.*, 2019).

- Hongos endófitos

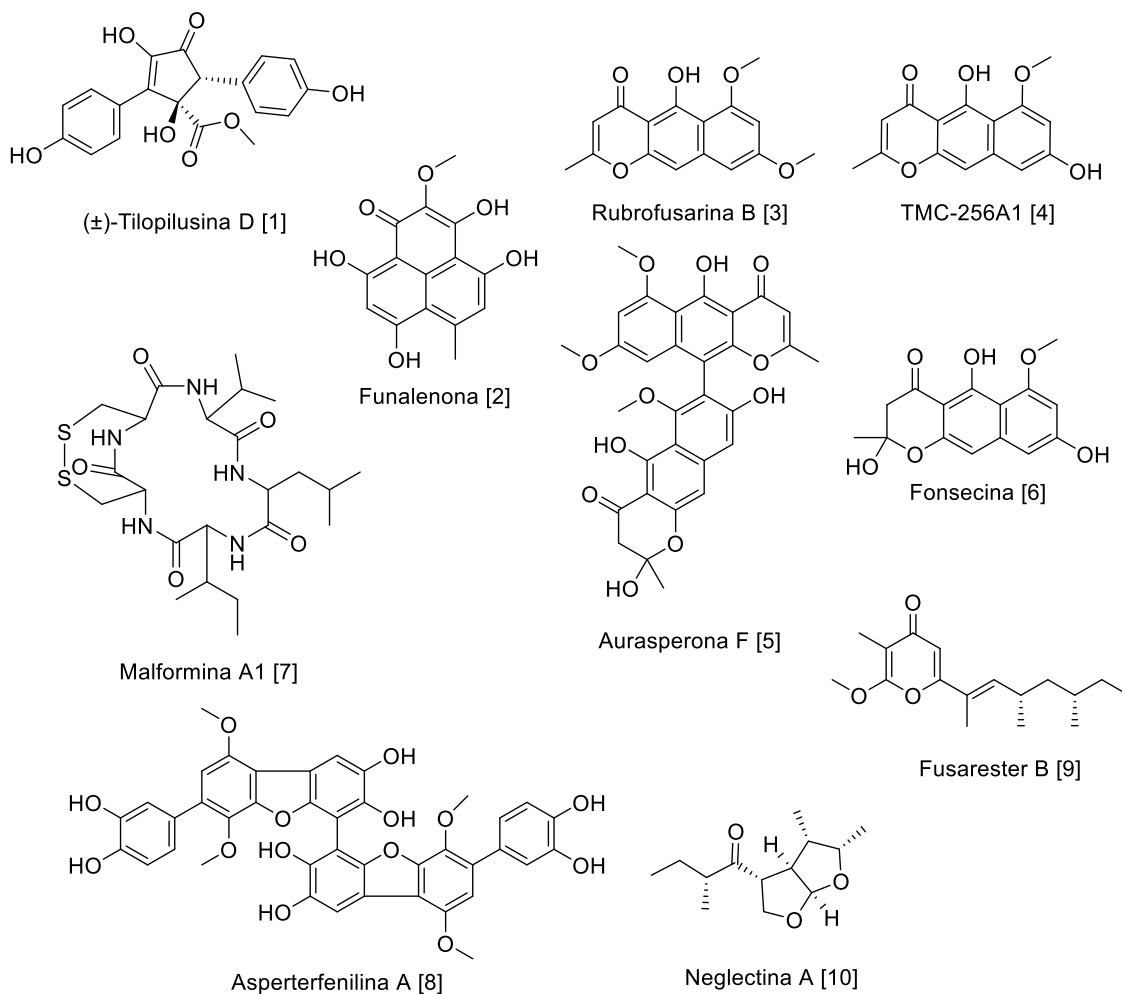
- ◇ Se purificó un metabolito derivado de un policético, la neglectina A [10], a partir de *Pestalotiopsis neglecta*, un hongo endófito que reside en el interior de la especie vegetal *Kandelia candel* recogida en Dongzhai, provincia de Hainan, China. La neglectina A mostró actividad media frente a SHP1, CDC25B y PTP1B con valores de CI_{50} de 17.1, 24.0 y 6.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Gao *et. al.*, 2019).
- ◇ Las phomoxantonas A [11] y B [12], dímeros de xantonas, se aislaron del hongo endofítico *Phomopsis sp.* By254. Los dos compuestos muestran valores de CI_{50} de 13.1 y 14.3 μM contra PTP1B y 11.9 μM en SHP2. La phomoxantona A es un inhibidor no competitivo de PTP1B (Yang *et. al.*, 2020).
- ◇ Se extrajeron dos compuestos derivados no adrenérgicos, la rubratoxina ácida B [13] y la talarodrida [14], aislados del hongo *Talaromyces purpurogenus* asociado a las hojas de *Tylophora ovata* recolectadas en la provincia de Guangxi, China. Ambos compuestos mostraron una actividad inhibitoria media frente a XOD y PTP1B con una tasa de inhibición del 67% y 76%, respectivamente (Zhao *et. al.*, 2019).
- ◇ El inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), ácido suberoilánilido hidroxámico (SAHA), se incorporó a un caldo de cultivo del hongo endófito *Phoma sp. nov.* LG0214, aislado de *Parkinsonia microphylla* cambiando el perfil metabólico. Dio como resultado el aislamiento de (10'S)-verruculida B [15], inhibiendo la actividad de la PTP1B, con valores de CI_{50} de 13.7 μM (Gubiani *et. al.*, 2017).
- ◇ Se descubrió un nuevo peróxido de esterol C25, el phomasterol A [16], a partir de *Phoma sp.* EA-122, un hongo endófito que reside en el interior de las hojas de *Eupatorium adenophorum*, recogidas en el Instituto de Botánica de Kunming, provincia de Yunnan, China. El fomasterol A mostró actividad inhibitoria de PTPT1B con valores de CI_{50} de 25 μM (valores de CI_{50} de 13.7 μM (usando ácido ursólico como control positivo, CI_{50} = 2.6 μM) (Chen *et. al.*, 2015).

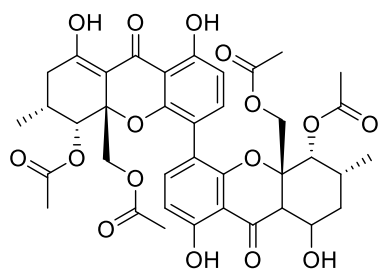
- Hongos entomógenos

- ◇ La fumosorinona [17], es un nuevo alcaloide de 2-piridina extraído de *Isaria fumosorosea*. La fumosorinona es un inhibidor no competitivo de PTP1B con valores de CI_{50} de 14.0 μM . También activa la señalización de la insulina en células HepG2 resistentes a la insulina, mostrando un efecto antidiabético (Liu *et. al.*, 2015). Este organismo fue aislado de un lepidóptero no identificado recolectado en la provincia de Hebei, China. Ambos compuestos mostraron una actividad inhibitoria significativa contra PTP1B con valores de CI_{50} de 3.24 y 0.59 μM , respectivamente (usando ortovanadato de sodio como control positivo, CI_{50} = 11.3 μM) (Zhang *et. al.*, 2017).
- ◇ Los pigmentos terreusinona A [18], pinofilina C [19] y criptosporióptida A [20] se extrajeron de *Cordyceps graciloides*. Los compuestos inhibieron la enzima PTP1B con valores de CI_{50} de 12.5, 6.8 y 7.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Wei *et. al.*, 2015).

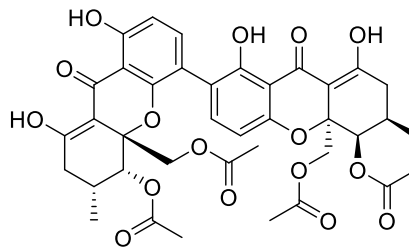
- Hongos de suelo

- ◇ La aspergoraquina A [21], a partir de *Aspergillus gorakhpurensis* F07ZB1707 mostró actividad selectiva contra PTP1B con valor de Cl_{50} de 0.6 μ M. También mostró toxicidad modesta contra líneas de células tumorales A549, HeLa, Bel-7402 y SMMC-7721 con valores de Cl_{50} en el rango de 6.8 a 83.4 μ M (Ji *et. al.*, 2021).
- ◇ Un conjunto de azafilonas nombradas defectinas C1-C3 [22, 23, 24], defectinas D1-D2 [25, 26] y defectina E [27], a partir del cultivo de *Aspergillus deflectus* NCC0415 aislado de una muestra de suelo recogida en el distrito de Huangjing Laolin del condado de Gulan, provincia de Sichuan, China. Los compuestos exhibieron efectos inhibitorios contra PTP1B, con valores de Cl_{50} que oscilan entre 2.1 y 40.4 μ M (control positivo Na_3VO_4 Cl_{50} = 1.1 μ M) (Huo *et. al.*, 2020).

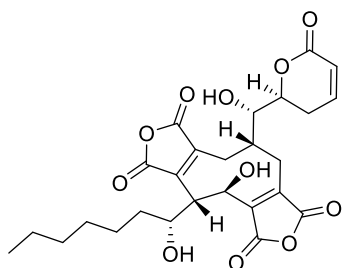




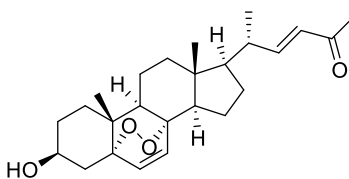
Phomoxantona A [11]



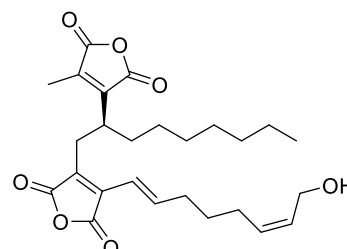
Phomoxantona B [12]



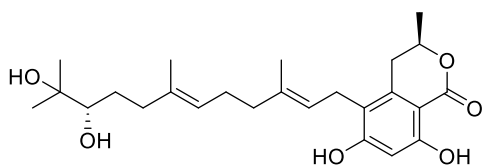
Rubratoxina B [13]



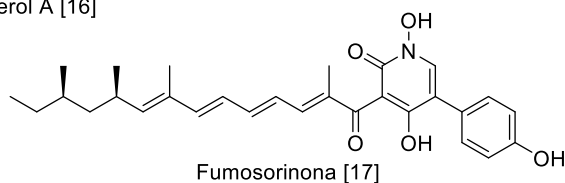
Phomasterol A [16]



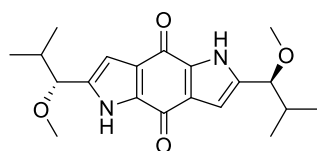
Talarodrida [14]



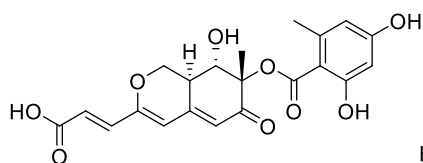
(10'S)-verruculida B [15]



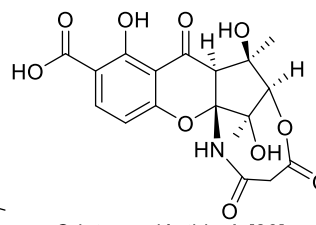
Fumosorinona [17]



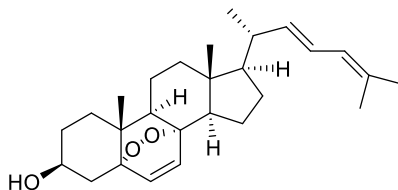
Terreusinona A [18]



Pinofilina C [19]



Criptosporióptida A [20]



Aspergoraquina A [21]

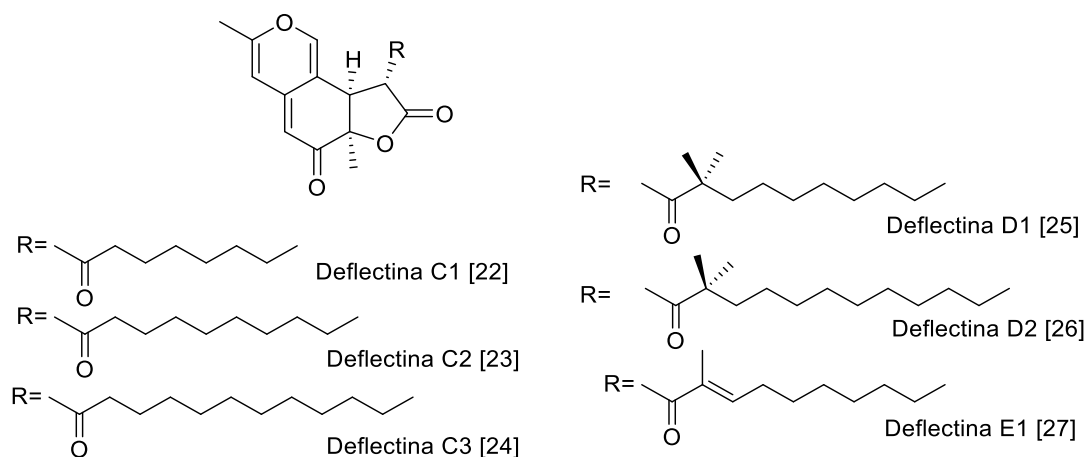


Figura 2. Ejemplos selectos de inhibidores de PTP1B aislados de a partir de: hongo marino-antártico [1- 7], hongos endófitos de manglares [8-9], hongos endófitos [10-16], hongos entomógenos [17-20] y hongos de suelo [22-17].

A nivel nacional, en los últimos años distintos grupos de investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México se han enfocado en el estudio de la gran diversidad de Productos Naturales de nuestro país. Siguiendo con esta línea de investigación, se han encontrado organismos fúngicos que generan metabolitos con potencial de inhibir a la enzima PTP1B, los cuales se ejemplifican a continuación:

- ◇ Las fenalenonas diméricas duclauxina, talaromicesona B, xenoclauxina, bacillisporina F (**Figura 3**) obtenidas a partir de un aislamiento de *Talaromyces sp.* (IQ-313), aislado d una muestra de suelo colectada en la Huasteca Hidalguense, mostraron potencial inhibitorio sobre *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎, con valores de CI_{50} de 12.7, 82.1, 21.8 y 13.4 μ M, respectivamente (Jiménez-Arreola *et. al.*, 2020). En este ensayo se utilizó el ácido ursólico como control positivo (CI_{50} = 26 μ M).

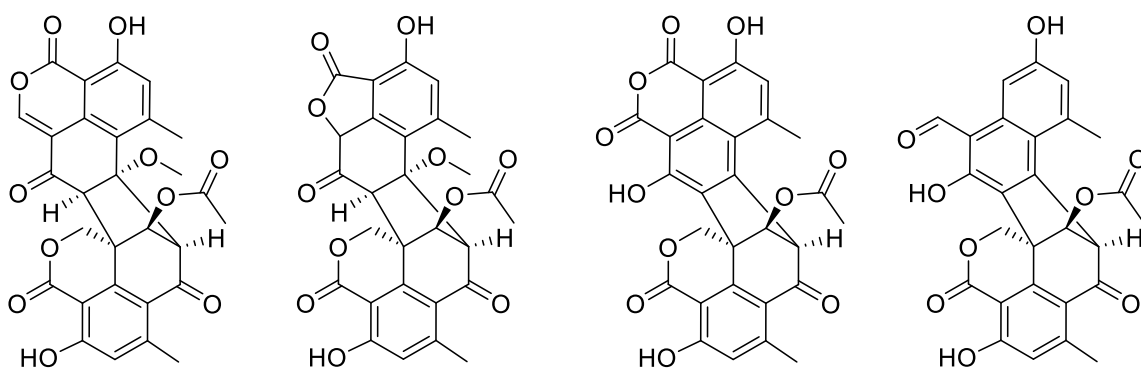


Figura 3. Metabolitos aislados de *Talaromyces sp.* (IQ-313): duclauxina, talaromicesona B, xenoclauxina y bacillisporina F.

- ◇ La butirolactona I y butirolactona IV (**Figura 4**) como inhibidores de la *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ se examinaron *in vitro* y mostraron valores de CI_{50} de 35 y superiores a 450 μ M, respectivamente. Además de diversos estudios de la relación estructura-actividad

de este tipo de moléculas y la exploración de la afinidad de unión del complejo butirolactona I-*h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ respaldó su papel como un inhibidor alostérico de la proteína (Rivera-Chávez *et. al.*, 2020).

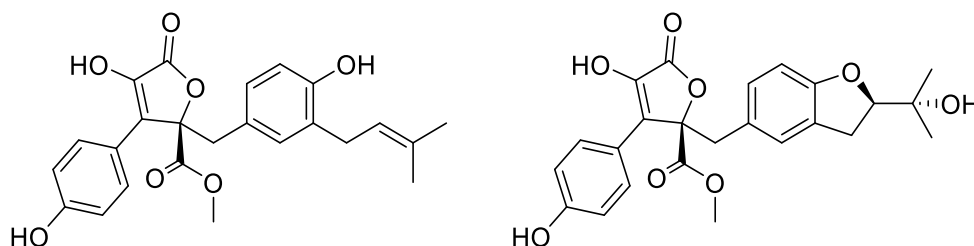


Figura 4. Metalobitos aislados de *Aspergillus terreus* (IQ-046): butirolactona I y butirolactona IV.

- ◇ También la exploración del mecanismo de acción de la xantoeopocina (**Figura 5**) con actividad inhibitoria de *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ (valor de CI_{50} de $8.8 \pm 1.0 \mu M$), obtenida a partir de una especie de *Penicillium*, mediante un modelo homologado de *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ demostrando su comportamiento como un modulador alostérico de *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ (Martínez-Aldino *et. al.*, 2021).

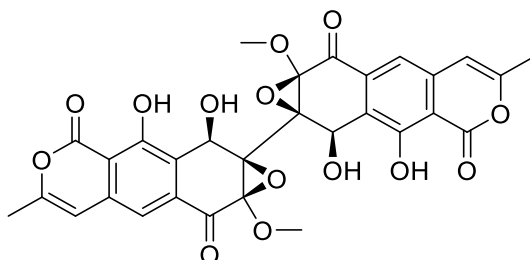


Figura 5. Xantoeopocina aislada de de *Penicillium sp.* (IQ-429).

- ◇ Finalmente, a partir de cultivos de *Malbranchea albolutea*, se descubrieron las alboluteínas A, B y C. (**Figura 6**) con valores de actividad inhibitoria frente PTP1B de CI_{50} de 19 a $129 \mu M$ (ácido ursólico $CI_{50} = 29.8 \mu M$, control positivo). Además, la alboluteína C se comporta como un inhibidor no competitivo, al unirse al sitio alostérico de la enzima (Díaz- Rojas *et. al.*, 2021).

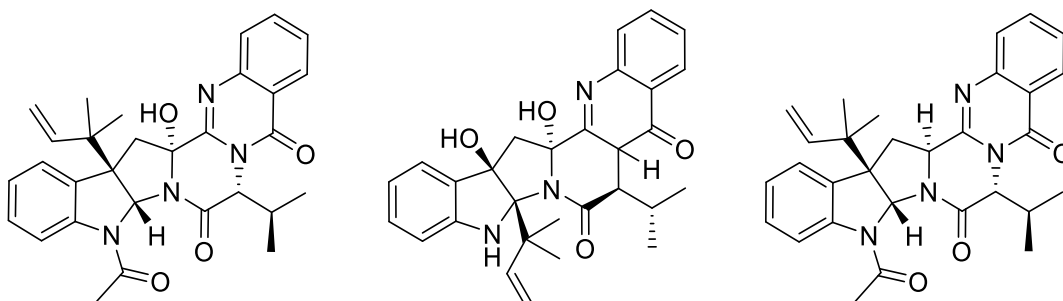


Figura 6. Alboluteínas A, B y C aisladas de *Malbranchea albolutea*

De acuerdo con las investigaciones anteriores queda claro que es de vital importancia el continuar con el descubrimiento de nuevos prototipos estructurales a partir de organismos fúngicos para el desarrollo de agentes antidiabéticos con este mecanismo de acción.

2.3.1 Hongos aislados de Manglares.

Los manglares son humedales arbolados tropicales o subtropicales, presentes en las zonas costeras que albergan una gran diversidad de hongos. Son sistemas abiertos debido a que acoplan ecosistemas terrestres y ecosistemas estuarios costeros (Wang *et. al.*, 2014). A su vez, los manglares son complejos, y las comunidades microbianas presentes en ellos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos de estos ecosistemas (Li *et. al.*, 2022). Estos ecosistemas desempeñan un papel importante en la protección de los hábitats terrestres funcionando como barreras contra las devastadoras tormentas tropicales, corrientes marinas y la contaminación del aire. Además, se caracterizan por temperaturas medias altas y constantes, alta salinidad, fuertes vientos y suelos fangosos anaeróbicos (Jia *et. al.*, 2020).

Los hongos asociados a los manglares se dividen en hongos saprófitos, parásitos y verdaderos, simbióticos en funciones ecológicas. Los hongos saprófitos son fundamentales para la descomposición de materia orgánica del manglar, además de ser un rico reservorio de productos naturales diversos que podrían utilizarse en la exploración de nuevos antibióticos o medicamentos. Los hongos patógenos tienen efectos significativos en la supervivencia de las otras especies y el balance biológico, para el mantenimiento del ecosistema, mientras que los hongos endófitos de manglares también representan una fuente prolífica de diversos compuestos bioactivos (Cheng *et. al.*, 2009).

Este tipo de adaptación única y característica de los hongos provenientes de manglares en el medio marino es una fuente de investigación interesante para nuevas especies y una fuente prometedora de compuestos de importancia farmacéutica (Wang *et. al.*, 2014). Los géneros de microorganismos más comunes que se pueden aislar a partir de muestras provenientes de manglares son *Streptomyces*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Li *et. al.*, 2022). Los estudios químicos previos de hongos asociados a manglares han resultado en el descubrimiento de varios metabolitos secundarios bioactivos incluyendo terpenos, cromonas, cumarinas, policétidos, alcaloides y péptidos con diversas características estructurales (Wang *et. al.*, 2014).

Los hongos de manglar constituyen el segundo grupo ecológico más grande de los hongos marinos, y muchos de ellos pueden producir una amplia variedad de metabolitos que son estructuralmente únicos y farmacológicamente activos, como antitumorales, antibióticos, antivirales, etc (Wang *et. al.*, 2014). Algunos ejemplos representativos de los trabajos de investigación que han aparecido en la literatura hasta ahora, en relación con el aislamiento, elucidación estructural, y las actividades biológicas de los metabolitos secundarios de los hongos endófitos de manglares son los siguientes (**Tabla 1**):

Tabla 1. Ejemplos selectos de metabolitos aislados a partir de hongos provenientes de manglares.

Clase química	Especie	Metabolito (s)	Actividad biológica	Referencia
Sesqui-terpeno	<i>Xylaria sp.</i> BL321	<ul style="list-style-type: none"> • Talaperóxidos A-D • Esteperóxido B 	Citotoxicidad contra cinco líneas celulares de cáncer humano (MCF-7, MDA-MB-435, HepG2, HeLa y PC-3) con Cl_{50} 1,33, 2,78, 1,29, 1,73, 0,89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para talaperóxido B y 1,92, 0,91, 0,90, 1,31, 0,70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para talaperóxido D.	(Li <i>et. al.</i> , 2011)
Sesqui-terpeno	<i>Streptomyces sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Xiamicina 	Actividad selectiva contra el VIH.	(Ding <i>et. al.</i> , 2010)
Cromonas	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Pestalotiopsonas A-F 	Pestalotiopsona A mostró una citotoxicidad moderada contra la línea celular de cáncer murino L5178Y.	(Xu <i>et. al.</i> , 2009)
Xantonas	<i>Penicillium spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Ácido 8-(metoxicarbonil)-1-hidroxi-9-oxo-9H-xanteno-3-carboxílico-dimetil 8- metoxi-9-oxo-9H-xanteno-1,6-dicarboxilato 	Mostró una modesta actividad antifúngica frente a <i>Fusarium oxysporum f. sp.</i> con un valor MIC de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	(Shao <i>et. al.</i> , 2008)
Antra-quinona	<i>Phomopsis spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (2R,3S)-7-etil-1,2,3,4-tetrahidro-2,3,8-trihidroxi-6-metoxi-3-metil-9,10-antracenediona 	Mostró una citotoxicidad débil contra líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y actividad antibacteriana contra el <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 estándar y el <i>S. aureus</i> SK1 resistente a la metilicina	(Klaiklay <i>et. al.</i> , 2012)
Antra-quinona	<i>Nigrospora spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> •6-Odesmetildeclogriseofulvina •6'-hidroxigriseofulvina •2,3-didehidro-19a-hidroxi-14-epicochloquinona B •Declogriseofulvina •Griseofulvina 	Griseofulvina mostró una actividad moderada contra <i>Valsa mali</i> y <i>Stemphylium solani</i> . Además 2,3-didehidro-19a-hidroxi-14-epicochloquinona B inhibió potentemente el crecimiento de MCF-7, SW1990 y SMMC7721 con valores de Cl_{50} de 4, 5 y 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente	(Shang <i>et. al.</i> , 2012)
Bifenilo	<i>Penicillium thomi</i>	<ul style="list-style-type: none"> •4',5-dihidroxi-2, 3-dimetoxi-4-(hidroxipropil)- bifenilo 	Mostró citotoxicidad contra diferentes líneas celulares (A549, HepG2 y HT29) y dio valores de Cl_{50} en el rango de 10,1, 12,2, 8,9 μM , respectivamente.	(Chen <i>et. al.</i> , 2007)
Derivados de α -pirona	<i>Aspergillus niger</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Nigerapironas A-E •Nigerapironas F-H •Asnipironas B y A 	Nigerapirona E mostró citotoxicidad frente a las líneas celulares SW1990, MDA-MB-231 y A549 con valores de Cl_{50} de 38, 48 y 43 μM , respectivamente, que presentaron mayor actividad que el control positivo, fluorouracilo. También mostró actividad débil o moderada contra las líneas celulares MCF-7, HepG2, Du145, NCI-H460 y MDA-MB-231, con valores de IC_{50} de 105, 86, 86, 43 y 48 μM , respectivamente.	(Lui <i>et. al.</i> , 2011)
α -pirona	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Rubasperona D-F •Rubasperona G •TMC 256 A1 •Rubrofusarina B •Fonsecina •Flvasasperona 	Rubasperona E mostró actividad inhibitoria frente a líneas celulares tumorales de MCF-7, MDA-MB-435, Hep3B, Huh7, SNB19 y U87 MG con valores de Cl_{50} comprendidos entre 19.92 y 47.98 μM .	(Huang <i>et. al.</i> , 2011)

3. HIPÓTESIS

El análisis multi-informativo de redes moleculares y ensayos de inhibición sobre la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B₍₁₋₄₀₀₎) sobre una colección de 66 extractos orgánicos de hongos saprótrofos y endófitos obtenidos de los manglares de Barra de Coyuca y Marquelia (Guerrero, México), permitirá seleccionar una especie fúngica para el descubrimiento o reposicionamiento de metabolitos secundarios inhibidores de la proteína.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Este proyecto de investigación tiene como objetivo contribuir al descubrimiento o reposicionamiento de metabolitos especializados que demuestren actividad inhibitoria frente a la proteína tirosina fosfatasa 1B y que puedan servir de inspiración para el desarrollo de agentes antidiabéticos bajo este mecanismo de acción y de manera adicional contribuir al conocimiento químico de las especies fúngicas de nuestro país.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el aislamiento axénico de una colección de hongos saprótrofos y endófitos a partir de muestras de la región de manglares de Guerrero mediante técnicas microbiológicas.
2. Obtener los extractos orgánicos en pequeña escala a partir de los aislamientos para evaluar su actividad frente a hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ empleando un ensayo *in vitro* y análisis de redes moleculares construidas a partir de datos de HRESIMS².
3. Seleccionar la especie candidata con base en el porcentaje inhibitorio sobre hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ y los resultados de desreplicación para su estudio químico y escalar el extracto orgánico para realizar su estudio químico biodirigido.
4. Fraccionar el extracto en mediana escala empleando cromatografía flash, analizar las fracciones obtenidas por CLAE y determinar su potencial inhibitorio frente a hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ para priorizar el análisis de aquellas con metabolitos de interés.
5. Separar por CLAE semipreparativo las fracciones seleccionadas para obtener compuestos puros y caracterizar su estructura empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
6. Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los compuestos puros por medio de un ensayo de microdilución en placa.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Obtención de muestras para el aislamiento fúngico

Los organismos fúngicos objeto de estudio fueron aislados a partir de muestras recolectadas en las regiones de Marquelia (16° 35' 03"N, 98° 48' 40" O) y Barra de Coyuca (16° 56' 46"N, 100° 05' 17"O) (**Figura 7**), ambos poblados pertenecientes al estado de Guerrero. Esta actividad fue desarrollada por los Drs. José Rivera Chávez y Verenice Merlín Lucas, con ello se obtuvieron un total de 9 muestras de sedimento y 7 de hojas (**Tabla 1**).



Figura 7. Ubicación geográfica de los sitios de recolección de muestra.

5.2. Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos

5.2.1 A partir de sedimento

Para las muestras de sedimento se aplicó la técnica de dilución, la cual consistió en pesar aproximadamente 1g de muestra de sedimento y suspenderla en 9 mL de agua destilada estéril. De esta disolución se prepararon cuatro diluciones seriadas correspondientes a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} g/mL de concentración. De las dos diluciones con concentración de 10^{-2} y 10^{-3} se tomaron 500 μ L y se distribuyeron en distintas cajas Petri de 10 cm de diámetro que contenían Agar Papa Dextrosa (APD) suplementado con gentamicina a 150 mg/L.

Se esperaba que el crecimiento fúngico fuera evidente a temperatura ambiente, pero al no observar crecimiento con el paso de los días las cajas se incubaron a 30°C. De las colonias que se desarrollaron se hicieron resiembras hasta obtener cultivos axénicos.

5.2.2 A partir de hojas

Para las muestras de hojas, cada muestra se sometió a un proceso de limpieza el cual consistió en obtener fragmentos de la hoja de aproximadamente 3 mm × 3 mm en condiciones de esterilidad. Estos se sumergieron consecutivamente en agua estéril durante 1 minuto, en etanol al 70% durante 1 minuto, en agua estéril durante 1 minuto, en una solución de hipoclorito de sodio 1:1 durante 30 segundos y finalmente en agua estéril por 1 minuto. Los fragmentos vegetales se secaron con gasa estéril por aproximadamente 30 minutos en condiciones asépticas.



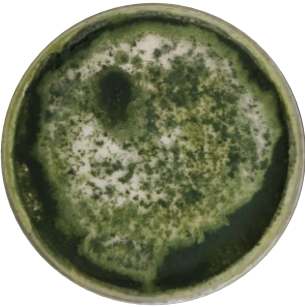

Estos fragmentos se colocaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro con Agar Papa Dextrosa (APD) suplementado con gentamicina a 150 mg/L y se incubaron a temperatura ambiente. A partir del crecimiento fúngico observado, se hicieron resiembras hasta obtener cultivos axénicos.

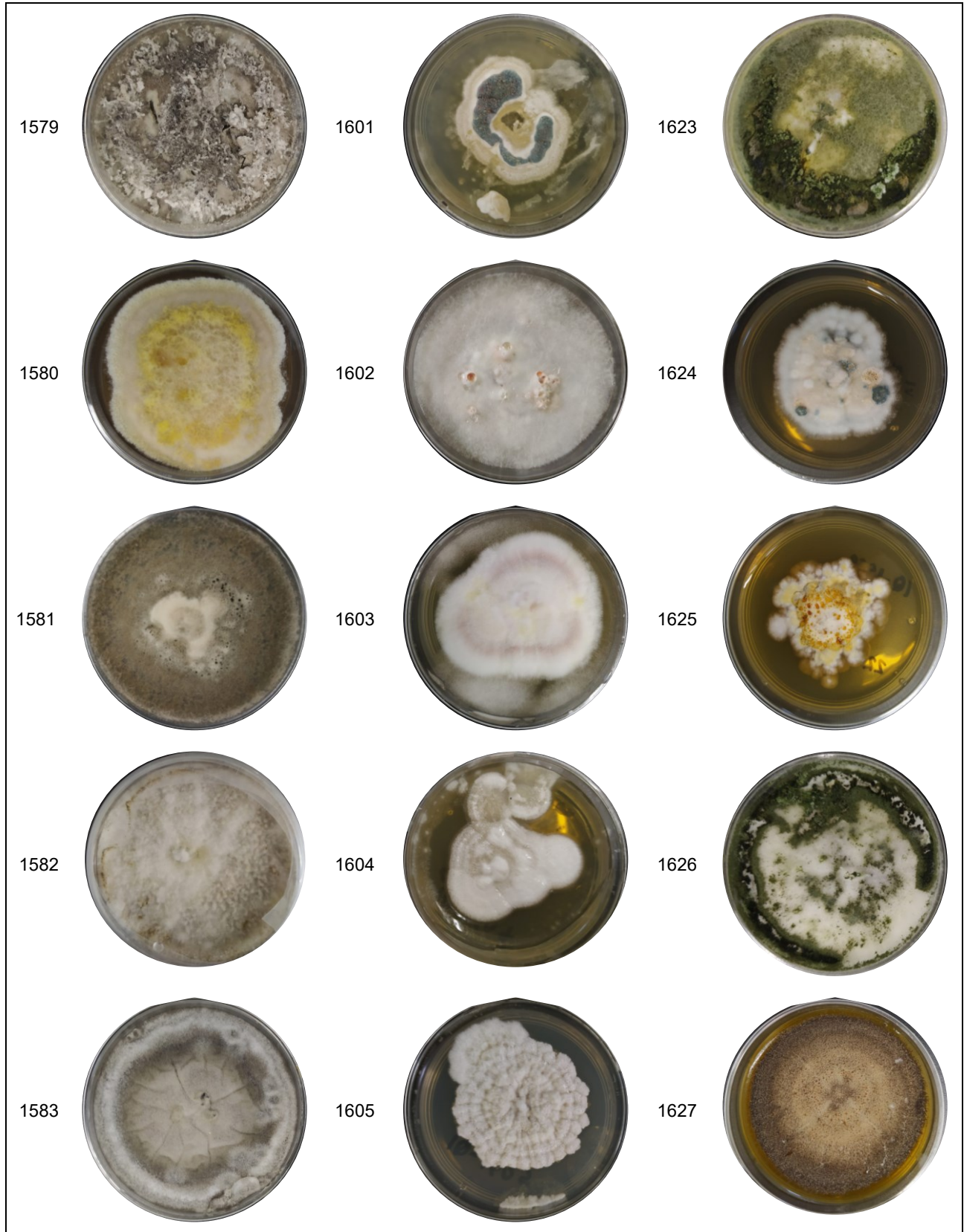
Estas operaciones dieron un total de 66 hongos axénicos, 20 de ellos aislados de muestras tanto de sedimento como de hojas provenientes de Barra de Coyuca y 46 provenientes de la región de Marquelia. Las características de los aislamientos se resumen en la **Tabla 2**.

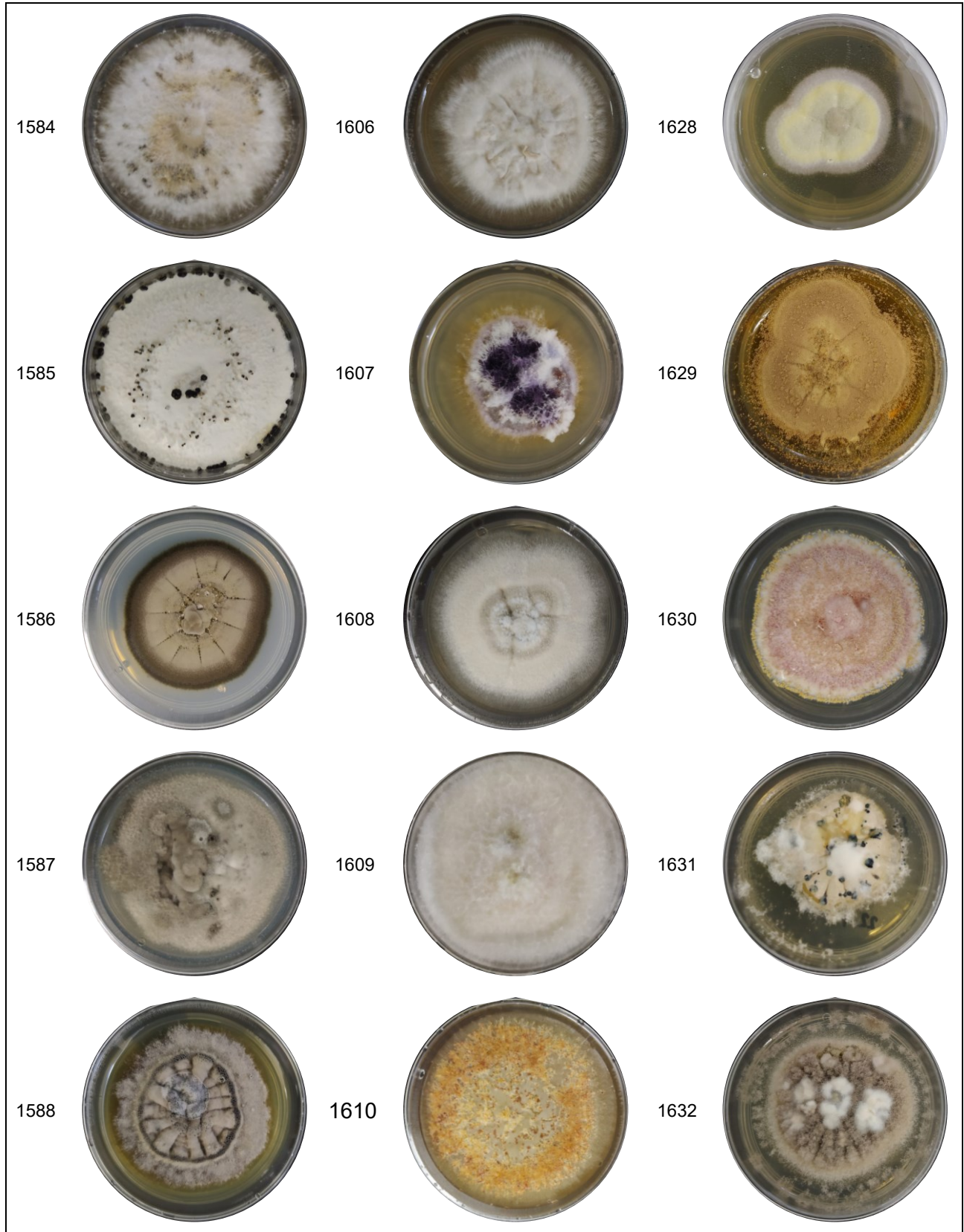
Tabla 2. Muestreo de diferentes regiones para la obtención de hongos axénicos.					
Código de muestra	Fecha	Lugar	Tipo de material vegetal	Recolector	Hongos aislados
M1001-033-1	22-08-22	Playa la Bocana Marquelia, Gro.	Sedimento sin Lancha Mangle Rojo	VIML	IQ-1617 IQ-1618, IQ-1619, IQ-1620, IQ-1600
M1001-033-2	22-08-22	Playa la Bocana Marquelia, Gro.	Suelo con Lancha Mangle Rojo	VIML	IQ-1621, IQ-1622, IQ-1623, IQ-1624, IQ-1597
M1001-033-3	22-08-22	Playa la Bocana Marquelia, Gro.	Sedimento con Lancha Mangle Rojo	VIML	IQ-1613
M1001-033-4	23-08-22	Barra de Coyuca	Suelo. Candelilla	JARC	IQ-1625, IQ-1626, IQ-1627, IQ-1628, IQ-1629, IQ-1601, IQ-1602
M1001-033-5	23-08-22	Barra de Coyuca	Suelo. Botoncillo	JARC	IQ-1630
M1001-033-6	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Suelo. Mangle Rojo.	VIML	IQ-1631, IQ-1632, IQ-1633, IQ-1634, IQ-1598, IQ-1603, IQ-1604, IQ-1612
M1001-033-7	22-08-22	Barra Tila Marquelia, Gro.	Hoja seca	VIML	IQ-1635, IQ-1636, IQ-1637, IQ-1638, IQ-1593, IQ-1606, IQ-1606, IQ-1607
M1001-033-8	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Cangrejero	VIML	IQ-1639, IQ-1640, IQ-1641, IQ-1642, IQ-1577, IQ-1599
M1001-033-9	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Termitero	VIML	IQ-1578, IQ-1608, IQ-1609

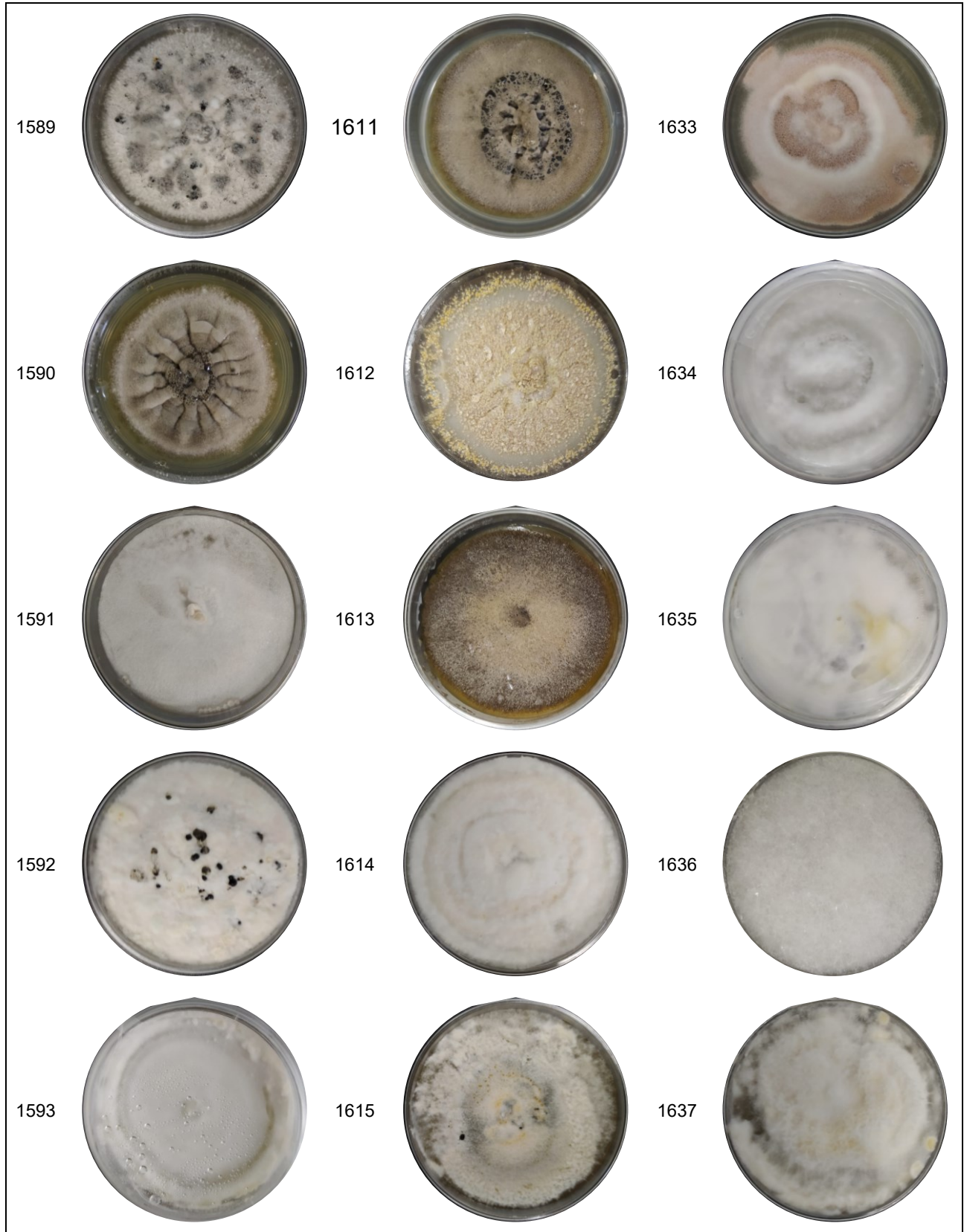
M1001-033-10	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Hoja con hongos	VIML	IQ-1614, IQ-1615, IQ-1579, IQ-1580
M1001-033-11	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Hojas. Mangle Rojo	VIML	IQ-1596
M1001-033-12	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Hojas sin hongos	VIML	IQ-1581, IQ-1582, IQ-1583, IQ-1584
M1001-033-13	23-08-22	Barra de Coyuca	Hoja sana Mangle Bobo	VIML	IQ-1585, IQ-1586, IQ-1587, IQ-1595, IQ-1610
M1001-033-14	23-08-22	Barra de Coyuca	Hoja y botón. Mangle Bobo	JARC	IQ-1588, IQ-1589, IQ-1590, IQ-1591
M1001-033-15	23-08-22	Barra de Coyuca	Botoncillo con huevecillos	JARC	IQ-1616, IQ-1611, IQ-1594
M1001-033-16	22-08-22	Barra de Tila Marquelia, Gro.	Hojas Mangle rojo	VIML	IQ-1592

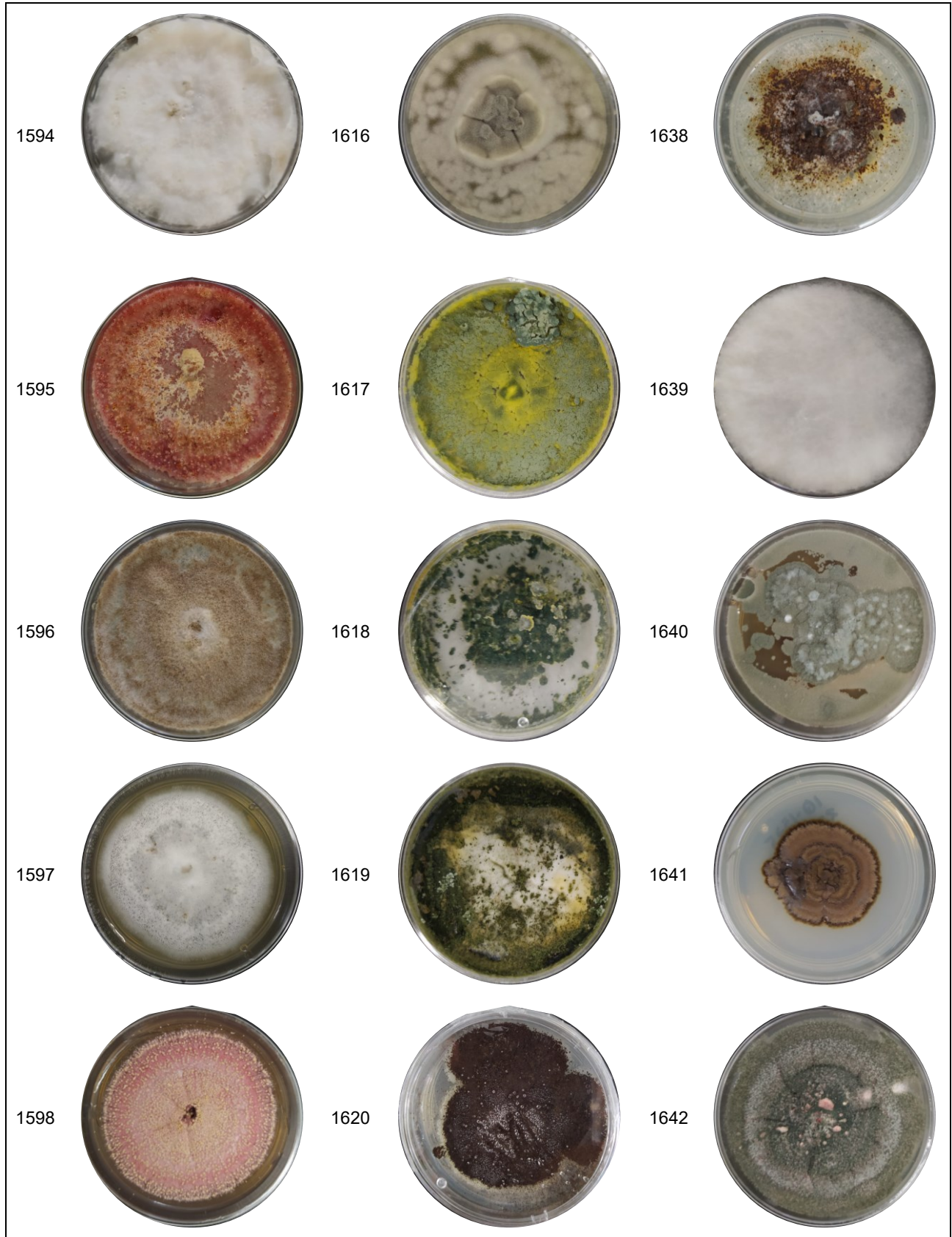
A continuación, se muestra la diversidad de morfologías dentro de la colección de hongos obtenida:

Tabla 3. Colección de hongos axénicos (IQ-1577 a IQ-1642).					
Clave	Imagen	Clave	Imagen	Clave	Imagen
1577		1599		1621	
1578		1600		1622	









5.3. Obtención de los extractos orgánicos (pequeña escala)

De forma individual, cada hongo axénico se sembró en 5 mL de Caldo Papa Dextrosa (CPD) e incubó a temperatura ambiente con agitación constante por un periodo de 7 días.



Figura 8. Ejemplo de crecimiento fúngico a pequeña escala

Una vez cumplido este tiempo, el inóculo se vertió en 3 g de cereal Cheerios® en matraces Erlenmeyer de 50 mL previamente esterilizados, incubó a temperatura ambiente con agitación constante durante 3 semanas (**Figura 8**). Posteriormente, el medio de cultivo se encontró consumido por el hongo y se inició con el proceso de extracción (**Figura 9**), para ello se realizó un proceso de maceración con 30 mL de una mezcla de disolventes conformada por CH_2Cl_2 -AcOEt- Me_2CO -MeOH (1:1:1:1) por 24 horas. Finalmente se realizó una filtración rápida para remover la biomasa con lavados de 10 mL de la mezcla y el extracto resultante se concentró a presión reducida para obtener así el extracto total de cada organismo de la colección (**Tabla 4**).

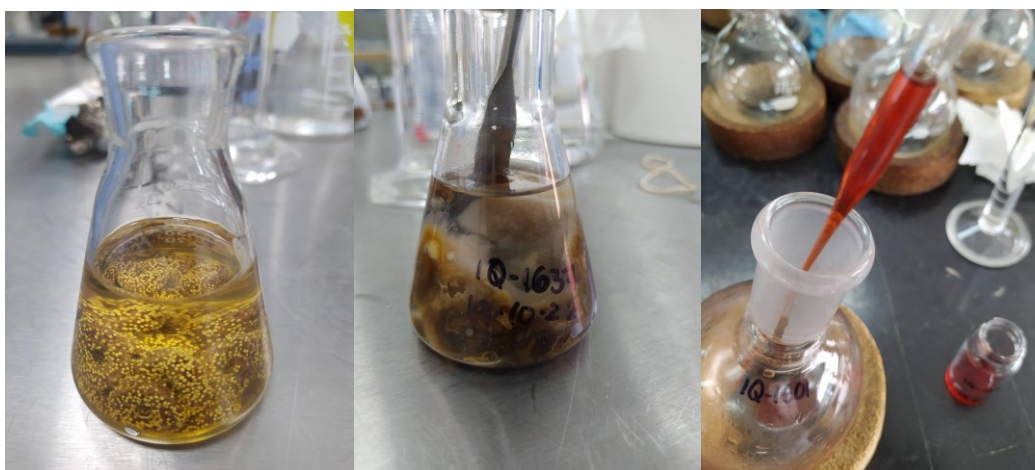


Figura 9. Ejemplos del proceso de extracción a pequeña escala.

A continuación (**Tabla 4**) se muestran el rendimiento obtenido de los extractos de cada hongo cultivado en pequeña escala en cereal Cheerios® extraídos con una mezcla cuaternaria de disolventes conformada por CH₂Cl₂-AcOEt-Me₂CO-MeOH (1:1:1:1).

Tabla 4. Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos.					
Clave del Hongo	Rendimiento (mg)	Clave del Hongo	Rendimiento (mg)	Clave del Hongo	Rendimiento (mg)
IQ-1577	316.5	IQ-1599	265.8	IQ-1621	567.7
IQ-1578	400.2	IQ-1600	196.6	IQ-1622	167.8
IQ-1579	111.0	IQ-1601	248.6	IQ-1623	359.4
IQ-1580	155.5	IQ-1602	224.5	IQ-1624	218.0
IQ-1581	425.0	IQ-1603	155.9	IQ-1625	273.7
IQ-1582	330.7	IQ-1604	220.0	IQ-1626	326.8
IQ-1583	453.8	IQ-1605	126.6	IQ-1627	170.4
IQ-1584	190.5	IQ-1606	236.8	IQ-1628	198.8
IQ-1585	147.2	IQ-1607	271.6	IQ-1629	447.3
IQ-1586	200.1	IQ-1608	190.1	IQ-1630	285.1
IQ-1587	134.3	IQ-1609	250.1	IQ-1631	192.7
IQ-1588	156.7	IQ-1610	167.7	IQ-1632	250.1
IQ-1589	228.7	IQ-1611	170.3	IQ-1633	207.1
IQ-1590	136.4	IQ-1612	267.4	IQ-1634	447.2
IQ-1591	349.0	IQ-1613	217.2	IQ-1635	81.6
IQ-1592	166.1	IQ-1614	242.0	IQ-1636	476.7
IQ-1593	80.3	IQ-1615	159.8	IQ-1637	79.6
IQ-1594	160.6	IQ-1616	158.3	IQ-1638	236.0
IQ-1595	131.4	IQ-1617	173.8	IQ-1639	318.8
IQ-1596	266.5	IQ-1618	321.0	IQ-1640	347.9
IQ-1597	253.3	IQ-1619	284.8	IQ-1641	112.9
IQ-1598	353.9	IQ-1620	272.3	IQ-1642	271.8

5.3.1 Obtención del extracto orgánico del hongo IQ-1620 (mediana escala)

El extracto orgánico se obtuvo empleando el mismo procedimiento descrito en el inciso anterior, a partir de 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 12 g de cereal Cheerios® cada uno. La extracción se realizó con la mezcla cuaternaria CH₂Cl₂-AcOEt-Me₂CO-MeOH (1:1:1:1), posteriormente el extracto total se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) y se sometió a una serie de repartos con agua, recuperando la fase orgánica y a un desgrase con Hexano-MeCN-MeOH (2:1:1).

5.4 Ensayos de Actividad Biológica

5.4.1. Viabilidad de la enzima hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎.

El ensayo consistió en medir la absorbancia ($\lambda = 405 \text{ nm}$) a 37°C con 6 volúmenes diferentes de enzima hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ (3 μM) por cada pozo (0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL) únicamente en presencia de solución amortiguadora (50 mM HEPES, pH 6.8, 100 mM NaCl y 1.5 mM DTT) y sustrato (30 mM fosfato de *p*-nitrofenilo; *p*-NPP) en un volumen de 100 μL por pozo. La actividad enzimática se consideró viable cuando la lectura de absorbancia a los 20 minutos se encontró en el intervalo de 0.5-1.0 A.

5.4.2 Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de los extractos sobre hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎.

Para la evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ de extractos, fracciones y compuestos puros, se utilizó un método enzimático *in vitro*.

Para ello, se emplearon placas de 96 pozos y un lector de placas Cytation 5® (Biotek) ($\lambda = 405 \text{ nm}$) a 37 °C, con el programa Gen 5311, empleando una solución de la enzima hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ y una solución de sustrato *p*-NPP en solución amortiguadora. Para cada extracto se prepararon soluciones stock en DMSO a 500 ppm, adicionando a cada pozo alícuotas de 4 μL . Las evaluaciones se realizaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad. A continuación, se incubaron por 10 minutos con 5 μL de la solución enzimática de hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ (3 μM) en un volumen total de 90 μL . Posterior a la incubación, se adicionaron 10 μL de la solución de sustrato y se registró la primera lectura de absorbancia ($t = 0 \text{ min}$). Después, la mezcla de reacción se incubó por un periodo de 20 minutos a 37 °C ($t = 20 \text{ min.}$).

Los porcentajes de inhibición enzimática se calcularon tomando en cuenta la corrección por la absorbancia del blanco (enzima sin inhibidor) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición } hPTP1B_{(1-400)} = \left(1 - \frac{A_{405e}}{A_{405C}}\right) \times 100$$

Ecuación 1

Donde $A_{405}e$ representa la absorbancia corregida del extracto $A_{405}e = A_{405}e_{t=20} - A_{405}e_{t=0}$ y $A_{405}C$ la absorbancia corregida del blanco $A_{405}C = A_{405}Blanco_{t=20} - A_{405}Blanco_{t=0}$

5.5 Análisis metabolómico

Los análisis de masas de alta resolución (HRESIMS²) se obtuvieron empleando un sistema acoplado de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas por cuádruplo simple y tiempo de vuelo (HPLC-EM-SQ-TOF) (Modelo G6530BA) Agilent Tech. empleando una columna Gemini NX C₁₈ (3 μm, 2.1 × 100 mm) y un gradiente lineal de 15% de CH₃CN y 85% de ácido fórmico acuoso al 0.1% hasta 100% de MeCN en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 2.5 min y regresando a las condiciones iniciales por 0.5 min, a 0.5 mL/min. Estos análisis fueron realizados por el M. en C. Everardo Tapia Mendoza (LANCIC-IQ, UNAM).

Los archivos crudos de masas de alta resolución de cada extracto analizado (formato .d) se convirtieron al formato mzML empleando el software de ProteoWizard MsConvert (versión 3.0.22326). Todos los archivos convertidos se cargaron en el servidor web Global Natural Products Social (GNPS; gnps.ucsd.edu) empleando el programa FTP Server versión 5.21.5 (Microsoft Windows) y analizados empleando el flujo de trabajo publicado por Aron y colaboradores (Aron *et. al.*, 2020). Los datos de entrada se filtraron eliminando todos los iones fragmento dentro de un rango de +/- 17 Da del *m/z* precursor. La tolerancia de masa del ion precursor se fijó en 0.01 Da y la tolerancia del ion fragmento MS/MS en 0.02 Da. Se creó una red en la que se filtraron las aristas para que tuvieran un puntaje de coseno superior a 0.7 y más de 6 picos alineados. Además, las aristas entre dos nodos se mantuvieron en la red si y sólo si cada uno de los nodos aparecía en los 10 nodos más similares entre sí. Por último, el tamaño de una familia molecular se fijó en un máximo de 100 nodos y las aristas con menor puntaje de coseno se eliminaron de las familias moleculares hasta que el tamaño de la familia molecular se situó por debajo de este umbral. Consecutivamente, se buscaron los espectros en la red en las bibliotecas espectrales de GNPS. Los espectros de la biblioteca se filtraron del mismo modo que los datos de entrada. Esta colección fue filtrada de la misma forma que los datos de entrada.

5.5. Identificación de la especie fúngica

Este experimento se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez de la Universidad Autónoma Metropolitana. La clasificación taxonómica del organismo fúngico seleccionado se llevó a cabo mediante el análisis de las características moleculares del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal.

La extracción de DNA se llevó a cabo en condiciones estériles a partir de un cultivo axénico de cuatro días de crecimiento en medio sólido (agar APD), tomando de éste la mayor cantidad de biomasa posible sin agar (hifas o esporas) y depositándolo en tubos de microcentrifuga junto con 200 mg perlas de vidrio y 200 μL de solución de lisis (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%, Tritón X-100 2%). Posteriormente se agregaron 200 μL de fase orgánica de una solución conformada por fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

(25:24:1). Asegurándose de que la mezcla se encuentre homogénea dieron choques térmicos a temperaturas de -70°C y 60°C en repetidas ocasiones. La muestra se centrifugó para obtener la fase acuosa, a la cual se le añadieron 200 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó para recuperar la fase acuosa a la cual se le agregó 1 mL de isopropanol para la precipitación del DNA. Por último, la muestra se sometió a lavados secuenciales con 1 mL de etanol absoluto y 1 mL de etanol al 70%, decantando entre cada adición, para preservar el precipitado final en 50 µL de agua desionizada.

El proceso de identificación 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'). 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 MgCl₂, 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-1620 se comparó con la biblioteca GenBank utilizando la búsqueda tipo BLAST. Se obtuvo una colección de secuencias taxonómicamente relacionadas del National Center for Biotechnology Information Taxonomy Browser. Posteriormente, las secuencias de ADN se alinearon utilizando el programa CLUSTAL X, se editaron y confirmaron visualmente en BIOEDIT. Se realizaron análisis de máxima verosimilitud utilizando PhyML.

5.6. Procedimientos cromatográficos generales

El estudio químico de los extractos orgánicos fúngicos se realizó empleando técnicas cromatográficas, principalmente de tipo Flash para el fraccionamiento primario y de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para la separación de productos.

Para la cromatografía Flash se utilizaron como fases estacionarias columnas de gel de sílice (fase normal) y Sephadex LH-20 (exclusión molecular), empleando como fases móviles gradientes de polaridad creciente (hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH) o mezclas binarias isocráticas (Me₂CO: MeOH; 8:2), respectivamente en un cromatógrafo Buchi® equipado con los detectores de arreglo de fotodiodos (PDA; barrido entre 190 y 500 nm).

Los análisis por CLAE (analítica, semipreparativa y preparativa) se realizaron en un cromatógrafo Waters® equipado con un detector de UV de arreglo de fotodiodos (PDA-2998) acoplado a un detector de dispersión de luz tras evaporación (ELSD-2424). Para los análisis se utilizó como fase estacionaria una columna Phenomenex® (Gemini C₁₈, 5µm, 4.6 × 250 mm) y para el aislamiento de los compuestos se utilizó como fase estacionaria

una columna Phenomenex® (Gemini C₁₈, 5 µm, 10.0 × 250 mm), mientras que las fases móviles consistían en mezclas binarias de MeCN, y agua con H₂CO₂ al 0.1% empleando diferentes sistemas de tipo gradiente o isocrático. Las velocidades de flujo de la fase móvil utilizadas fueron de 1 mL/min (analítico), 4.7 mL/min (semipreparativo). La adquisición y manejo de los datos se realizó en el software Empower 3.

5.7. Caracterización estructural

La caracterización estructural de los productos aislados se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) mono- y bidimensionales se registraron en los equipos de Bruker Avance III a 400 MHz (¹H) y 100 MHz (¹³C), utilizando CDCl₃, Me₂CO-*d*₆ o CD₃OD como disolventes.

Los espectros de masa se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) en un espectrómetro de masas Jeol JMS-T100LC AccuTOF y/o por *Jet Stream Technology* empleando un equipo Q-TOF (modelo G6530BA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo de investigación se presentan en dos grandes secciones, en primer lugar, la selección del microorganismo de estudio con base en los resultados de inhibición enzimática frente a $hPTP1B_{(1-400)}$ y desreplicación de metabolitos a través de estudios de metabolómica no dirigida utilizando datos de cromatografía de líquidos acoplada a masas organizados en redes moleculares, y, en segundo lugar, el estudio químico de la especie seleccionada y la evaluación de los metabolitos aislados en los ensayos pertinentes.

6.1 Evaluación del potencial inhibitorio de los extractos orgánicos sobre $hPTP1B_{(1-400)}$.

En la **Figura 10** se muestran los resultados del porcentaje de inhibición obtenidos de cada extracto orgánico. En este ensayo se utilizó el producto natural Duclauxina como control positivo debido a que, en trabajos anteriores del grupo de investigación, presentó una CI_{50} de $12.7 \pm 0.5 \mu M$ contra la enzima $hPTP1B_{(1-400)}$. (Jimenez-Arreola, *et. al.*, 2020).

Con base en los resultados obtenidos, se encontró que el 69.7 % de los hongos evaluados contra $hPTP1B_{(1-400)}$ mostraron una inhibición mayor al cero por ciento, mientras que el 18.19% fue mayor al 50 % (**Figura 11**). Estos resultados evidencian que dentro de la colección de hongos hay ejemplares con gran potencial de inhibición los cuales podrían ser sujetos de estudios químicos posteriores.

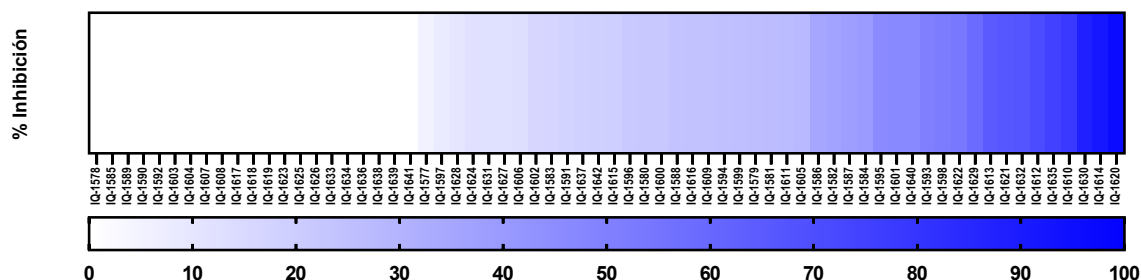


Figura 10. Resultados de inhibición de $hPTP1B_{(1-400)}$ (Colección completa).

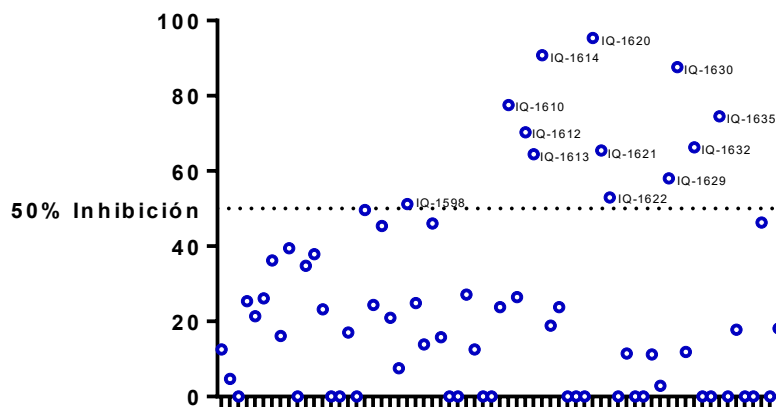


Figura 11. Compendio de extractos con mayor actividad inhibitoria sobre $hPTP1B_{(1-400)}$.

6.3 Análisis por redes moleculares de los extractos orgánicos.

Los extractos orgánicos obtenidos de los 66 taxa fúngicos (claves IQ-1577 a IQ-1642) fueron analizados por HPLC-HRESIMS² con el propósito de estudiar los perfiles metabólicos presentes en la colección. Para ello, se utilizó la plataforma GNPS para la construcción de redes moleculares. El archivo de metadata fue alimentado por la variable de actividad biológica categorizada (porcentaje de inhibición de *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎) para generar una representación gráfica de los nodos presentes en los extractos activos (**Figura 12**).

Esta red se conformó por 1289 nodos y 148 clústeres (más de dos nodos por clúster). El análisis detallado de la red denotó que no existían clústeres de mayor tamaño donde se localizaran nodos que únicamente estén presentes en los extractos más activos. Por el contrario, la composición de los clústeres más grandes es bastante diversa, siendo construidos a partir de nodos presentes en extractos con diferentes rangos de actividad.

Para el análisis de la naturaleza química en la colección de extractos y tener una idea de que metabolitos se encuentran presentes, se incorporó la información provista de las anotaciones *in silico* de GNPS Library Search y Dereplicator+ utilizando el flujo de trabajo GNPS MolNetEnhancer (Ernst *et. al.*, 2019). Las anotaciones de clases químicas se realizaron utilizando la ontología química ClassyFire (**Figura 13**), y empleando para su representación gráfica la categoría CF_class, observando así una alta diversidad de familias de compuestos, por ejemplo: benzopiranos, citocalasanos, derivados de indoles, isocumarinas, isoquinolinas, ochratoxinas y quinolinas, naftopiranos, naftofuranos, peptidomiméticos, entre otros.

De esta manera, se desreplicaron una serie de productos de origen fúngico dentro de la colección de extractos (**Tabla 5**) y se pudo comprobar que el organismo IQ-1620 es una especie candidata potencial para su estudio químico, debido a que su extracto fue el que mostró la mayor actividad, inhibiendo a la proteína en un 95.35% a una concentración de 20 ppm, y sólo se encontró por desreplicación el metabolito Fonsecaina (**J**), además de que la mayoría de los nodos (destacados con verde en la **Figura 12**) se encontraban aislados y no pudieron ser clasificados dentro de una familia estructural, por lo que resultó de interés su estudio a fondo.

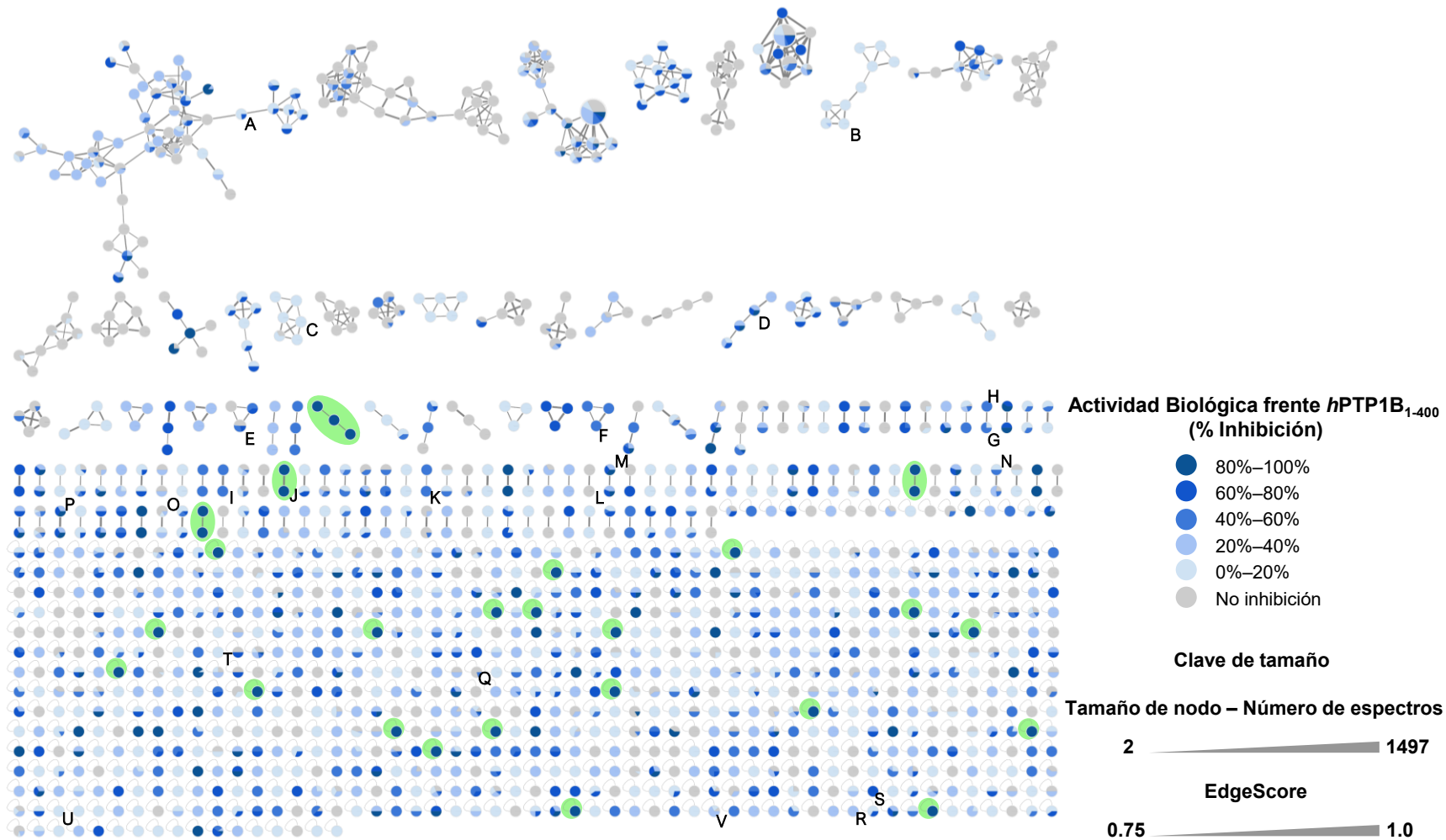


Figura 12. Red molecular generada a partir de la colección de extractos fúngicos. Se encuentran resaltados en color verde los nodos correspondientes al extracto IQ-1620.

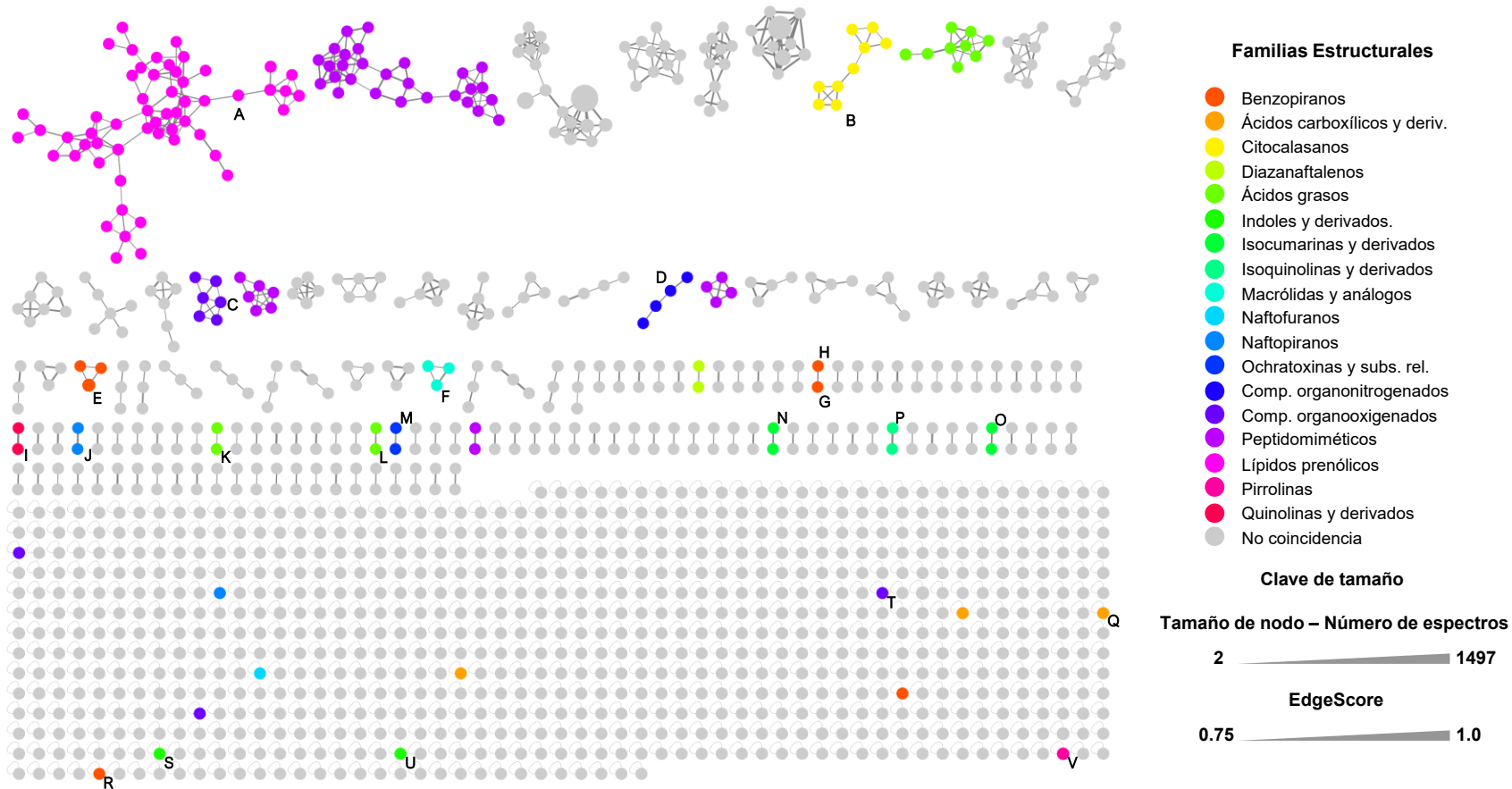
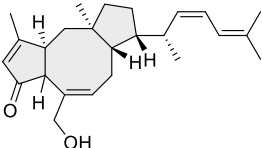
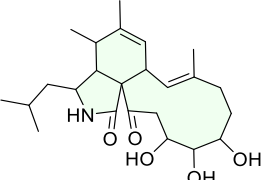
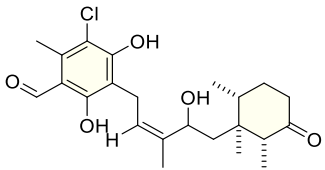
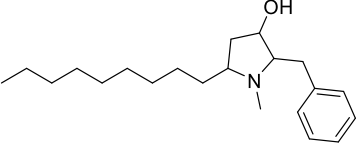
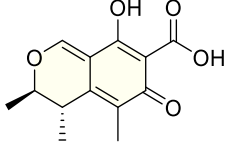
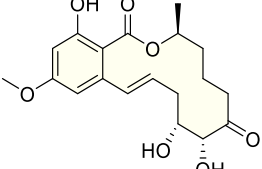
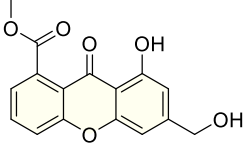
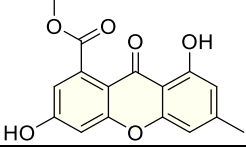
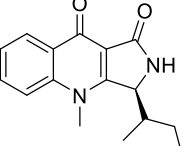
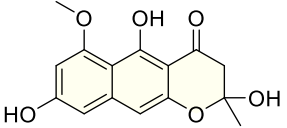
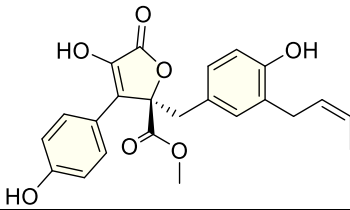
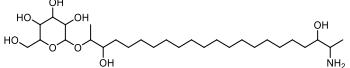
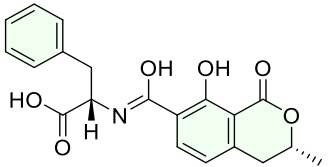
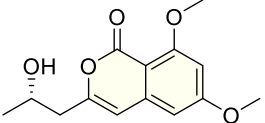
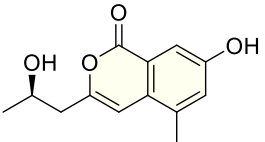
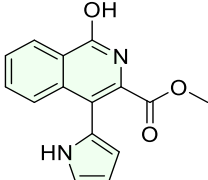
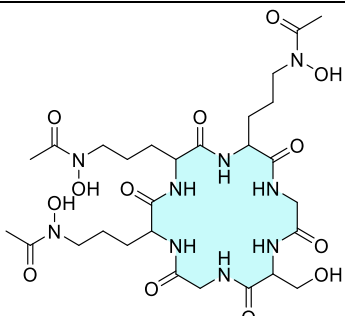
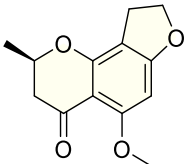
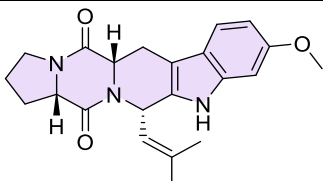
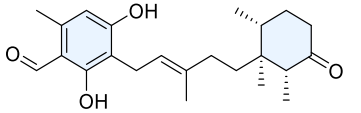
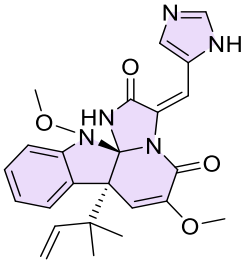
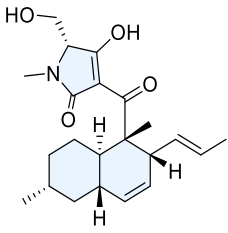


Figura 13. Análisis por MolNetEnhancer generado a partir de la colección de extractos fúngicos.

Tabla 5. Ejemplos representativos de compuestos de origen fúngico encontrados mediante el análisis de redes moleculares.

Clave	Nombre del compuesto	Estructura	Masa del precursor observada (m/z)	Aducto	Extracto donde fue observado
A	(6a)-21,21-O-dihydrofiobolina G		351.292	$[M-H_2O+H]^+$	IQ-1613 IQ-1628 IQ-1627
B	Aspocalasina E		420.291	$[M+H]^+$	IQ-1577
C	4'-hidroxi-5'-hidroascoclorina		405.201	$[M-H_2O+H]^+$	IQ-1591 IQ-1602
D	Preusina		318.304	$[M+H]^+$	IQ-1599 IQ-1614 IQ-1612
E	Citrinina		251.122	$[M+H]^+$	IQ-1625 IQ-1623 IQ-1621 IQ-1642 IQ-1629 IQ-1640 IQ-1622 IQ-1641
F	LL-Z 1640-1 (derivado de Zearalenona)		365.181	$[M+H]^+$	IQ-1622
G	Sydowinina A		317.091	$[M+H]^+$	IQ-1615 IQ-1598 IQ-1640
H	4-hidroxivertixantona		301.098	$[M+H]^+$	IQ-1640
I	Quinolactacina A		271.173	$[M+H]^+$	IQ-1640

J	Fonsecina		291.115	[M+H] ⁺	IQ-1620
K	Butirolactona I		425.178	[M+H] ⁺	IQ-1629
L	Glicolípido microbiano		564.449	[M+H] ⁺	IQ-1589
M	Ocratoxina A		370.150	[M+H] ⁺	IQ-1599 IQ-1614 IQ-1612
N	(10S)-8-metoxidiaportina		265.136	[M+H] ⁺	IQ-1582 IQ-1590 IQ-1588 IQ-1629 IQ-1611 IQ-1642 IQ-1601
O	7-hidroxi-3-(2-hidroxi-propil)-5-metil-isocromen-1-ona		235.126	[M+H] ⁺	IQ-1580 IQ-1619 IQ-1624 IQ-1623
P	Marinamida		269.120	[M+H] ⁺	IQ-1599 IQ-1614 IQ-1612
Q	Deferriferricrocina		771.226	[M+H] ⁺	IQ-1604 IQ-1622 IQ-1633 IQ-1589 IQ-1592
R	LL-D 253y		193.119	[M+H] ⁺	IQ-1582
S	12α-Fumitremorgina C		380.218	[M+H] ⁺	IQ-1621

T	Desclor-12,13-dihidroascoclorina		373.259	[M+H] ⁺	IQ-1591 IQ-1602
U	Oxalina		448.213	[M+H] ⁺	IQ-1624
V	Equisetina		374.257	[M+H] ⁺	IQ-1581 IQ-1586 IQ-1584 IQ-1582 IQ-1637 IQ-1587 IQ-1639 IQ-1580 IQ-1585 IQ-1583 IQ-1638

6.4 Estudio químico de la especie fúngica IQ-1620

6.4.1 Identificación taxonómica de la especie fúngica IQ-1620

La secuencia de las regiones ITS del aislado fúngico IQ-1620 se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso MW561669. Finalmente, se determinó que el hongo IQ-1620 pertenece al género *Aspergillus*. 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.

6.4.2 Comparación de los extractos en pequeña y mediana escala

De acuerdo con la alta actividad biológica contra la enzima *hPTP1B*₍₁₋₄₀₀₎ mostrada por el extracto de *Aspergillus* sp. IQ-1620, se registró el perfil cromatográfico del cultivo en pequeña escala y de aquel obtenido del escalamiento, mostrando alta similitud entre ellos. Ambos procedimientos se realizaron por CLAE analítica, empleando un sistema de gradiente 20:80 a 100:0 de MeCN:agua ácida (H₂CO₂ 0.1%) en 30 min (**Figura 14**). Con base en estos resultados y los obtenidos del estudio de metabolómica no dirigida por redes moleculares, se seleccionó al taxón IQ-1620 para su estudio químico.

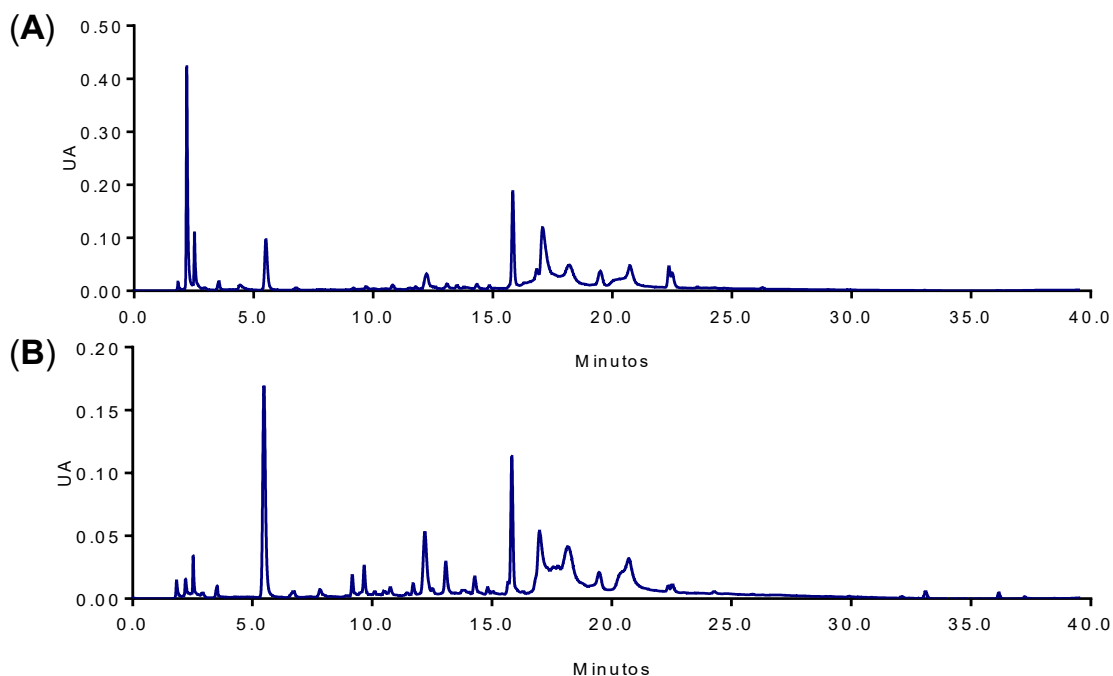


Figura 14. Perfil cromatográfico por CLAE analítico del extracto a pequeña escala **(A)** y del extracto a mediana escala **(B)**; PDA λ 254 nm.

6.5 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *Aspergillus* sp. IQ-1620

El extracto orgánico resultante del escalamiento a mediana escala de *Aspergillus* sp. IQ-1620 (1.71 g) se sometió a un fraccionamiento primario empleando cromatografía Flash en fase normal, utilizando como fase estacionaria una columna de 40 g de gel de sílice (SiO_2) desactivada al 10% con H_2O y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre CH_2Cl_2 -AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 25 mL y generando 10 fracciones primarias (**Tabla 6**), reunidas por la señal cromatográfica observada.

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>Aspergillus</i> sp. IQ-1620					
Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-9	I	3.8	26	VIII	22.5
10	II	5.2	27 - 30	IX	197.9
11	III	5.3	33 - 36	X	131
12 - 13	IV	86.3	Peso inicial (g)		1.7160
14 - 16	V	84.0	Total recuperado (mg)		1.0857
17 - 22	VI	143.7	% Recuperado		63.26
23 - 25	VII	406.0			

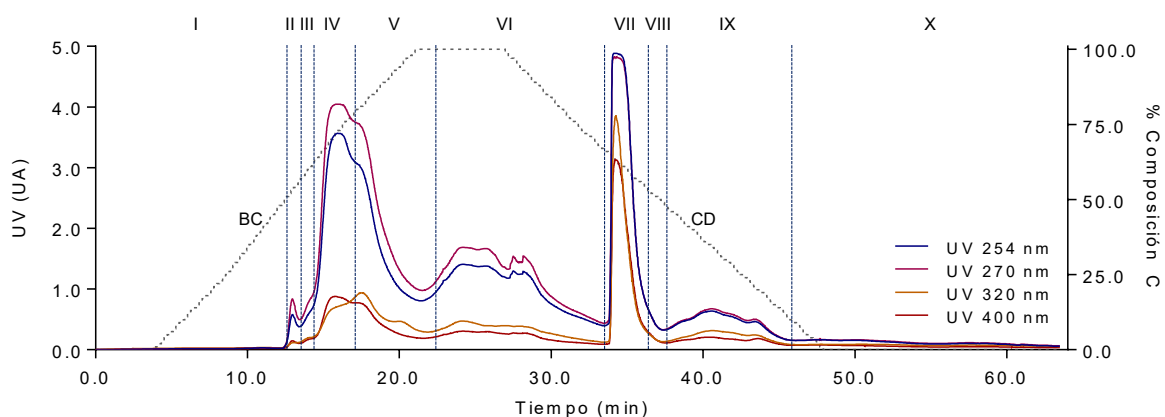


Figura 15. Cromatograma del fraccionamiento primario de *Aspergillus* sp. IQ-1620. Las líneas de colores representan las señales de los posibles analitos a diferentes longitudes de onda. BC es el gradiente entre CH_2Cl_2 -AcOEt mientras que CD es el gradiente de AcOEt-MeOH.

6.5.1 Evaluación del potencial inhibitorio sobre $h\text{PTP1B}_{(1-400)}$ de las fracciones primarias.

Con la finalidad de realizar un estudio biodirigido, se evaluó el efecto inhibitorio de las fracciones con mayores rendimientos obtenidas (IV a X) sobre la actividad de $h\text{PTP1B}_{(1-400)}$ a 20 ppm, encontrando porcentajes de inhibición mayores al 70% en las fracciones VII y VIII, como se muestra a continuación (**Figura 16**):

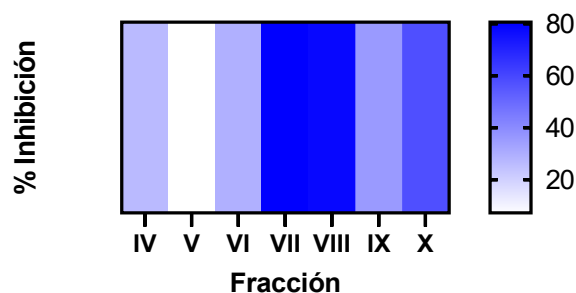


Figura 16. Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias.

6.5.2 Separación por CLAE de la fracción IV y obtención de los productos 1–3.

Las 10 fracciones obtenidas también fueron analizadas por CLAE, mostrando perfiles complejos en cada una de ellas. La fracción IV mostró señales más resueltas y un rendimiento considerable (86.3 mg), por ello, se decidió separar los metabolitos presentes en esta fracción.

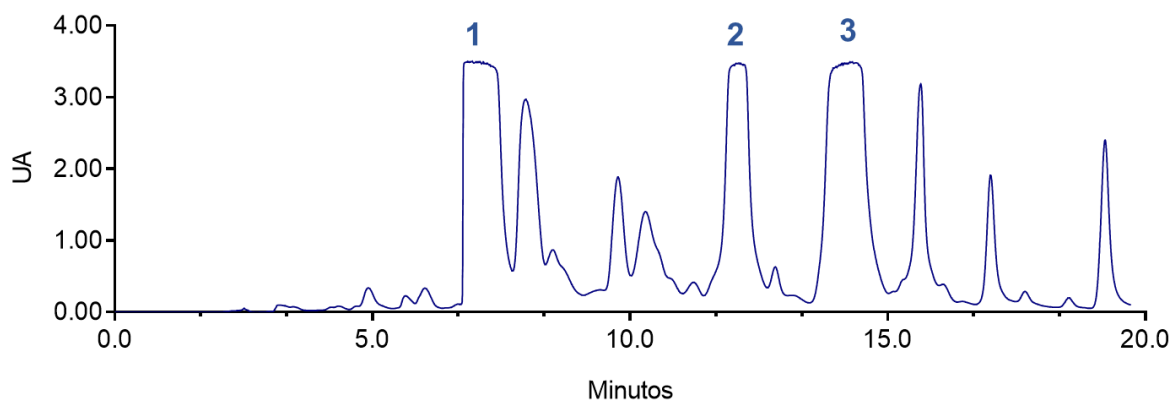


Figura 17. Cromatograma de la separación por CLAE preparativa de la fracción IV; PDA λ 254 nm.

El fraccionamiento de aproximadamente 40 mg de IV se realizó por CLAE semipreparativa, utilizando un sistema optimizado en gradiente de 40:60 a 100:0 de MeCN:agua ácida (H_2CO_2 0.1%) en 30 min. Este fraccionamiento arrojó 9 picos cuyos rendimientos se muestran a continuación (**Tabla 7**):

Tabla 7. Rendimiento de las fracciones obtenidas a partir de la fracción IV.	
Fracción	Peso (mg)
IV-1 (1)	10.7
IV-2	1.5
IV-3	1.0
IV-4	0.9
IV-5 (2)	4.0
IV-6 (3)	7.8
IV-7	0.2
IV-8	0.7
IV-9	0.3

A partir de dicho análisis se seleccionaron los productos IV-1, IV-5 y IV-6 (**Figura 17**) para continuar con la caracterización estructural de **1** (10.7 mg, $t_R=7.4$), **2** (4.0 mg, $t_R=12.1$) y **3** (7.8 mg, $t_R=14.3$) (**Tabla 7**).

Por otro lado, se evaluó la actividad inhibitoria de los productos **1-3** contra la enzima $h\text{PTP1B}_{(1-400)}$ a 20 ppm y 100 ppm, dando como resultado un mayor porcentaje de inhibición con los productos **2** y **3** que el mostrado en la fracción IV (26.86%) (**Tabla 8**).

Fracción	Producto	% Inhibición	
		20 ppm	100 ppm
IV-1	1	0.00	0.00
IV-5	2	0.00	60.80 ± 5.93
IV-6	3	62.82 ± 3.22	79.87 ± 8.89

6.5.3 Separación por CLAE de la fracción VII y obtención del compuesto **4**.

Con base en los resultados de la evaluación biológica de las fracciones primarias, se decidió realizar un fraccionamiento a la fracción VII (80% de inhibición frente a *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎).

La resolución de 40 mg del total de la fracción (406 mg), por CLAE semipreparativa, utilizando un sistema optimizado en gradiente 30:70 a 100:0 de MeCN:agua ácida (H₂CO₂ 0.1%) en 30 min., condujo al aislamiento de 7 fracciones cuyos rendimientos se muestran a continuación (**Tabla 9**):

Fracción	Peso (mg)
VII-1	2.6
VII-2	4.2
VII-3	1.1
VII-4 (4)	2.8
VII-5	0.5
VII-6	0.3
VII-7	0.7

Sin embargo, tras el análisis por resonancia magnética nuclear de los cuatro productos con mayor cantidad, denotó que únicamente la fracción VII-4 se encontraba pura y era óptima para su caracterización estructural (**Figura 18**) originando el producto **4** (2.8 mg, $t_R=13.8$).

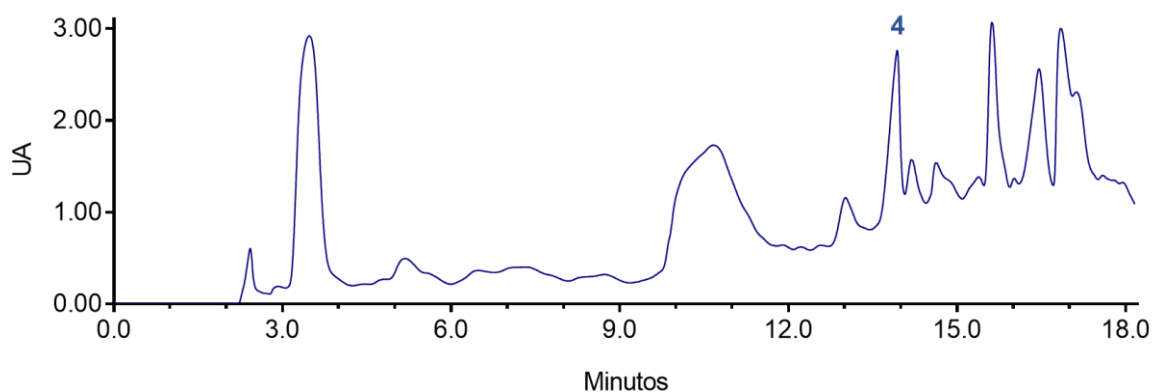


Figura 18. Cromatograma de la separación por CLAE preparativa de la fracción VII; PDA λ 254 nm.

El producto **4** fue sometido a evaluación biológica como inhibidor de la enzima *hPTP1B*₍₁₋₄₀₀₎, dada su inactividad se decidió realizar un fraccionamiento secundario con 243.8 mg de la fracción de origen (406 mg), para así revelar los compuestos responsables de la actividad de la fracción VII.

6.5.4 Fraccionamiento secundario de la fracción VII.

La fracción VII se sometió a un fraccionamiento secundario empleando cromatografía Flash, utilizando como fase estacionaria una columna de 80 g de Sephadex LH-20 cuyo principio de separación es exclusión molecular y como fase móvil una mezcla isocrática de Me_2CO -MeOH 2:8, colectando eluatos de 25 mL y generando seis fracciones (**Tabla 10**), reunidas de acuerdo con la señal cromatográfica observada (**Figura 19**).

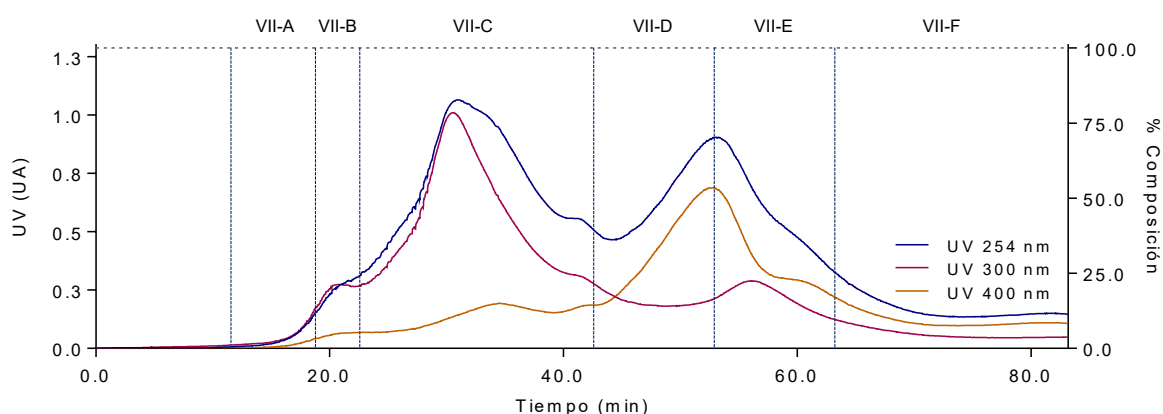


Figura 19. Cromatograma del fraccionamiento secundario por Cromatografía Flash (columna Sephadex LH-20) de la fracción VII del fraccionamiento primario. Las líneas de colores representan las señales de los posibles analitos a diferentes longitudes de onda. Sistema de elución: mezcla isocrática de Me_2CO -MeOH (2:8).

Tabla 10. Fraccionamiento secundario de la fracción VII.

Fracción	Clave	Rendimiento (mg)
4 - 5	VII-A	4.8
6 - 7	VII-B	9.7
8 - 12	VII-C	101.7
13 - 15	VII-D	20.9
16 - 17	VII-E	20.2
18 - 21	VII-F	15.5

Este procedimiento dio como resultado las fracciones VII-A a VII-F, las cuales fueron analizadas por CLAE a nivel analítico, con un sistema en gradiente de 20:80 a 100:0 de MeCN: agua ácida (H₂CO₂ 0.1%) en 30 min, encontrando interesante las fracciones VII-C, VII-D y VII-E (**Figura 19**), donde aparentemente las fracciones VII-D y VII-E, comparten un compuesto mayoritario (t_R 15.1 min). Tras observar que las señales cromatográficas no se resolvían óptimamente en la columna C₁₈, también se analizaron en una columna que tiene como fase estacionaria pentafluorofenilos (PFP) (**Figura 20**).

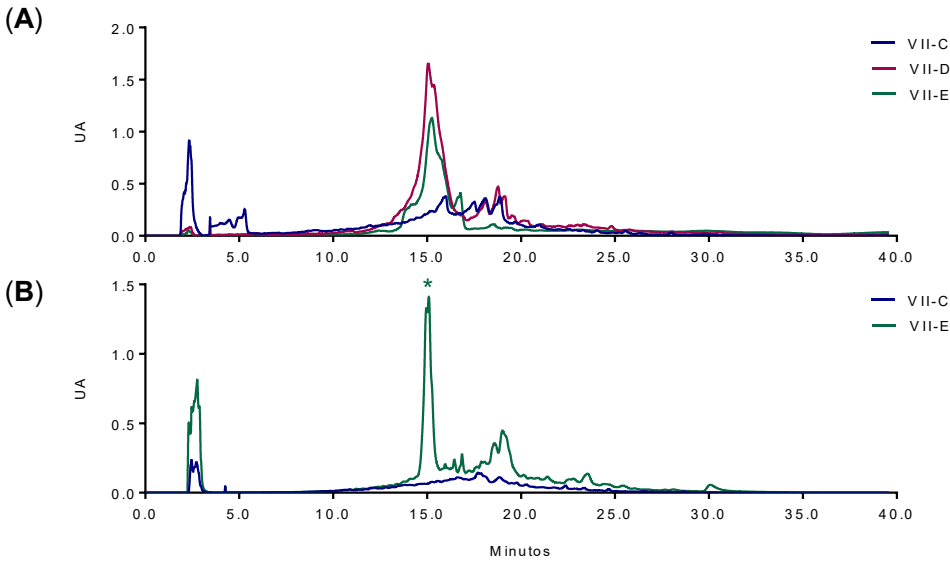


Figura 20. Comparación de los perfiles cromatográficos de las fracciones secundarias de interés por diferentes columnas **(A)** C₁₈ λ 254 nm y **(B)** PFP λ 400 nm; En la imagen se encuentra indicada con * una señal de interés. Método de análisis: 20:80 a 100:0 de MeCN:agua ácida (H₂CO₂ 0.1%) en 30 min.

6.5.5. Evaluación del potencial inhibitorio sobre hPTP1B₍₁₋₄₀₀₎ de las fracciones VII-C a VII-E.

Para poder continuar con la estrategia biodirigida, se seleccionaron las fracciones VII-C a VII-E de acuerdo a las características de sus perfiles cromatográficos para la evaluación de su

efecto inhibitorio sobre $hPTP1B_{(1-400)}$ a 20 ppm y 100 ppm, encontrando los siguientes porcentajes de inhibición (**Tabla 11**):

Tabla 11. Porcentaje de inhibición contra $hPTP1B_{(1-400)}$ de las fracciones VII-E.		
Fracción	% Inhibición	
	20 ppm	100 ppm
VII-C	42.11 ± 4.27	61.21 ± 2.60
VII-D	93.77 ± 0.66	Inhibición total *
VII-E	96.51 ± 0.34	Inhibición total *

*El cálculo del porcentaje de inhibición fue mayor al 100%.

Con base en los resultados mostrados, se purificó la fracción VII-E debido a que se encontraba conformada por una señal mayoritaria y así obtener el producto **5**, cuya actividad inhibitoria fue mayor en comparación con los productos **1-4**.

6.5.6. Separación por CLAE de la fracción VII-E y obtención del compuesto **5**.

La separación del producto presente en la fracción VII-E (20.9 mg) se llevó a cabo por CLAE semipreparativa (**Figura 21**), utilizando una columna de PFP como fase estacionaria y un sistema en gradiente 25:75 a 100:0 de MeCN:agua ácida (H₂CO₂ 0.1%) en 30 min., obteniendo únicamente 1 fracción cuyos rendimientos se muestran a continuación (**Tabla 12**), de donde se logró el aislamiento del compuesto **5** (4.1 mg, $t_R=10.98$)

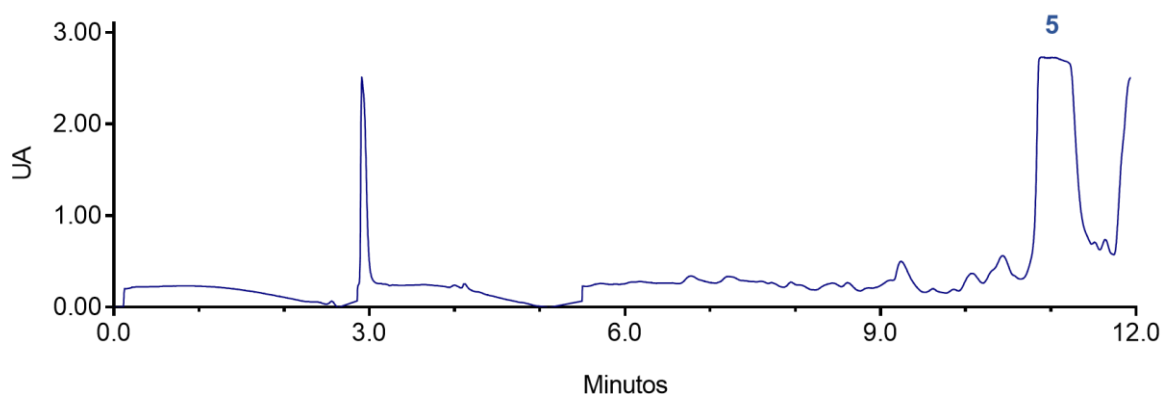


Figura 21. Cromatograma de la separación por CLAE preparativa de la fracción VII-E; PDA λ 254 nm.

Tabla 12. Fraccionamiento de VII-E	
Fracción	Rendimiento (mg)
VII-E-1 (5)	4.1

A continuación, se muestra un resumen de la estrategia experimental empleada a lo largo del estudio biodirigido del extracto IQ-1620 para la obtención de los cinco compuestos, con sus respectivos rendimientos.

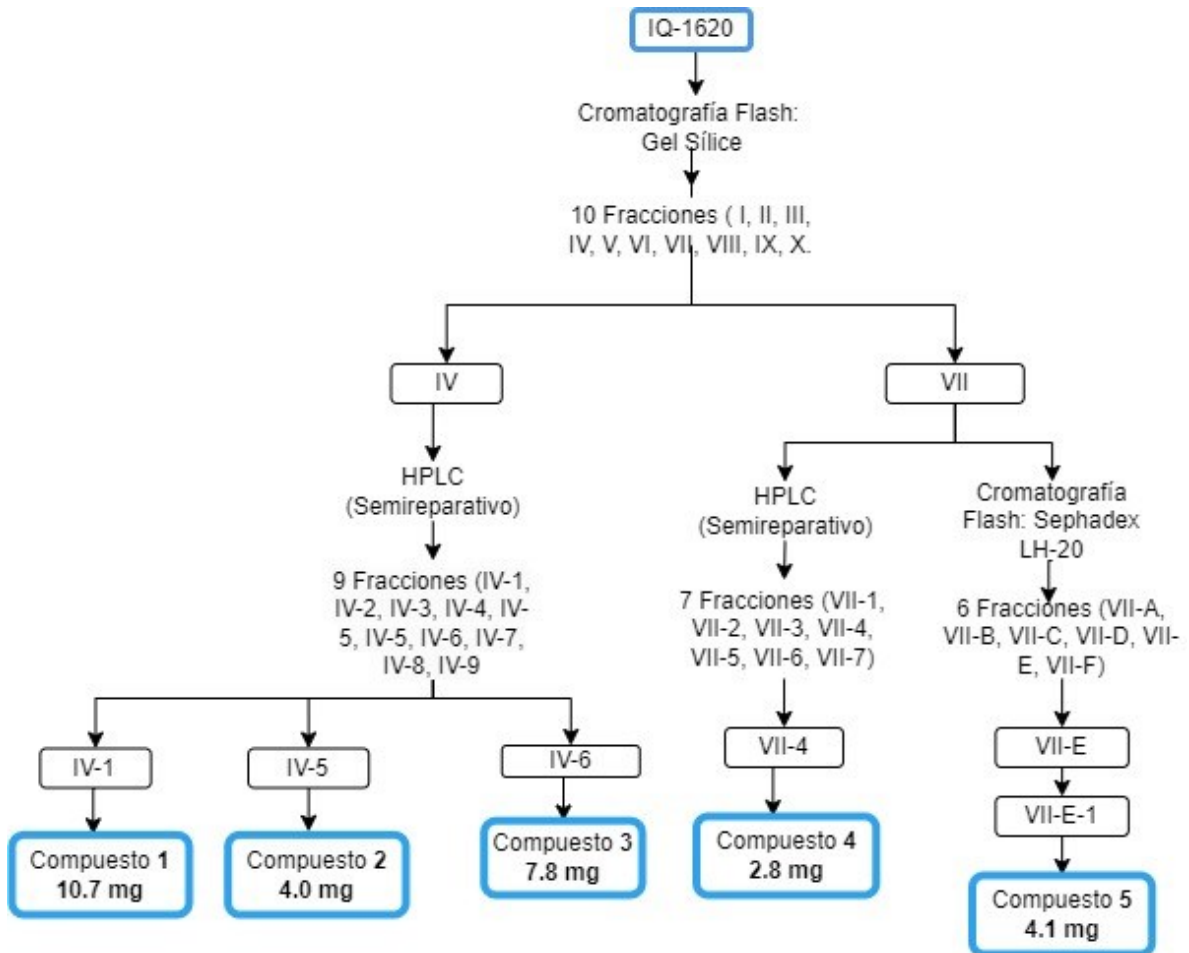
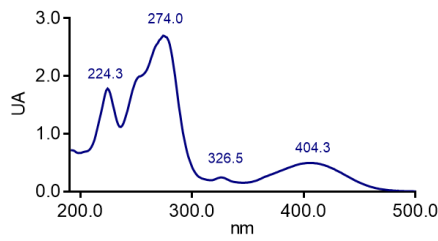
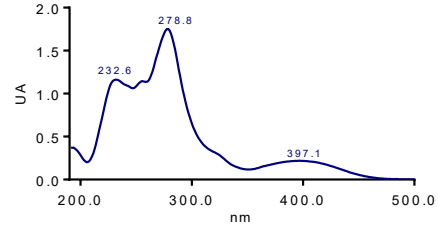
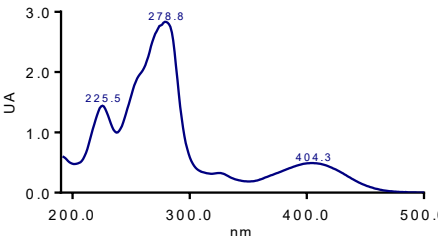


Figura 22. Resumen de los fraccionamientos realizados a partir del extracto del hongo IQ-1620 para la obtención de los compuestos 1–5.

6.6. Caracterización estructural de los productos puros

6.6.1. Caracterización estructural de los productos 1–3

Como se observa en la **Tabla 13** los primeros productos obtenidos presentan perfiles en el ultravioleta similares con tres máximos de absorción alrededor de 225, 280 y 405 nm, por lo que se sospecha de estructuras con un cromóforo en común.

Producto	Espectro UV	Tiempo de retención (t_R)	Rendimiento (mg)
1		7.4	10.7
2		12.1	4.0
3		14.3	7.8

El producto **1** (10.7 mg) fue aislado como agujas amarillas solubles parcialmente en Me_2CO . Con base en el análisis de espectrometría de masas por ionización a presión atmosférica a partir de gases (DART-EM) se pudo calcular la fórmula molecular como $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ a partir de la especie ionizada observada en m/z 273.0735 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (masa exacta m/z 273.0757 $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_5$, $\Delta=-8.2$ ppm). Esta fórmula permite 10 grados de insaturación (**Figura 23**).

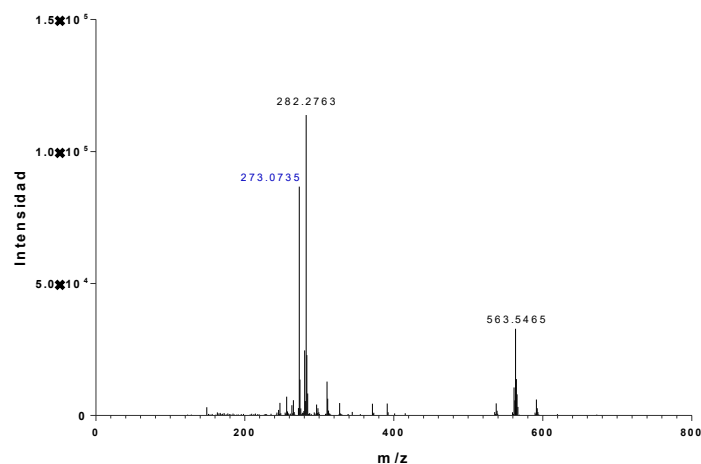


Figura 23. Espectro de masas del compuesto **1** obtenido por DART: m/z : 273.0735 $[M+H]^+$ (calc. para $C_{15}H_{13}O_5$, 273.0757, $\Delta -8.2$ ppm).

Las señales observadas en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- 1H) se describen a continuación:

En δ_H 14.91 ppm se encuentra una señal simple atribuible a un fenol quelatado, además de la presencia de cuatro tres asignables a cuatro hidrógenos aromáticos (δ_H 6.94 a 6.47 ppm), dos de ellos con constantes de acoplamiento de tipo *meta*. Un hidrógeno vinílico en δ_H 6.04 ppm). Finalmente, la presencia de dos señales diagnósticas, una para metoxilo en δ_H 3.92 ppm y un metilo sobre un sistema aromático en δ_H 2.39 ppm (**Tabla 14, Figura 25**).

Por otra parte, en el espectro de RMN- ^{13}C se observa un carbonilo de cetona α,β -insaturada en δ_C 185.0 ppm, cuatro carbonos aromáticos y un vinílico unidos a oxígeno (δ_C 169.0 a 154.1 ppm) y tres carbonos aromáticos cuaternarios (δ_C 142.4, 108.4 y 104.3 ppm). Cabe destacar que existe un desplazamiento asignable a un carbono aromático muy desplazado a campo alto (δ_C 97.9 ppm) lo que sugiere que esta posición se encuentre sustituida en posición *orto* y/o *para* con un grupo alto en densidad electrónica (**Tabla 14, Figura 26**).

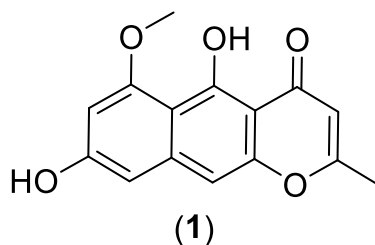


Figura 24. TMC-256A1 (**1**).

Las evidencias antes descritas son congruentes con los reportados en la literatura para el producto TMC-256A1 (Sakurai *et. al.*, 2002), obtenido a partir de diferentes especies de *Aspergillus*, este producto pertenece a la clase de las nafto- γ -pironas (NyP) y previamente se había demostrado actividad como inhibidor de la traducción de señales de IL-4 (Sakurai *et. al.*, 2002) y también anticancerígeno frente diversas líneas celulares (Huang *et. al.*, 2011).

Tabla 14. Datos de RMN ^1H y ^{13}C observados para el compuesto **1** $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ (500 MHz/125 MHz) comparados con Sakurai *et. al.*, 2002.

Posición	δ_{H} (mult, J en Hz)	δ_{C}
2	-	169.0
3	6.04 (1H, d, 0.8)	107.5
4	-	185.0
4a	-	104.3
5	-	164.2
5a	-	108.4
6	-	160.8
7	6.70 (1H, d, 2.1)	102.0
8	-	162.3
9	6.47 (1H, d, 2.1)	97.9
9a	-	142.4
10	6.94 (1H, s)	100.6
10a	-	154.1
2-Me	2.39 (1H, d, 0.8)	20.5
5-OH	14.91 (1H, s)	-
8-OMe	3.92 (3H, s)	56.1

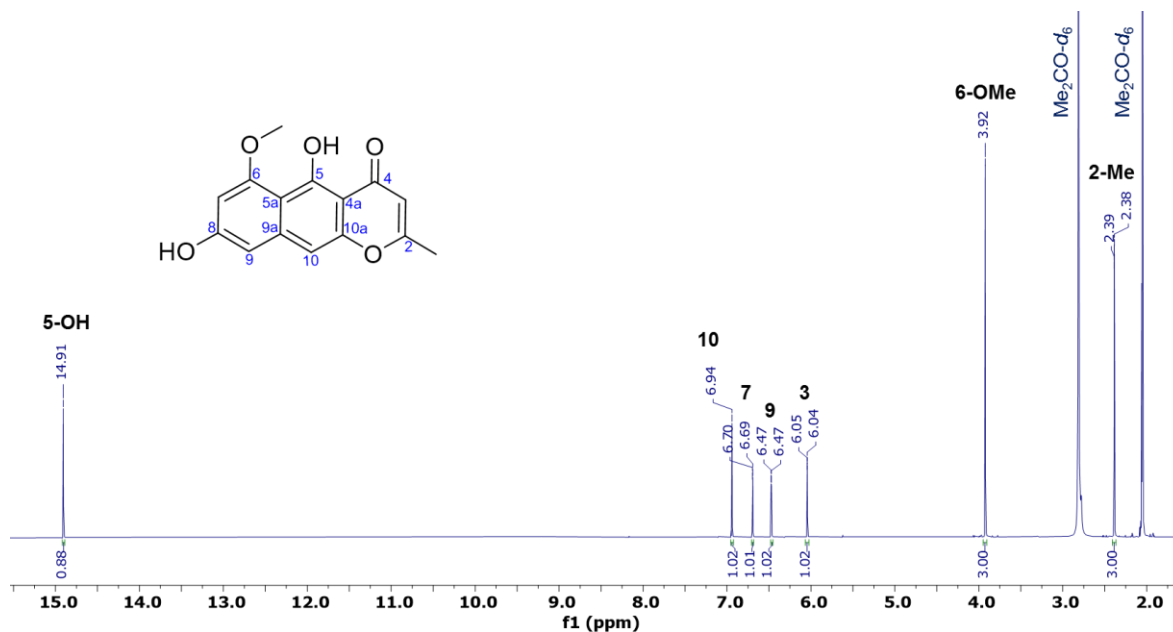


Figura 25. Espectro de RMN- ^1H ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) registrado a 500 MHz del producto TMC-256A1 (**1**).

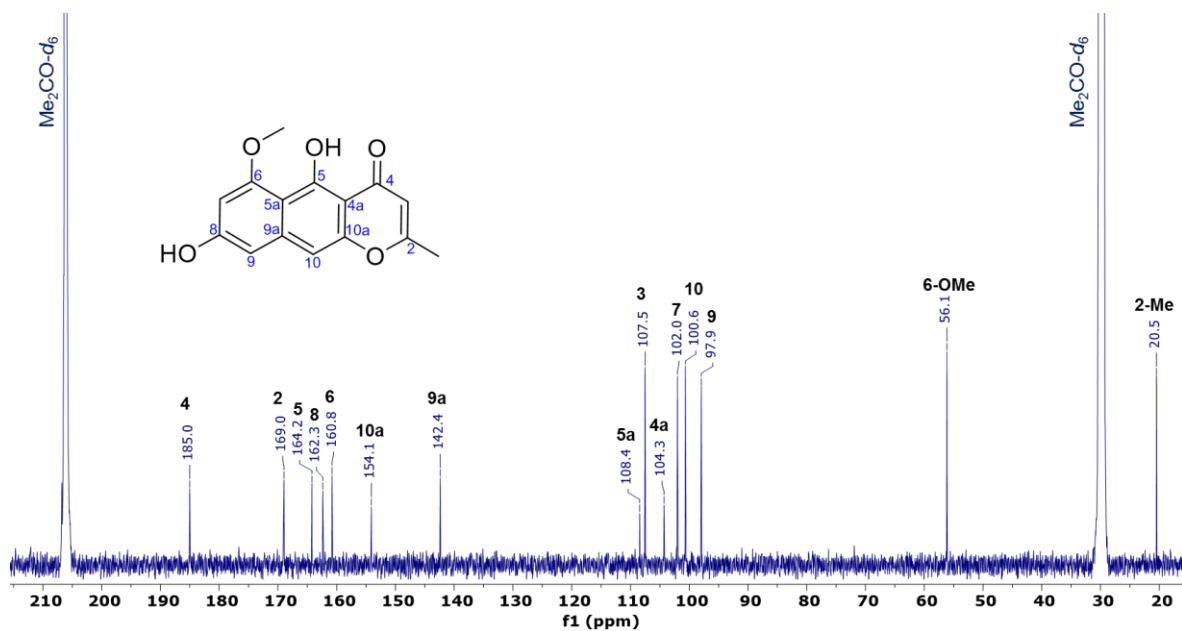


Figura 26. Espectro de RMN- ^{13}C ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) registrado a 175 MHz del producto TMC-256A1 (1).

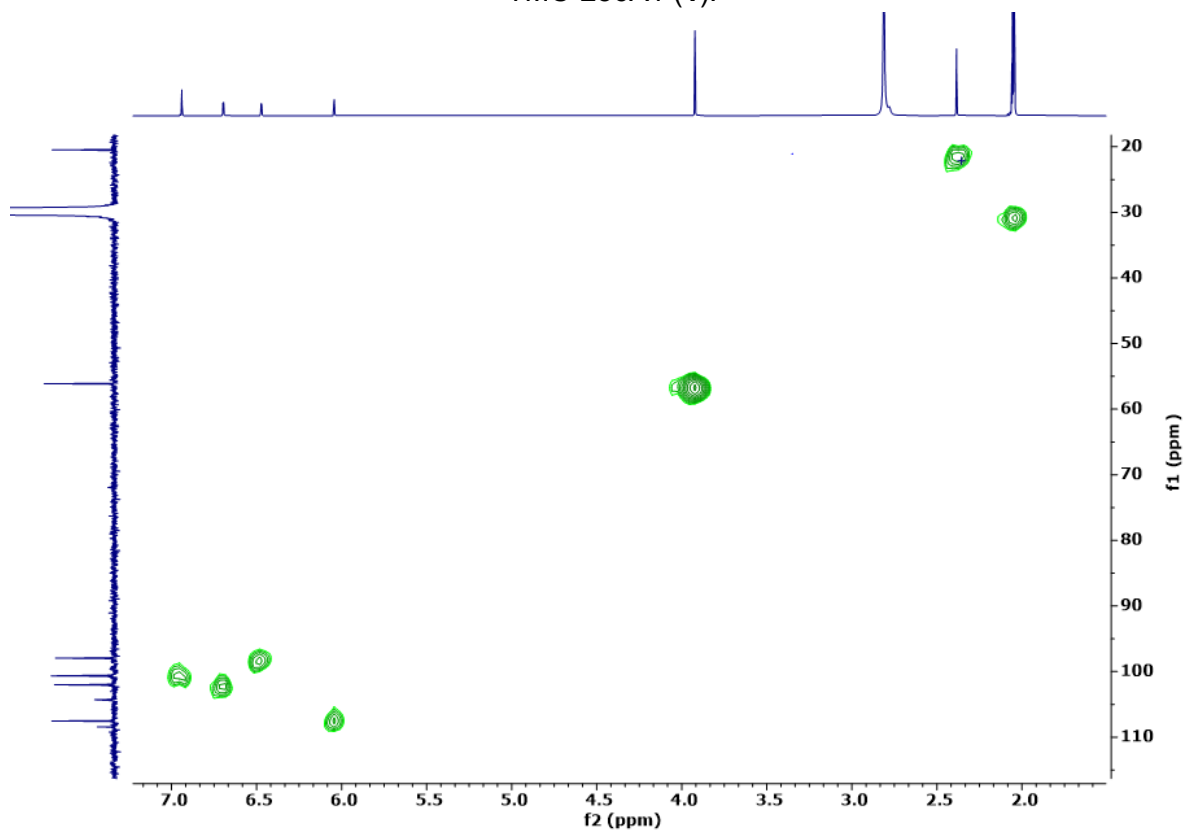


Figura 27. Espectro de HSQC ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) del producto TMC-256A1 (1).

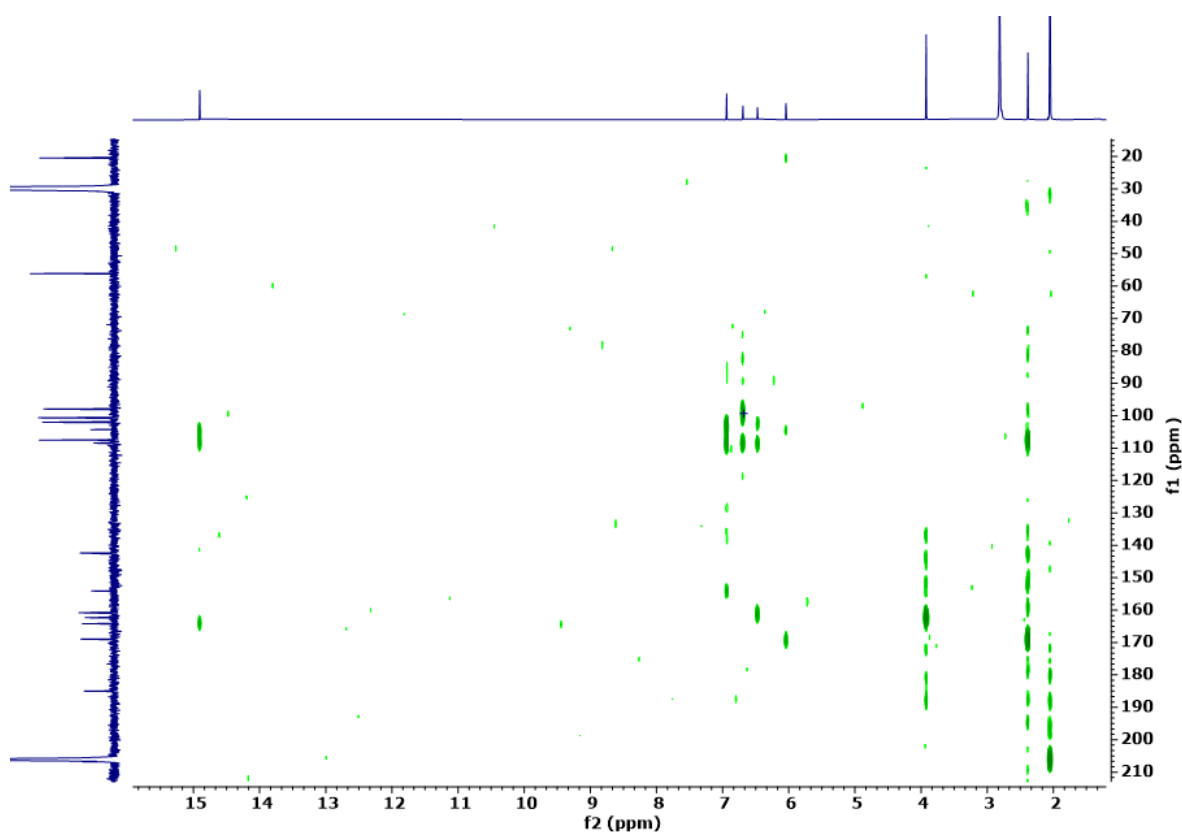


Figura 28. Espectro de HMBC ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) del producto TMC-256A1 (**1**).

Los productos **2** (4.0 mg) y **3** (7.8 mg) se obtuvieron como sólidos amorfos amarillos y tras analizarlos por DART-MS, revelaron el mismo ion molecular m/z 557.1461 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{O}_{10}$, $\Delta=+3.4$ ppm) (**Figura 29**) y m/z 557.1446 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{O}_{10}$, $\Delta=+0.7$ ppm) (Figura 35) respectivamente, indicando que son isómeros estructurales. La fórmula calculada para ambos fue de $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ la cual permite 20 grados de insaturación. Adicionalmente, se observa que los espectros muestran la misma naturaleza, pero con el doble de señales con respecto al compuesto **1**, por lo que se sugiere que sean especies diméricas de este.

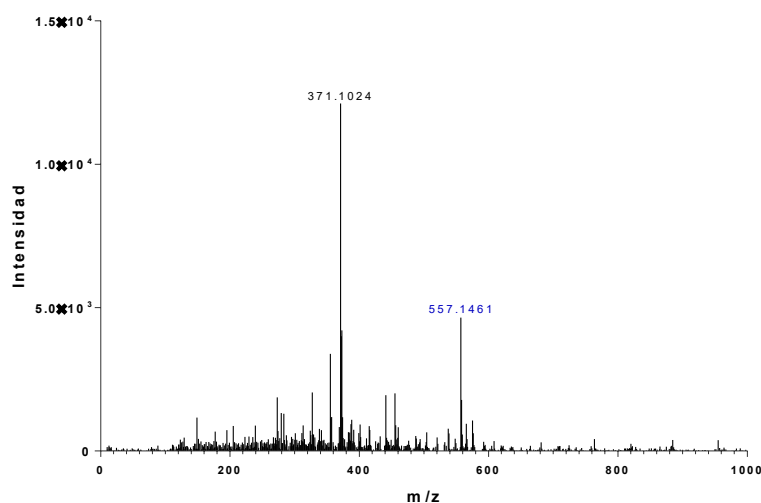


Figura 29. Espectro de masas del compuesto **2** obtenido por DART: m/z : 557.1461 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. para $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{O}_{10}$, 557.1442, Δ +3.4 ppm)

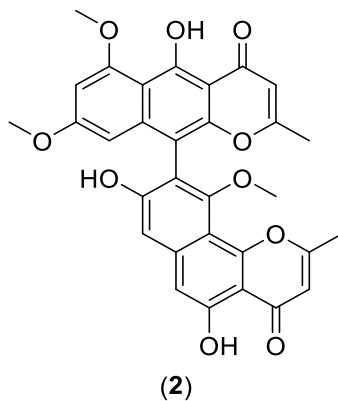


Figura 30. asperpirona A (2)

Para el producto **2**, además de las señales características para TMC-256A1 (**1**), se observó el desplazamiento del hidroxilo quelatado a δ_H 12.76 ppm y el desplazamiento del hidrógeno H-3 hacia campo bajo a δ_H 6.33 ppm, sugiriendo un rearrreglo en una de las dos subunidades (**Figura 31**). En el espectro RMN- ^{13}C se observó cambio en el desplazamiento del carbono aromático base de oxígeno de la posición C-5 en δ_C 156.7 ppm y la aparición de una señal en δ_C 108.2 ppm correspondiente a un átomo cabeza de puente (**Tabla 15, Figura 32**).

Las señales de desplazamiento químico antes descritas son congruentes con las reportadas en la literatura para el producto asperpirona A (**2**) (Akiyama et. al., 2003.), comúnmente aislado a partir de diferentes especies de *Aspergillus* (Xiao et. al., 2014) así como de *Penicillium oxalicum* (Bang et. al., 2014). La estructura inequívoca del producto se estableció por medio del análisis de los espectros bidimensionales HSQC y HMBC. La asperpirona A (**2**) pertenece a la clase de las NyP, las cuales previamente han mostrado actividad inhibitoria sobre la ADN Taq polimerasa (Akiyama et. al., 2003.). Por otro lado, se encontró que la asperpirona A (**2**) atenúa la formación de osteoclastos inducida por RANKL mediante la supresión de la señalización de NFATc1, Ca^{2+} y el estrés oxidativo (Chen et. al., 2019).

Tabla 15. Datos de RMN ^1H y ^{13}C observados para el compuesto 2 CDCl_3 (500 MHz/125 MHz) comparados con Akiyama <i>et. al.</i> ,2003.					
Posición	δ_{H} , (mult, J en Hz)	δ_{C}	Posición	δ_{H} , (mult, J en Hz)	δ_{C}
2	-	166.8	2'	-	168.0
3	6.33 (1H, d, 0.9)	111.0	3'	6.01 (1H, d, 0.9)	107.8
4	-	183.0	4'	-	184.3
4a	-	109.6	4a'	-	104.4
5	-	156.7	5'	-	164.2
6	7.01 (1H, s)	105.8	5a'	-	108.8
6a	-	141.0	6'	-	161.5
7	7.15 (1H, s)	106.1	7'	6.40 (1H, d, 2.2)	97.6
8	-	156.2	8'	-	162.7
9	-	115.3	9'	6.24 (1H, d, 2.2)	95.8
10	-	157.3	9a'	-	140.8
10a	-	108.2	10'	-	101.4
10b	-	155.5	10a'	-	152.3
2-Me	2.48 (1H, d, 0.8)	20.7	2'-Me	2.16 (1H, d, 0.8)	20.9
5-OH	12.76 (1H, s)	-	5'-OH	15.31 (1H, s)	-
7-OH	5.42 (1H, s)	-	6'-OMe	3.97 (3H, s)	56.3
10-OMe	3.44 (3H, s)	61.5	8'-OMe	3.65 (3H, s)	55.5

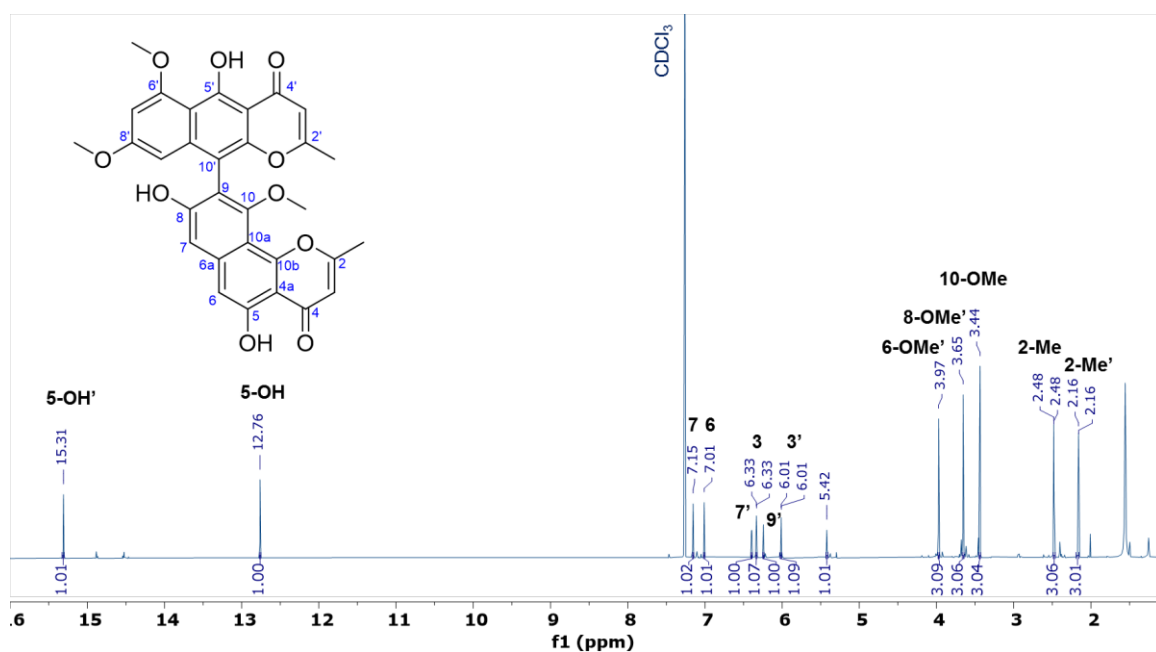


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3) registrado a 500 MHz para la Asperpirona A (**2**)

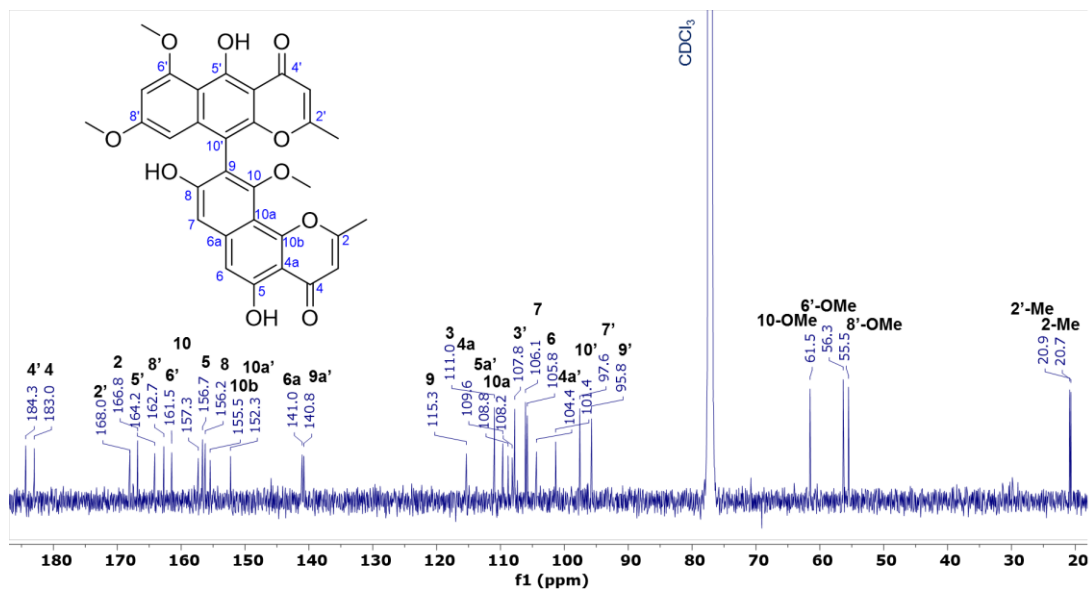


Figura 32. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3) registrado a 175 MHz para la Asperpirona A (2).

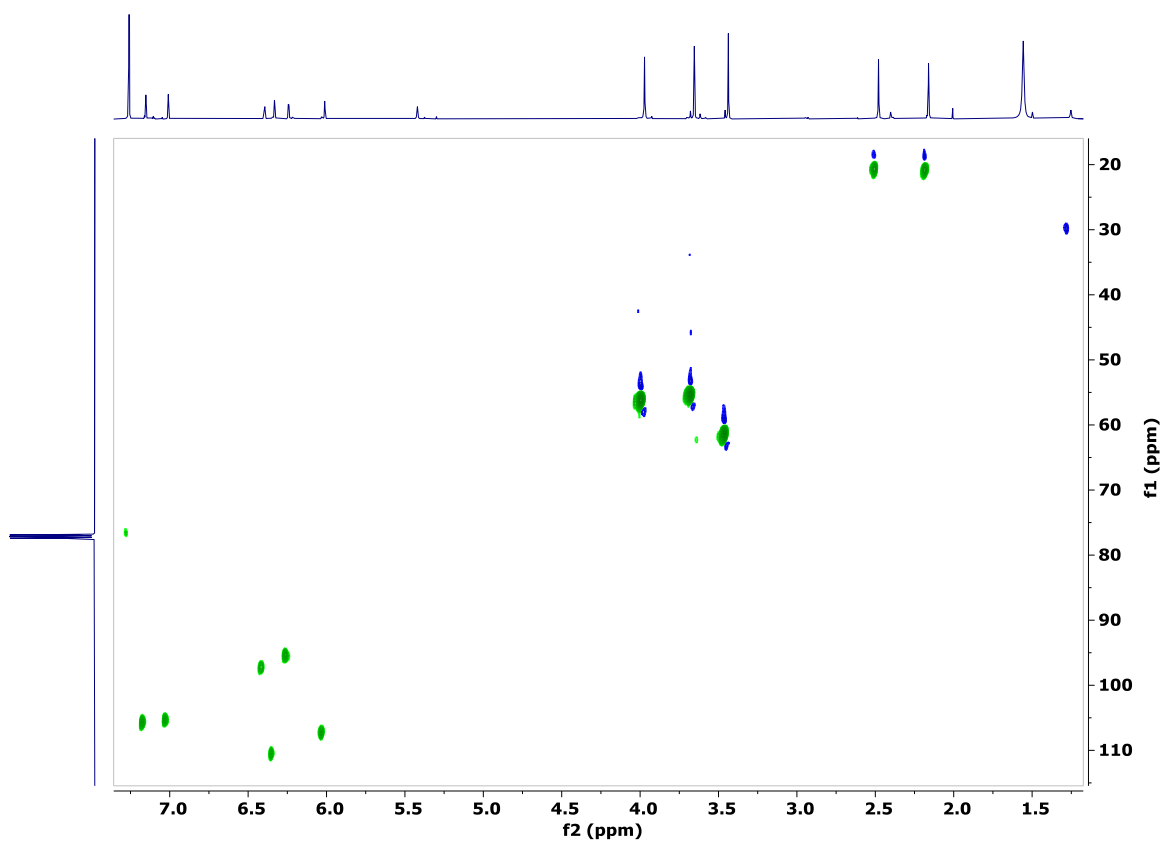


Figura 33. Espectro de HSQC (CDCl_3) del producto Asperpirona A (2)

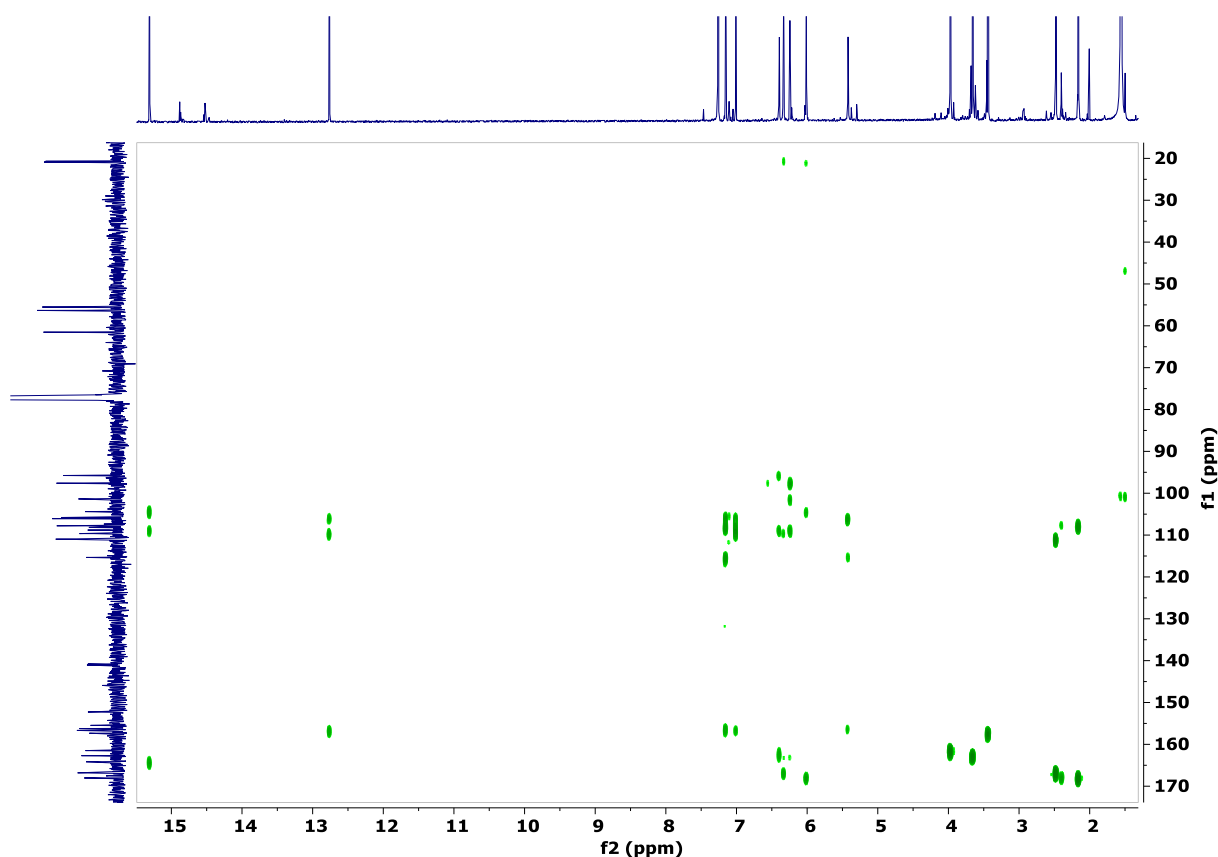


Figura 34. Espectro de HMBC (CDCl_3) del producto asperpirona A (**2**)

Por otro lado, el compuesto **3** presentó la mayoría de las señales en pares, por lo que se infirió que se trata de un dímero del compuesto **1**. En este caso, sólo se observó a los hidrógenos en δ_{H} 6.27 ppm y 6.26 ($J= 2.2$ Hz) ppm correspondientes a las posiciones 7' y 9' con constante de acoplamiento de tipo *meta*, se planteó que una de las subunidades este sustituida en la posición C-10, formando así la estructura dimérica (**Tabla 16, Figura 37**).

Finalmente, el producto **3** presentó desplazamientos químicos para un dímero fusionado por las posiciones C-7/C-10' (δ_{C} 116.0 ppm y 101.9 ppm, respectivamente) así como estar metoxilado en las posiciones C-6, c-6' y C-8 (δ_{C} 159.0, 161.1, 162.4 ppm, respectivamente). De igual forma cuenta con 3 fenoles sobre los carbonos aromáticos C-5, C-8 y C-5' (δ_{C} 162.4, 156.8, 163.7 ppm, respectivamente) (**Tabla 16, Figura 38**).

Las señales de desplazamiento químico descritas son congruentes con las reportadas en la literatura para el producto dianhidroaurasperona C (**3**) (Pilevneli *et. al.*, 2021.) y se corroboró por el análisis exhaustivo de los espectros bidimensionales HSQC y HMBC. Este producto perteneciente a la clase de las NγP con actividad antioxidante y baja toxicidad, aislado también de *Aspergillus tubingensis* (Carboué *et. al.*, 2019). Por otro lado, se encontró que revierte la resistencia a fármacos anticancerígenos como la vincristina y la mitomicina C al interactuar con la glicoproteína P e inhibir su función como bomba de salida activa. (Ikeda *et. al.*, 1990.). También se demostró que cuenta con actividad anticancerígena frente a células A549 humanas resistentes al cisplatino evaluada mediante ensayo MTT (Hu *et. al.*, 2021.).

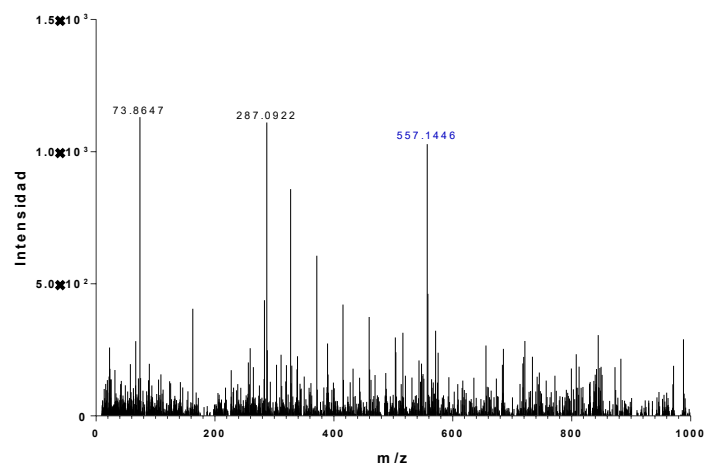


Figura 35. Espectro de masas del compuesto **3** obtenido por DART: m/z : 557.1446 $[M+H]^+$ (calc. para $C_{31}H_{25}O_{10}$, 557.1442, $\Delta=+0.7$ ppm)

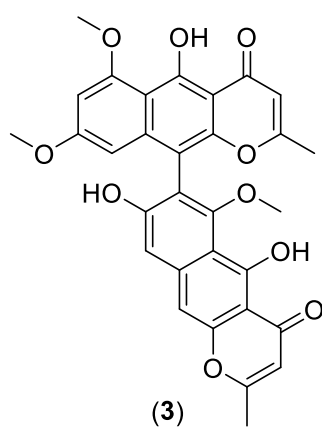


Figura 36. dianhydroaurasperona C (**3**).

Tabla 16. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C observados para el compuesto 3 CDCl ₃ (500 MHz/125 MHz). como en Pilevneli <i>et. al.</i> , 2021.					
Posición	δ _H , (mult, J en Hz)	δ _C	Posición	δ _H , (mult, J en Hz)	δ _C
2	-	167.9	2'	-	168.3
3	6.02 (1H, d, 0.8)	107.5	3'	5.93 (1H, d, 1.0)	107.4
4	-	184.7	4'	-	184.3
4a	-	104.5	4a'	-	104.3
5	-	162.4	5'	-	163.7
5a	-	111.4	5a'	-	108.6
6	-	159.0	6'	-	161.1
7	-	116.0	7'	6.27 (1H, d, 2.2)	97.3
8	-	156.8	8'	-	162.4
9	7.20 (1H, s)	106.0	9'	6.26 (1H, d, 2.2)	96.0
9a	-	140.8	9a'	-	140.8
10	7.13 (1H, s)	101.0	10'	-	101.9
10a	-	153.4	10a'	-	152.2
2-Me	2.40 (3H, d, 0.8)	20.9	2'-Me	2.16 (3H, d, 0.8)	20.9
5-OH	15.16 (1H, s)	-	5'-OH	14.91 (1H, s)	-
6-OMe	3.45 (3H, s)	62.3	6'-OMe	3.85 (3H, s)	56.0
8-OH	6.06 (1H, s)	-	8'-OMe	3.66 (1H, s)	55.4

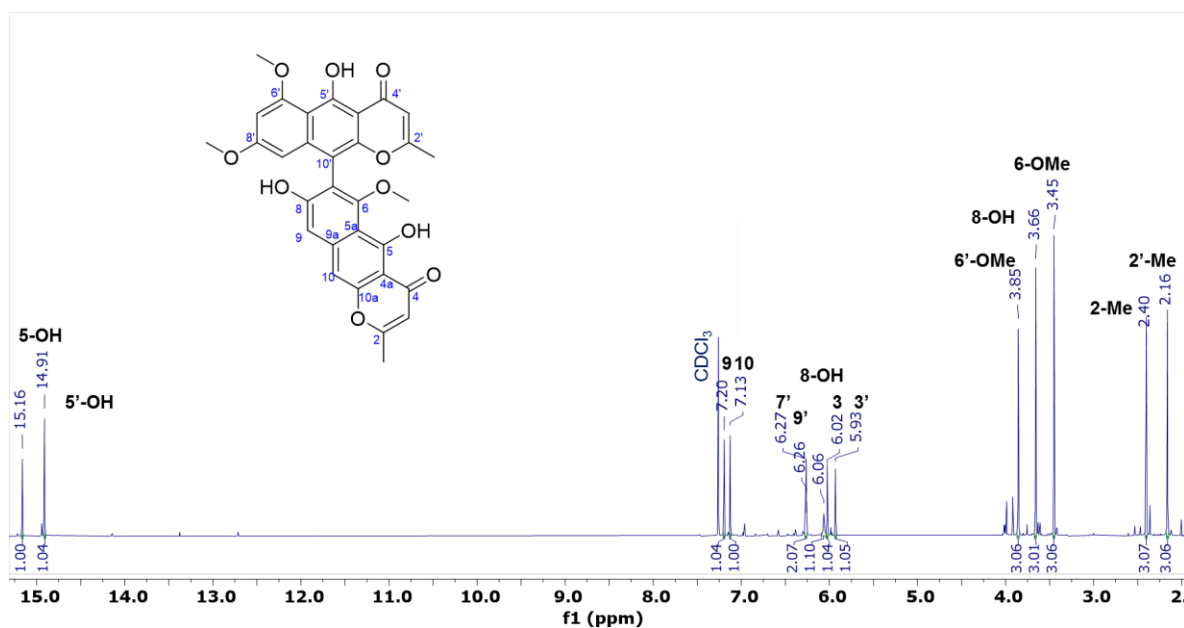


Figura 37. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) registrado a 500 MHz para la Dianhidroaurasperona C (**3**).

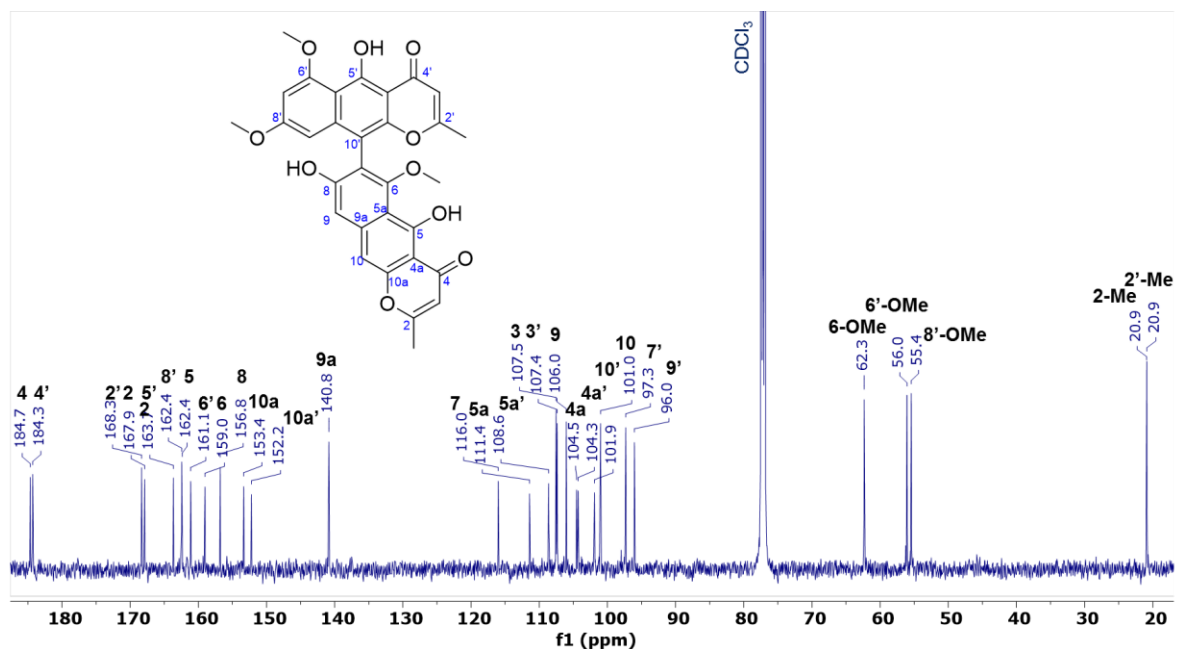


Figura 38. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) registrado a 175 MHz para la dianhidroaurasperona C (3).

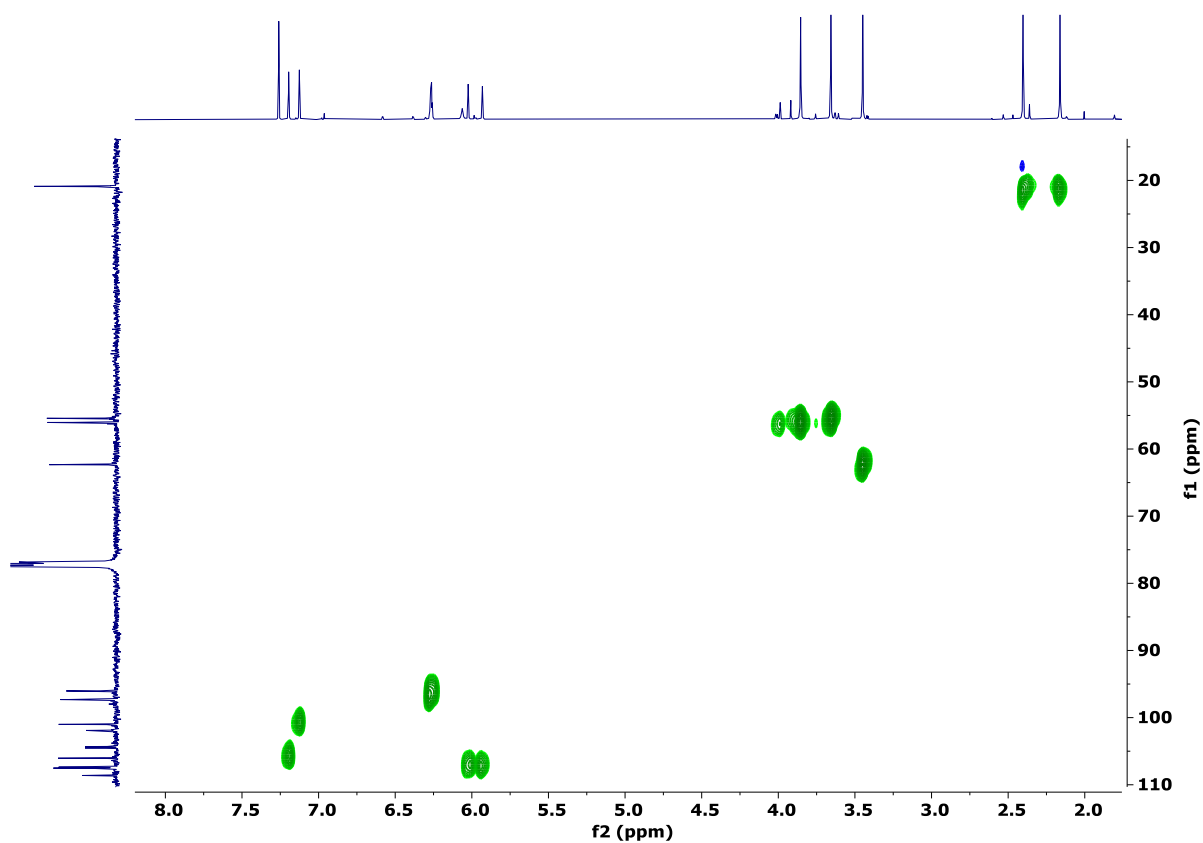


Figura 39. Espectro de HSQC (CDCl₃) del producto dianhidroaurasperona C (3).

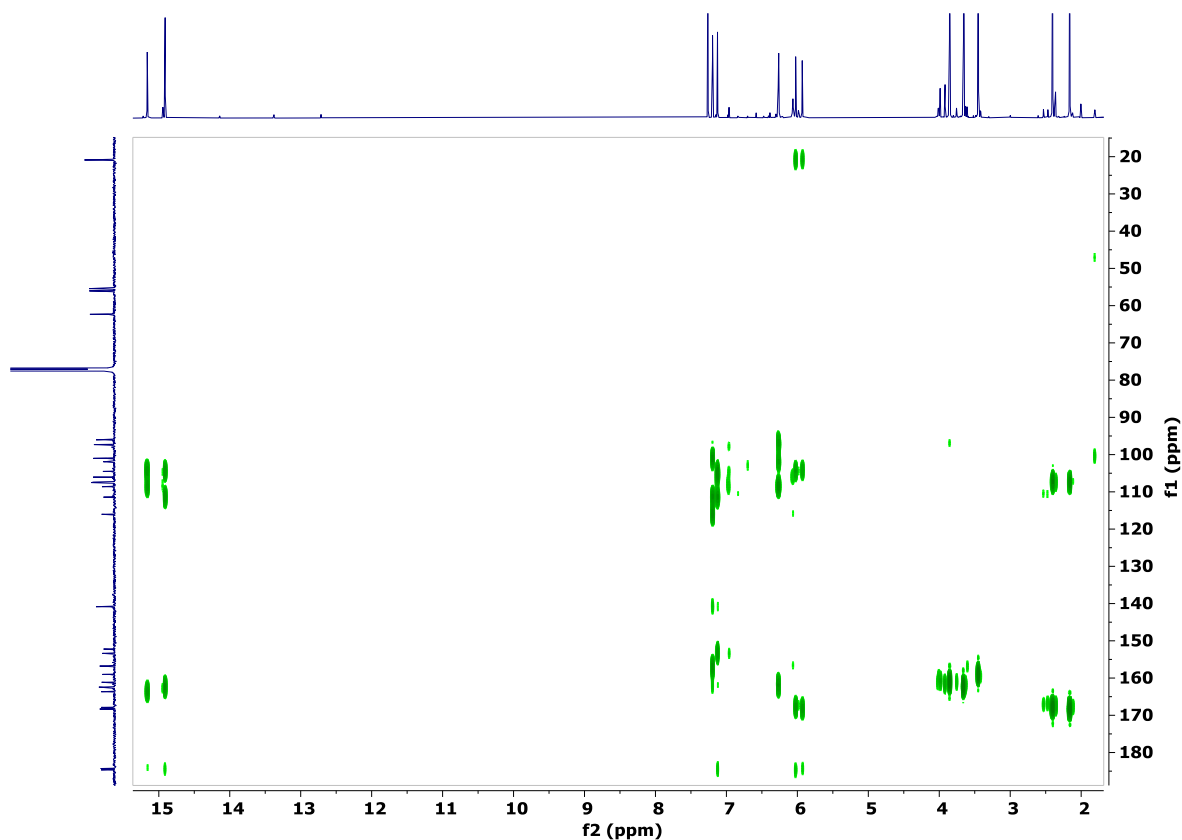


Figura 40. Espectro de HMBC (CDCl_3) del producto dianhidroaurasperona C (**3**).

6.6.2. Caracterización estructural del producto **4**

El compuesto **4** se obtuvo como un sólido amarillo (2.8 mg) soluble en CDCl_3 , su análisis por CLAE reveló que posee un perfil en el ultravioleta con tres máximos de absorción en 224, 280 y 405 nm (**Tabla 17**). Con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización a presión atmosférica a partir de gases (DART-EM), su fórmula y masa molecular fue establecida como $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4$ con base en el ion pseudomolecular m/z 631.3030 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 41**).

Tabla 17. Perfil en el ultravioleta y tiempo de retención del producto **4**.

Producto	Espectro UV	Tiempo de retención (t_R)	Rendimiento (mg)
4		13.8	2.8

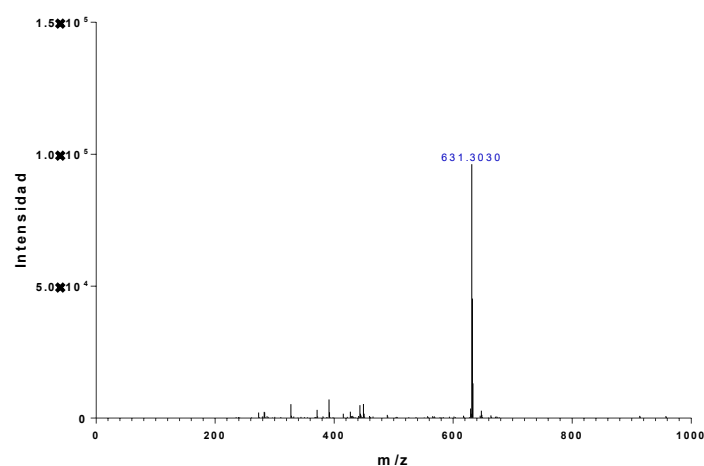


Figura 41. Espectro de masas del compuesto **4** obtenido por DART: m/z : 631.3030 $[M+H]^+$ (calc. para $C_{37}H_{39}N_6O_4$, 631.3027, $\Delta = +0.4$ ppm)

Para determinar la estructura de este producto, en los espectros de RMN se observaron las siguientes características: en el espectro de RMN- 1H reveló la presencia de una señal en δ_H 8.70 ppm asignable a un NH de indol, señales correspondientes a 12 hidrógenos aromáticos (δ_H 7.45 a 6.75 ppm), uno vinílico (δ_H 6.87 ppm) así como la presencia de dos señales de NH de amina (δ_H 6.00 y 8.70 ppm), tres de amida (δ_H 5.75 a 6.18 ppm), y 10 hidrógenos desplazados a campo bajo (δ_H 4.50 a 2.90 ppm), además de la presencia de un grupo isobutilo con señales asignables a campo alto (δ_H 1.21 a 0.92 ppm). El espectro de RMN- ^{13}C confirmó la presencia de cuatro carbonilos de amida (δ_C 168.6 a 167.9 ppm), 18 carbonos de naturaleza aromática (δ_C 145.8 a 109.4 ppm), dos vinílicos (C-2' y C-3') y un carbono con hibridación sp^3 unido a dos heteroátomos por lo que se desplaza en δ_C 83.4 ppm (C-2) (**Figuras 43 y 44**).

Derivado del análisis de los espectros de RMN 2D se establecieron las correlaciones para así poder proponer la estructura de dos posibles compuestos, la pestalazina A o la isopestalazina A (**Figura 42**) ya que los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN 1H y ^{13}C se muestran en la **Tabla 18** y son congruentes con los reportados en la literatura (Loach *et. al.*, 2016.). Debido a que el producto natural pestalazina A es el único producto natural, ya que su isómero estructural sólo se ha observado como resultado de síntesis química para generar estrategias sintéticas del mismo, se asignó la identidad de pestalazina A (**4**). Por otro lado, se encontró que pestalazina A también fue aislada de la planta *Pestalotiopsis theae*, mostrando efectos inhibitorios sobre la replicación del VIH-1 en células C8166. De manera adicional, este es el primer registro de este metabolito como producto de una especie del género *Aspergillus* sp. (Ding *et. al.*, 2008).

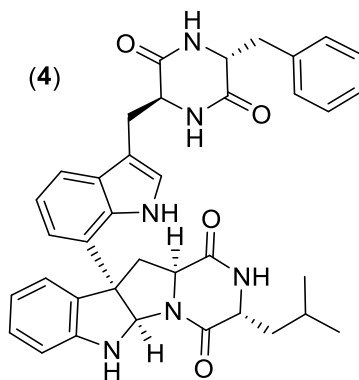


Figura 42. pestalazina A (4)

Tabla 18. Datos de RMN ^1H y ^{13}C observados para el compuesto **4** en CDCl_3 (500 MHz/125 MHz) como en Loach *et. al.*, 2016.

Posición	δ_{H} , mult, (J en Hz)	δ_{C}	Posición	δ_{H} , mult, (J en Hz)	δ_{C}
1-NH	6.01 – 5.98 (1H, m)	-	2'	6.87 (1H, d, 2.4)	124.3
2	5.82 (1H, d, 2.1)	83.2	3'	-	109.4
3	-	57.9	4'	-	129.0
4	-	131.8	5'	7.44 (1H, d, 8.0)	118.8
5	6.96 (1H, dd, 7.6, 1.3)	124.5	6'	7.18 (1H, t, 7.7)	120.1
6	6.76 (1H, td, 7.4, 1.0)	121.2	7'	7.39 (1H, d, 7.4)	119.1
7	7.15 (1H, d, 7.6, 1.3)	129.4	8'	-	125.3
8	6.79 (1H, d, 8.0)	110.6	9'	-	134.7
9	-	145.8	10'-NH	5.75 (1H, s)	-
11	4.51 (1H, t, 8.5)	38.5	11'	3.61 (1H, dd, 9.4, 3.5)	54.5
12	3.56 (1H, dd, 13.8, 7.7)	57.0	12'	3.38 (1H, ddd, 14.8, 3.7, 1.0)	29.7
13-CO	-	168.2	13'-CO	-	167.9
14-NH	5.8 (1H, s)	-	14'-NH	6.18 (1H, d, 4.4)	-
15	3.93 (1H, dd, 7.6, 4.4)	56.6	15'	3.90 (1H, dd, 4.3, 2.3)	56.3
16-CO	-	168.0	16'-CO	-	168.6
17	1.60 (2H, t, 7.4)	41.9	17'	3.17 (1H, dd, 14.0, 3.9)	40.2
18	1.75 (1H, hept, 13.5, 6.7)	24.6	18'	-	135.1
19	0.97 (3H, d, 6.6)	23.1	19'/23'	7.11 – 7.07 (2H, m)	129.8
20	0.92 (3H, d, 6.6)	21.4	20'/22'	7.28 (3H, dd, 4.9, 1.9)	129.2
1'-NH	8.70 (1H, d, 2.6)	-	21'		127.8

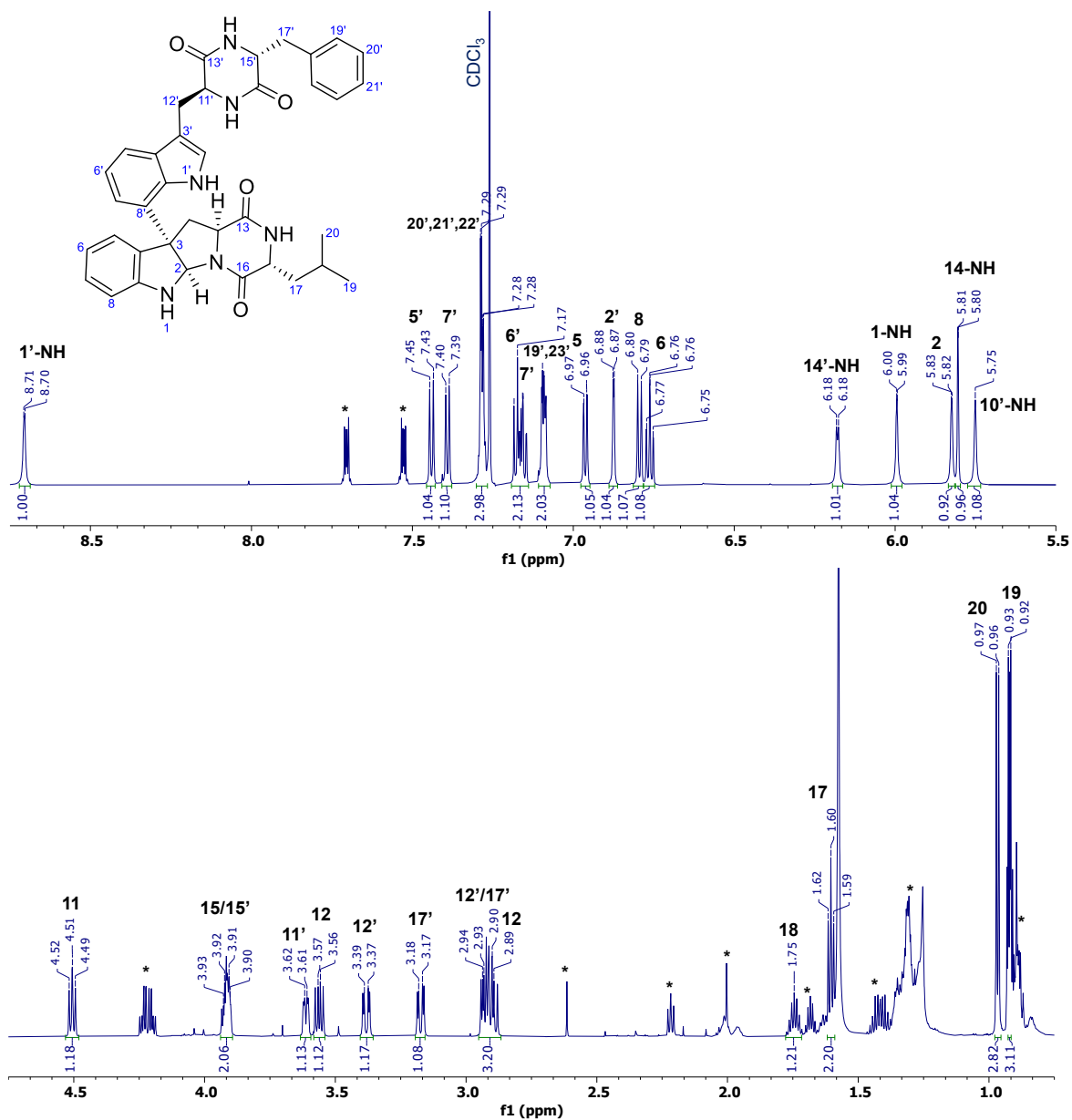


Figura 43. Espectro de RMN- ¹H (CDCl₃) registrado a 500 MHz para la pestalazina A (4).

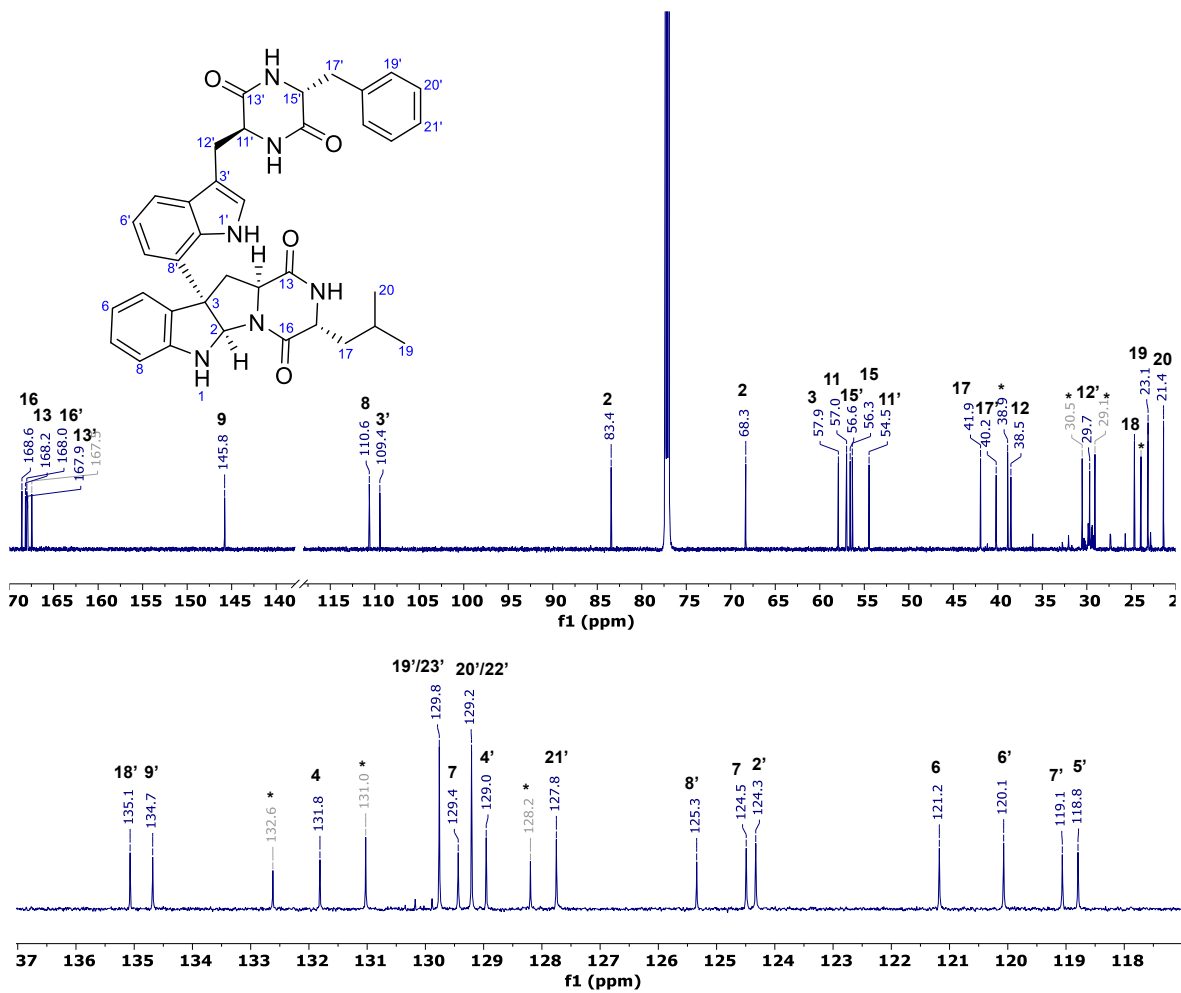


Figura 44. Espectro de RMN ⁻¹³C (CDCl₃) registrado a 125 MHz para producto pestalazina A (4).

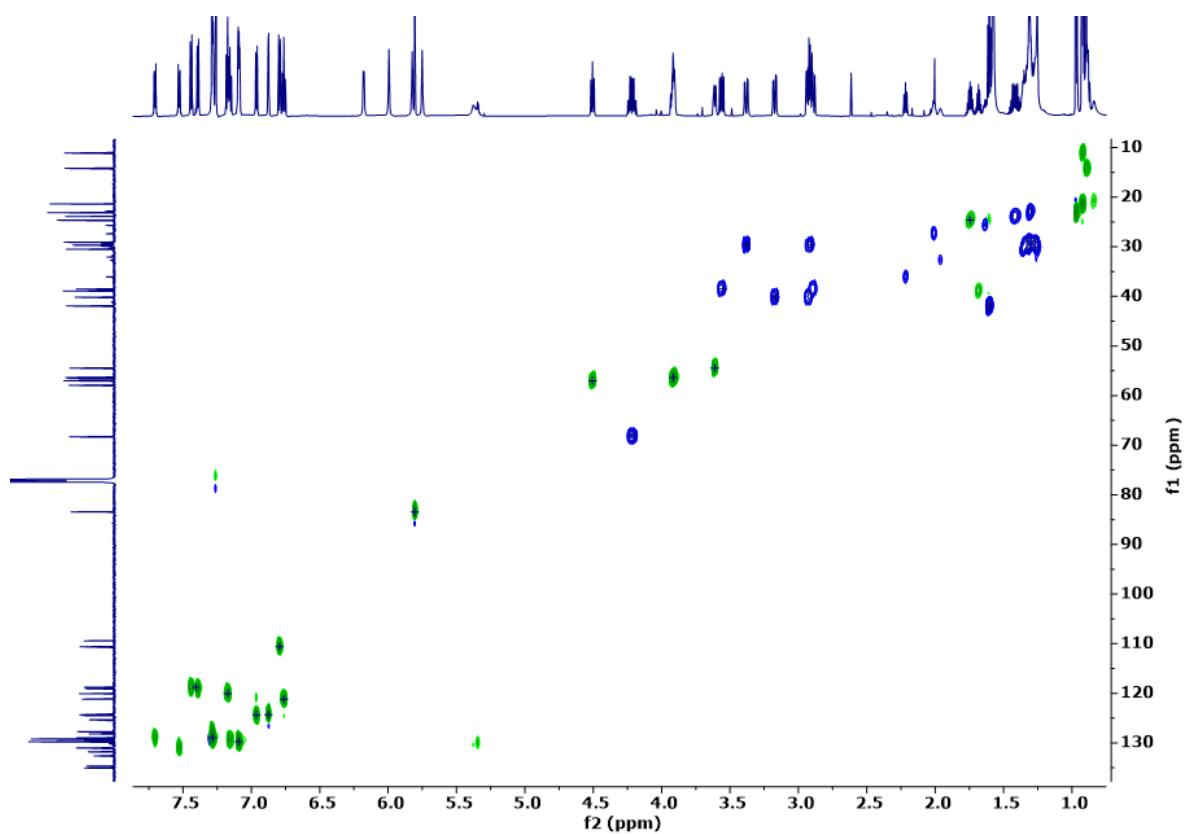


Figura 45. Espectro de HSQC (CDCl_3) del producto pestalazina A (**4**).

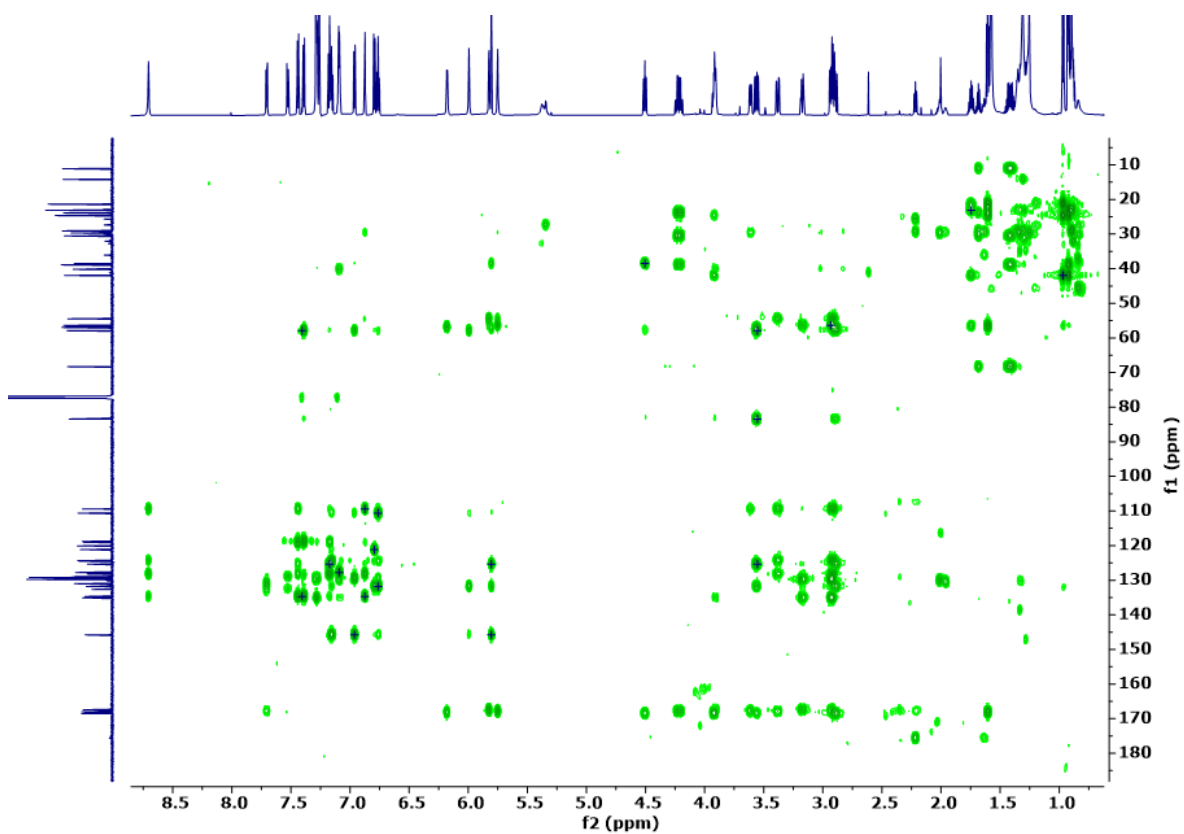


Figura 46. Espectro de HMBC (CDCl_3) del producto pestalazina A (**4**).

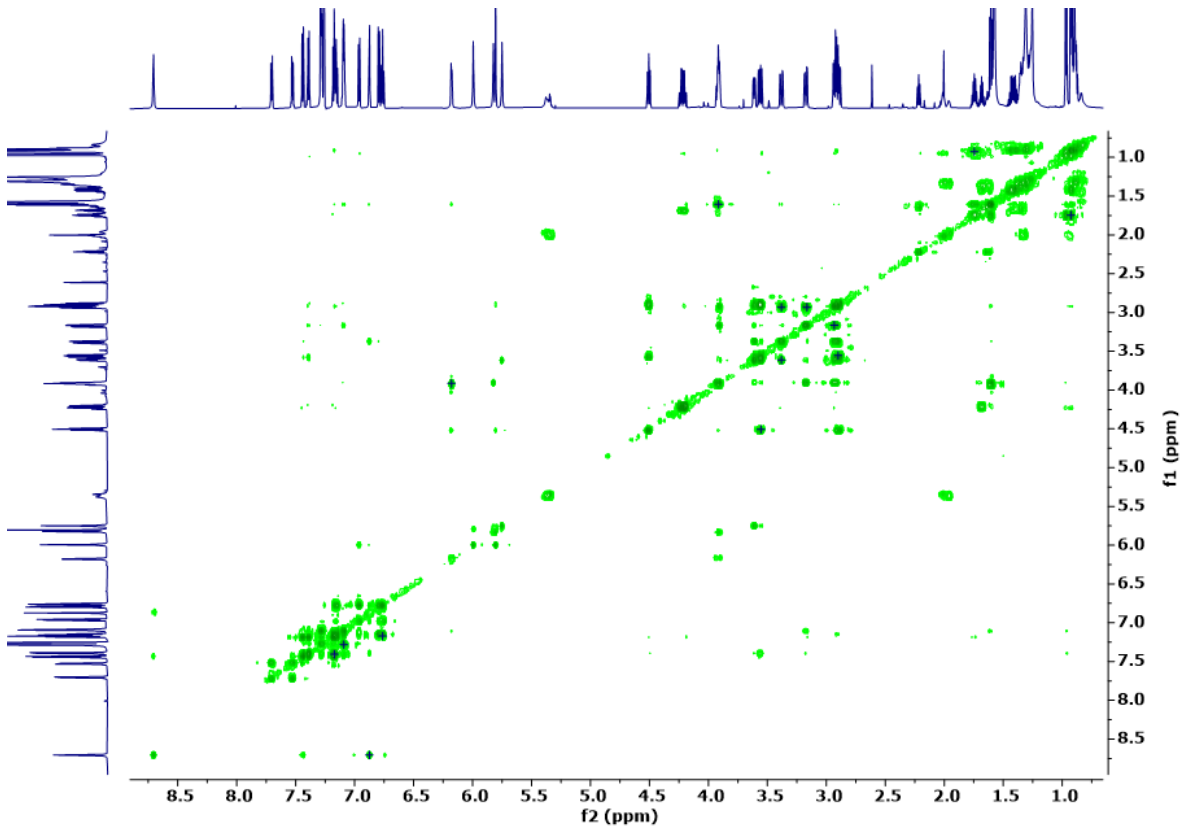


Figura 47. Espectro de COSY (CDCl_3) del producto pestalazina A (4)

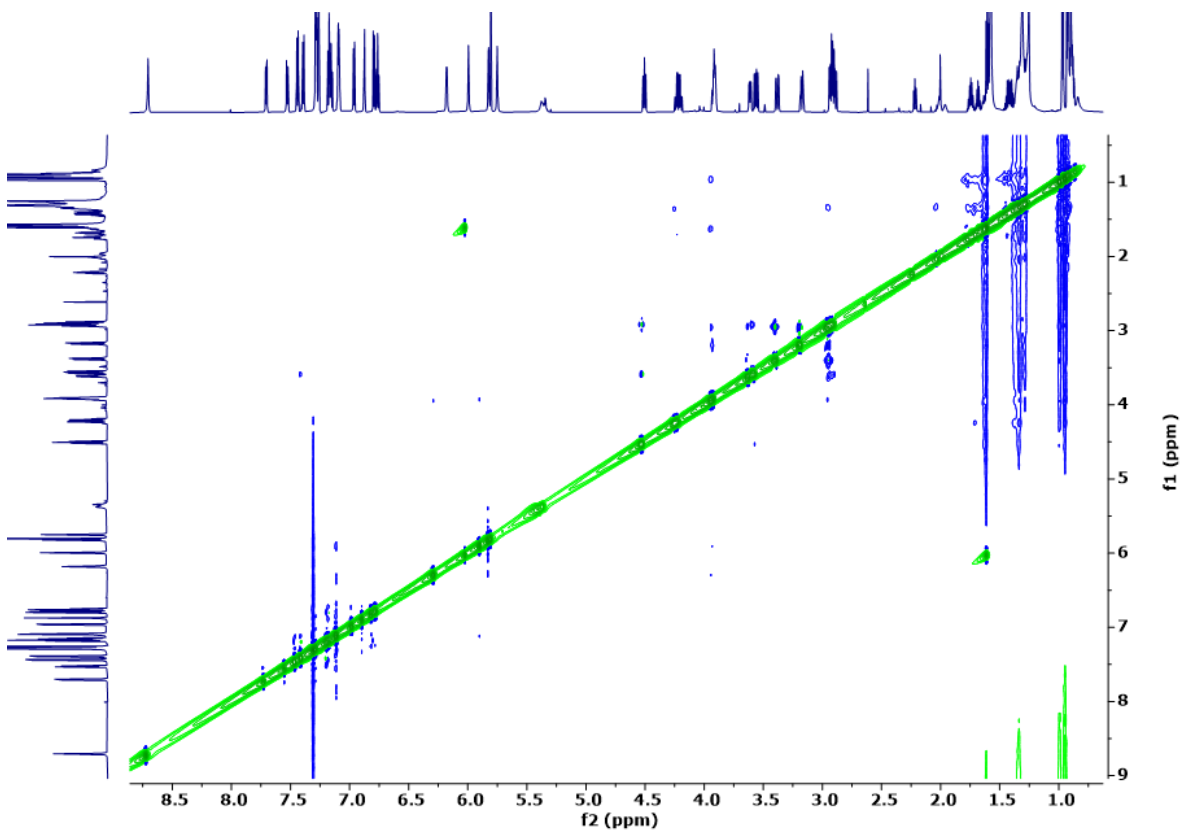
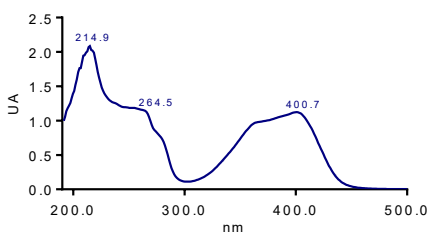


Figura 48. Espectro de NOESY (CDCl_3) del producto pestalazina A (4).

6.6.3. Caracterización estructural del producto 5

El compuesto **5** se obtuvo como un sólido amarillo con textura vítrea (4.1 mg) soluble en DMSO-*d*₆, su análisis por CLAE reveló que posee un perfil en el ultravioleta con máximos de absorción en 212.5 y 400.7 nm (**Tabla 19**). Con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización a presión atmosférica a partir de gases (DART-MS), su fórmula y masa molecular fue establecida como C₁₅H₁₂O₆ con base en la especie observada *m/z* 289.0707 [M+H]⁺ (**Figura 49**).

Tabla 19. Perfil en el ultravioleta y tiempo de retención del producto 5.			
Producto	Espectro UV	Tiempo de retención (t _R)	Rendimiento (mg)
5		10.9	4.1

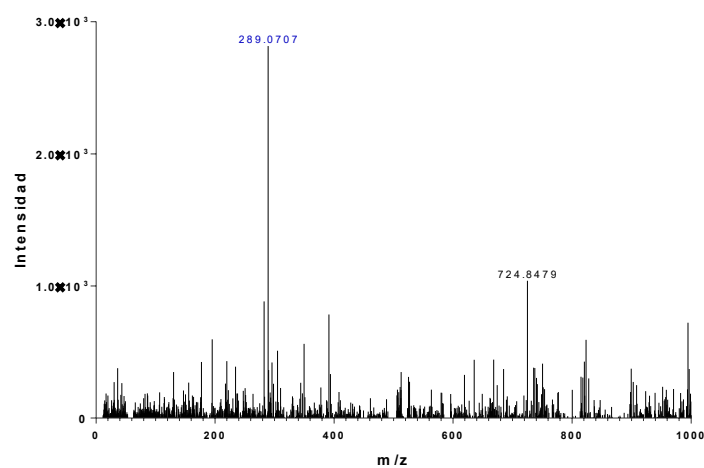


Figura 49. Espectro de masas del compuesto **5** obtenido por DART: *m/z*: 289.0707 [M+H]⁺ (calc. para C₁₅H₁₃O₆, 289.0707, Δ = +0.1 ppm)

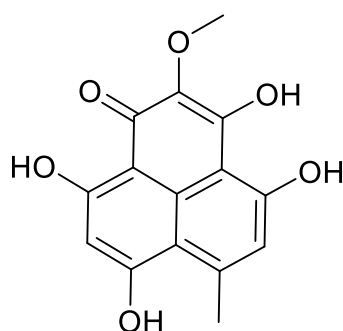


Figura 50. funalenona (**5**)

El espectro de RMN ^1H de este producto mostró señales características para un hidroxilo quelatado en δ_{H} 11.43 ppm, además de dos metinos aromáticos en δ_{H} 6.30-6.75 ppm y la presencia de un metoxilo en δ_{H} 3.66 ppm y un metilo sobre anillo aromático alrededor de δ_{H} 2.80 ppm. Las señales previamente descritas aparentemente se encuentran multiplicadas por cuatro, lo que podría sugerir una estructura con diversos grupos ceto-enol en equilibrio, que sufren tautomerización y con diferentes abundancias (**Figura 51**), esto se confirmó debido a que en el experimento HMBC, muchos de estos desplazamientos químicos se encuentran correlacionados con los mismos tipos de carbono (**Tabla 20**).

Las evidencias posteriormente descritas son congruentes con los reportados en la literatura para este compuesto (Inokoshi *et al.*, 1999). Este producto pertenece a la clase de las fenalenonas y previamente se había demostrado que inhibe la colagenasa tipo 1 (MMP-1) en un 50% a una concentración de 170 μM (Inokoshi *et al.*, 1999). También se demostró que inhibe la integrasa del VIH-1 (cataliza la integración del ADN proviral en el genoma del huésped) con un valor de CI_{50} de 10 μM (Shiomi *et al.*, 2005) (Dayam *et al.*, 2008).

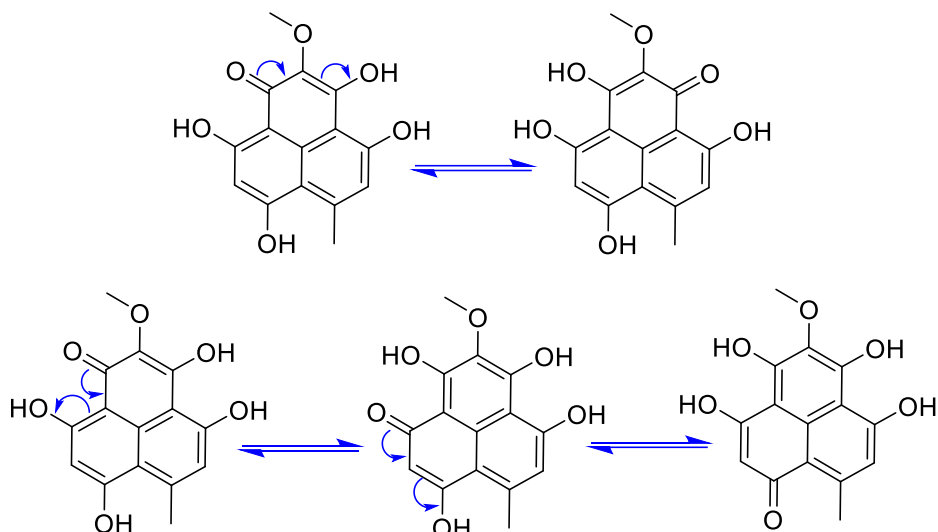


Figura 51. Diferentes tautómeros propuestos para el compuesto **5**.

Tabla 20. Datos de RMN ¹H y ¹³C observados para el compuesto **5** DMSO-*d*₆ (700 MHz) comparados con Inokoshi *et. al.*, 1999.

Posición	δ_H (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_C
1	-	172.0
2	-	132.3
3	-	159.1
3a	-	104.8
4	-	165.2
5	6.72 (1H,s)	117.8
6	-	146.0
6a	-	110.0
7	-	166.0
8	6.38 (1H, s)	100.0
9	-	174.1
9a	-	104.1
9b	-	125.9
10	3.67 (3H, s)	59.4
11	2.82 (3H,s)	24.9
9-OH	11.44 (1H, s)	-

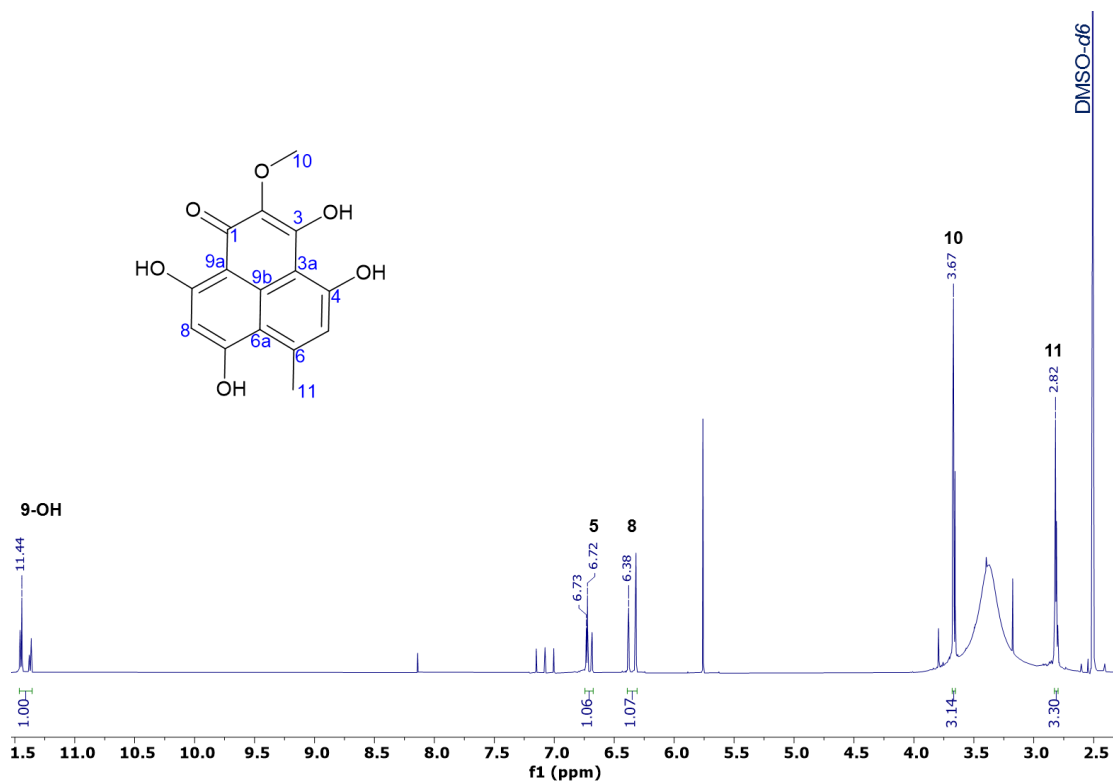


Figura 52. Espectro de RMN-¹H (DMSO-*d*₆) registrado a 700 MHz para la funalena (5).

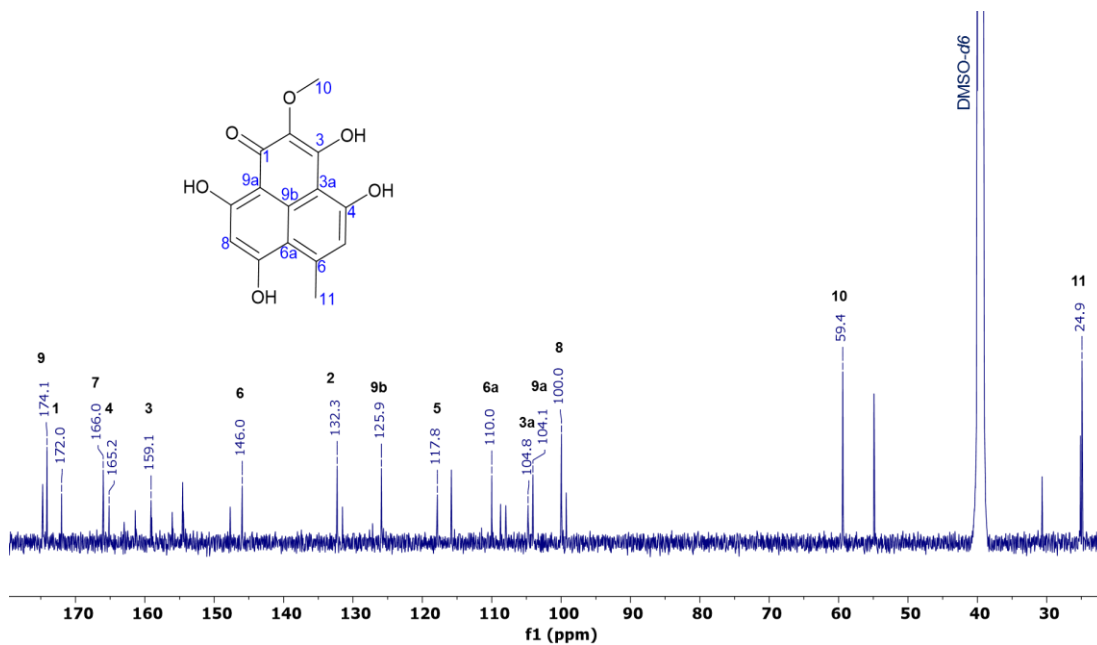


Figura 53. Espectro de RMN-¹³C (DMSO-*d*₆) registrado a 700 MHz para la funalena (5).

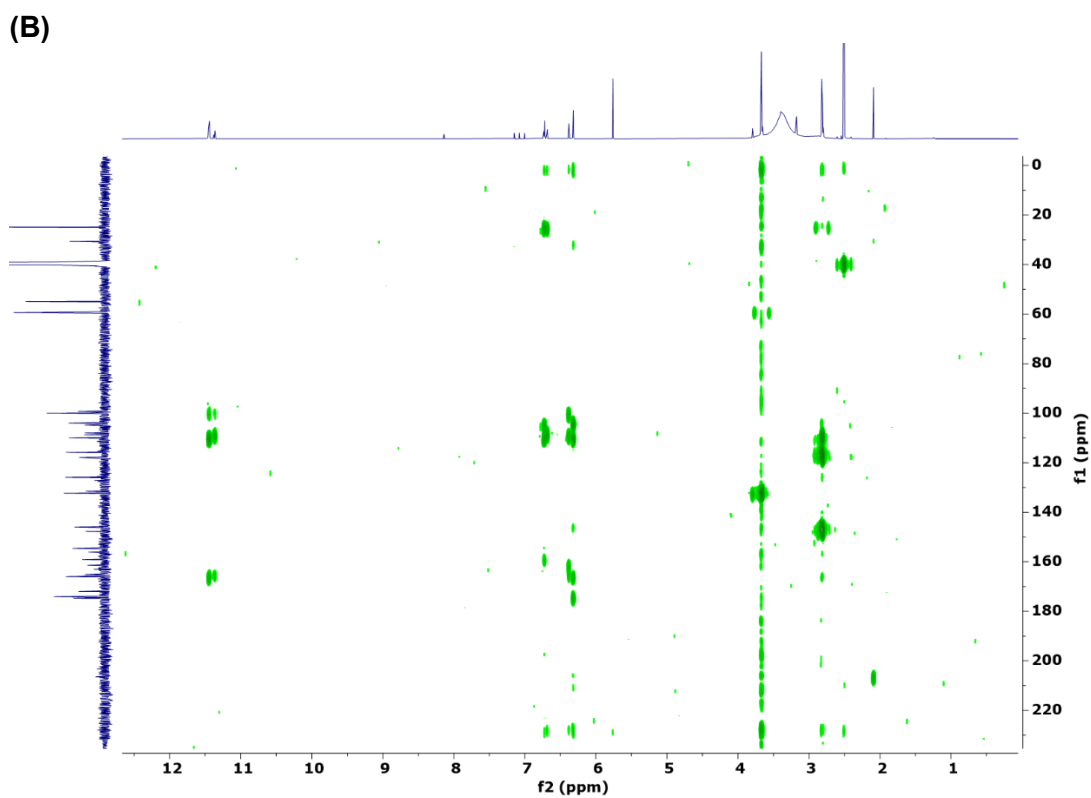
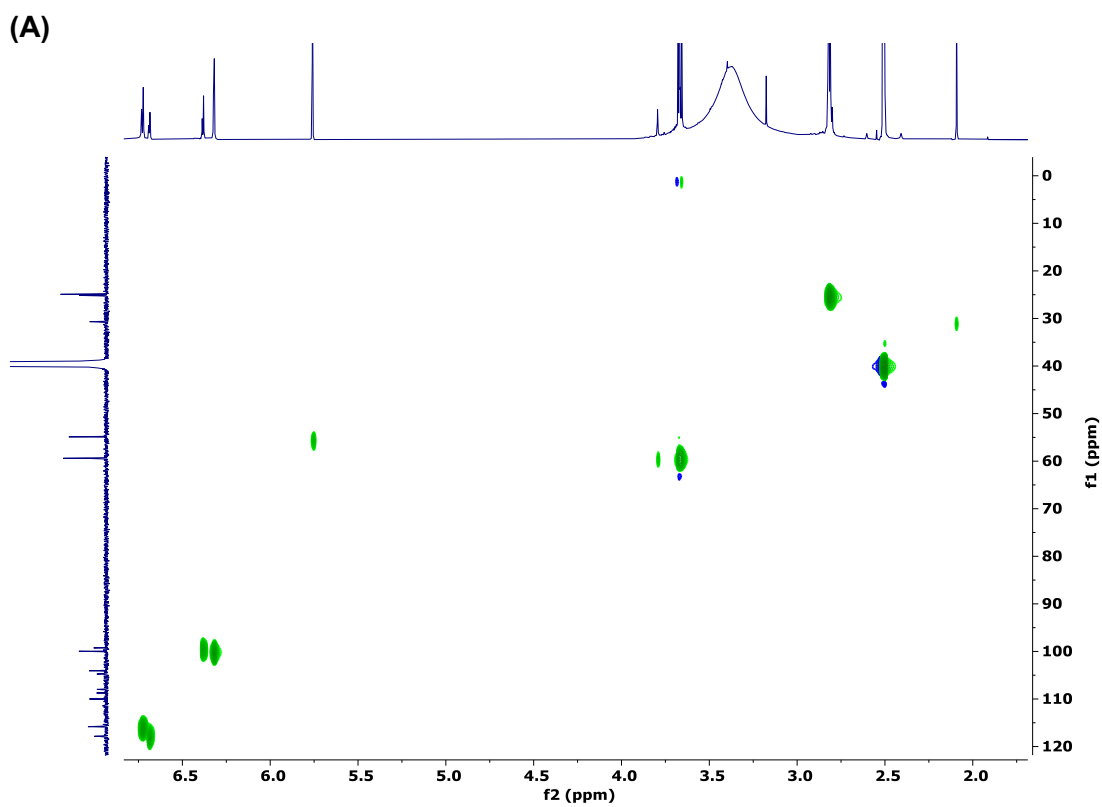


Figura 54. Espectro de HSQC (A) y HMBC (B) ($\text{DMSO}-d_6$) del producto funalenona (5).

6.7. Actividad inhibitoria sobre $hPTP1B_{(1-400)}$ de los compuestos puros.

Los compuestos **1–4** fueron evaluados frente la enzima $hPTP1B_{(1-400)}$, demostrando que la asperpirona A (**2**) y dianhidroaurasperona C (**3**) presentaron mayores efectos inhibitorios sobre $hPTP1B_{(1-400)}$ (**Tabla 21**). El producto funalenona (**5**) no se incluyó en esta evaluación debido a que se encontró en la literatura como inhibidor $hPTP1B$ recombinante de cadena completa, con un valor reportado de CI_{50} de $6.1 \pm 0.3 \mu M$ y actúa como un inhibidor no competitivo de esta diana molecular (Kim *et. al.*, 2020). Esto explica los porcentajes de inhibición observados para las fracciones VII-D y VII-E, (**Tabla 11**, apartado **6.5.5**).

Tabla 21. Compendio del efecto inhibitorio de los compuestos aislados.			
Producto	Compuesto	% Inhibición	
		20 ppm	100 ppm
1	TMC-256A1 (1)	0.00	0.00
2	Asperpirona A (2)	0.00	60.80 ± 5.93
3	Dianhidroaurasperona C (3)	62.82 ± 3.22	79.87 ± 8.89
4	Pestalazina A (4)	0.00	0.00

Con base en estos resultados, se realizó la curva de concentración-respuesta (**Figura 54**) de asperpirona A (**2**), dianhidroaurasperona C (**3**). Las evaluaciones se llevaron a cabo bajo las condiciones mencionadas en el apartado **5.8**.

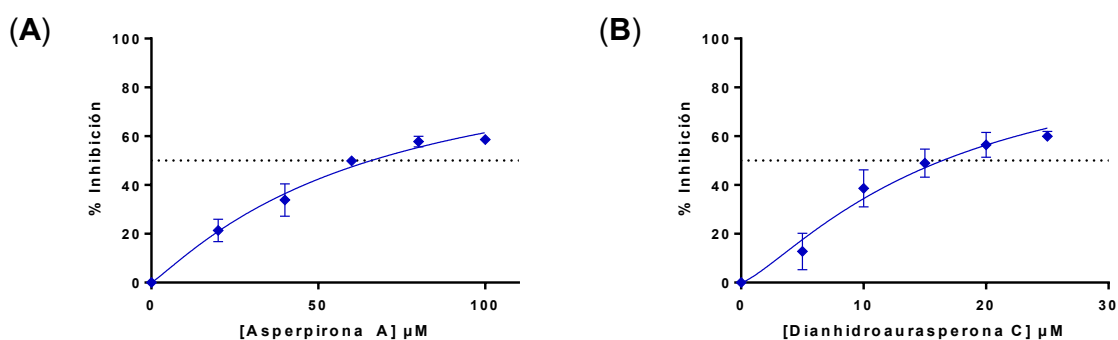


Figura 55. Curva de concentración-respuesta de asperpirona A (**A**) y dianhidroaurasperona C (**B**).

Los resultados obtenidos de esta evaluación revelaron dos inhibidores novedosos de $hPTP1B$: la asperpirona (**2**) presentó una CI_{50} de $65.8 \pm 1.64 \mu M$ y la dianhidroaurasperona C de CI_{50} de $16.4 \pm 5.09 \mu M$. Adicionalmente, en investigaciones que anteceden a este trabajo, se observó que el producto TMC-256A1 (**1**) posee actividad con una CI_{50} de $5.1 \pm 0.3 \mu M$ frente $hPTP1B$ recombinante (Kim *et. al.*, 2020), de forma contraria, en esta evaluación resultó inactivo.

Por otra parte, el compuesto **4** resultó inactivo en esta evaluación, sin embargo, existe evidencia experimental de otros análogos de tipo dicetopiperazina como inhibidores de *h*PTP1B recombinante, por ejemplo, SF5280-415 y SF5280-451 con CI_{50} de $14.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ y $12.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$, respectivamente (Cho *et. al.*, 2018).

7. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento de 66 hongos axénicos provenientes de suelo (saprófitos) y hojas (endófitos), 20 procedentes de la región de Barra de Coyuca y 46 de Marquelia, ambos situados en el estado de Guerrero, México.
- A partir de los aislamientos se obtuvieron los extractos orgánicos, mismos que fueron evaluados mediante un ensayo *in vitro* encontrando que el 18.19% de los 66 extractos de la colección fueron capaces de inhibir a la enzima *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ en más de un 50% a 20 ppm.
- La construcción de la red molecular, alimentada con datos de HRESIMS² provenientes de los extractos orgánicos utilizando la variable de actividad inhibitoria contra *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎, fue de suma importancia pues ya que por medio de ella fue posible realizar una aproximación de los posibles metabolitos que pudieran estar presentes, siendo este complementado con el análisis de la naturaleza química, observando gran diversidad de familias de compuestos. De esta manera, se constató que el hongo establecido como IQ-1620 es un candidato potencial para el estudio químico, debido a que su extracto fue el que mostró la mayor actividad inhibiendo a la proteína *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎ en un 95.35% a una concentración de 20 ppm, sólo se encontró por desreplicación el metabolito Fonsecina y la mayoría de los nodos se encontraban aislados y no pudieron ser clasificados dentro de una familia estructural, al menos en la base de datos de GNPS.
- A partir del estudio químico de IQ-1620, se obtuvieron cinco compuestos puros los cuales fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas: TMC-256A1 (10.7 mg), asperpirona A (4.0 mg), dianhidroaurasperona C (7.8 mg), pestalazina A (2.8 mg) y funalenona (4.1 mg).
- El producto pestalazina A (**4**) fue aislado por primera vez como metabolito de una especie de *Aspergillus* sp.
- Los cinco productos obtenidos fueron evaluados contra la enzima *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎, siendo activos a 20 y 100 ppm la dianhidroaurasperona C, mientras que la asperpirona A únicamente fue activa a 100ppm. Con base en ello se reposicionaron dos metabolitos conocidos como inhibidores de *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎, las nafto- γ -pironas asperpirona A (**2**) y la dianhidroaurasperona C (**3**) con CI_{50} de $65.8 \pm 1.64 \mu\text{M}$ y $16.4 \pm 5.09 \mu\text{M}$, respectivamente. Adicionalmente, la funalenona (**5**) resultó ser un inhibidor conocido de este blanco molecular y el responsable de la actividad en la fracción más activa.

8. REFERENCIAS

- Akiyama, K., Teraguchi, S., Hamasaki, Y., Mori, M., Tatsumi, K., Ohnishi, K., & Hayashi, H. (2003). New Dimeric Naphthopyrones from *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 66(1), 136-139.
- Alegre-Díaz, J., Herrington, W., López-Cervantes, M., Gnatiuc, L., Ramirez, R., Hill, M., Baigent, C., McCarthy, M., Lewington, S., Collins, R., Whitlock, G., Tapia-Conyer, R., Peto, R., Kuri-Morales, P., & Emberson, J. (2016). Diabetes and cause-specific mortality in Mexico City. *New England Journal of Medicine*, 375(20), 1961-1971.
- Aron, A., Gentry, E., McPhail, K., Nothias, L., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J., Ernst, M., Kang, K., Aceves, C., Caraballo-Rodríguez, A., Koester, I., Weldon, K., Bertrand, S., Roullier, C., Sun, K., Tehan, R., Boya P., C. A., Christian, M., Gutiérrez, M., Moreno Ulloa, A., Tejeda, J., Mojica-Flores, R., Lakey-Beitia, J., Vásquez-Chaves, V., Zhang, Y., Calderón, A., Tayler, N., Keyzers, R., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A., Jarmusch, A., Schmid, R., Truman, A., Bandeira, N., Wang, M. & Dorrestein, P. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 15(6), 1954-1991.
- Bang, X., Kun, Z., Lin-zhi, G., Cheng-xiong, L., & Fan, C. (2014). Dimeric Naphthopyrones from *Penicillium oxalicum*, a Fungus Residing in *Acrida cinerea*. *Natural Product Research and Development*, 26(4), 517.
- Bello-Chavolla, O., Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C., & Hernández-Avila, M. (2017). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutrition Reviews*, 75(suppl_1), 4-12.
- Carboué, Q., Maresca, M., Herbette, G., Roussos, S., Hamrouni, R., & Bombarda, I. (2019). Naphtho-gamma-pyrones produced by *Aspergillus tubingensis* G131: New source of natural nontoxic antioxidants. *Biomolecules*, 10(1), 29.
- Chen, G., Zhu, Y., Wang, H., Wang, S., & Zhang, R. (2007). The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomi*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 9(2), 159-164.
- Chen, X., Wang, C., Qiu, H., Yuan, Y., Chen, K., Cao, Z., Xiang, R., Tickner, J., Xu, J., & Zou, J. (2019). Asperpyrone A attenuates RANKL-induced osteoclast formation through inhibiting NFATc1, Ca²⁺ signalling and oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(12), 8269-8279.
- Chen, Z., Fan, Q., Chen, H., Li, Z., Feng, T., & Liu, J. (2015). A novel C25 sterol peroxide from the endophytic fungus *Phoma* sp. EA-122. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(3-4), 93-96.
- Cheng, Z., Pan, J., Tang, W., Chen, Q., & Lin, Y. (2009). Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. *Journal of Forestry Research*, 20(1), 63-72.
- Cho, K., Sohn, J., & Oh, H. (2018). Isolation and structure determination of a new diketopiperazine dimer from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SF-5280. *Natural Product Research*, 32(2), 214-221.
- Dayam, R., Gundla, R., Al-Mawsawi, L., & Neamati, N. (2008). HIV-1 integrase inhibitors: 2005–2006 update. *Medicinal Research Reviews*, 28(1), 118-154.
- Dendup, T., Feng, X., Clingan, S., & Astell-Burt, T. (2018). Environmental risk factors for developing type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 78.
- Deshmukh, S., Agrawal, S., & Gupta, M. (2023). Fungal Metabolites: A Potential Source of Antidiabetic Agents with Particular Reference to PTP1B Inhibitors. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 24(8), 927-945.
- Díaz-Rojas, M., Raja, H., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., & Mata, R. (2021). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry*, 184, 112664.
- Ding, G., Jiang, L., Guo, L., Chen, X., Zhang, H., & Che, Y. (2008). Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus *Pestalotiopsis theae*. *Journal of Natural Products*, 71(11), 1861-1865.
- Ding, L., Münch, J., Goerls, H., Maier, A., Fiebig, H., Lin, W., & Hertweck, C. (2010). Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(22), 6685-6687.

- Ernst, M., Kang, K., Caraballo-Rodríguez, A., Nothias, L., Wandy, J., Chen, C., Wang, M., Rogers, S., Medema, M., Dorrestein, P., & Van Der Hooft, J. (2019). MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*, 9(7), 144.
- Federación Internacional de Diabetes. (2023). *Diabetes en todo el mundo en 2021*. <https://idf.org/about-diabetes/facts-figures/>.
- Gao, W., Han, L., Xie, F., Ma, Q., Li, X., Zhang, J., Zhao, Y., & Luo, D. Q. (2019). A new polyketide-derived metabolite with PTP1B inhibitory activity from the endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta*. *Chemistry of Natural Compounds*, 55, 1056-1058.
- Gong, J., Chen, C., Mo, S., Liu, J., Wang, W., Zang, Y., Li, H., Chai, C., Zhu, H., Hu, Z., Wang, J., & Zhang, Y. (2019). Fusaresters A–E, new γ -pyrone-containing polyketides from fungus *Fusarium* sp. Hungcl and structure revision of fusariumin D. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 17(22), 5526-5532.
- Gubiani, J., Wijeratne, E., Shi, T., Araujo, A., Arnold, A., Chapman, E., & Gunatilaka, A. (2017). An epigenetic modifier induces production of (10' S)-verruculide B, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases by *Phoma* sp. nov. LG0217, a fungal endophyte of *Parkinsonia microphylla*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), 1860-1866.
- He, R., Yu, Z., Zhang, R., & Zhang, Z. (2014). Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(10), 1227-1246.
- Hu, Y., Liu, Y., Guo, E., Wang, Y., Xu, W., Gao, Y., Jiang, X., Feng, F., Liu, W., & Liu, W. (2021). Naphtho- γ -pyrone Dimers from an Endozoic *Aspergillus niger* and the Effects of Coisolated Monomers in Combination with Cisplatin on a Cisplatin-Resistant A549 Cell Line. *Journal of Natural Products*, 84(7), 1889-1897.
- Huang, H., Xiao, Z., Feng, X., Huang, C., Zhu, X., Ju, J., Li, M., Lin, Y., & She, Z. (2011). Cytotoxic Naphtho- γ -pyrones from the Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus tubingensis* (GX1-5E). *Helvetica Chimica Acta*, 94(9), 1732-1740.
- Huo, C., Lu, X., Zheng, Z., Li, Y., Xu, Y., Zheng, H., & Niu, Y. (2020). Azaphilones with protein tyrosine phosphatase inhibitory activity isolated from the fungus *Aspergillus deflectus*. *Phytochemistry*, 170, 112224.
- Ikeda, S. I., Sugita, M., Yoshimura, A., Sumizawa, T., Douzono, H., Nagata, Y., & Akiyama, S. I. (1990). *Aspergillus* species strain m39 produces two naphtho- γ -pyrones that reverse drug resistance in human KB cells. *International Journal of Cancer*, 45(3), 508-513.
- Inokoshi, J., Shiomi, K., Masuma, R., Tanaka, H., Yamada, H., & Omura, S. (1999). Funalenone, a novel collagenase inhibitor produced by *Aspergillus niger*. *The Journal of Antibiotics*, 52(12), 1095-1100.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (24 de Enero de 2023). *Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2022 (preliminar)*. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf>.
- Ji, Y., Zhou, Q., Liu, G., Zhu, T., Wang, Y., Fu, Y., Li, Y., Li, R., Zhang, X., Dong, M., Sauriol, F., Gu, Y., Shi, Q., Lu, X., & Ni, Z. (2021). New protein tyrosine phosphatase inhibitors from fungus *Aspergillus gorakhpurensis* F07ZB1707. *Royal Society of Chemistry Advances*, 11(17), 10144-10153.
- Jia, S., Chi, Z., Liu, G., Hu, Z., & Chi, Z. (2020). Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. *Critical Reviews In Biotechnology*, 40(6), 852-864.
- Jiménez-Arreola, B., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J., & Rivera-Chávez, J. (2020). Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp.(IQ-313) inhibit hPTP1B₁₋₄₀₀: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*, 101, 103893.
- Kim, D., Minh Ha, T., Sohn, J., Yim, J., & Oh, H. (2020). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from a marine-derived fungal strain *Aspergillus* sp. SF-5929. *Natural Product Research*, 34(5), 675-682.
- Kim, D., Minh Ha, T., Sohn, J., Yim, J., & Oh, H. (2020). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from a marine-derived fungal strain *Aspergillus* sp. SF-5929. *Natural Product Research*, 34(5), 675-682.
- Klaiklay, S., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Pakawatchai, C., Saithong, S., Buatong, J., Preedanon, S., & Sakayaroj, J. (2012). Anthraquinone derivatives from the mangrove-derived fungus *Phomopsis* sp. PSU-MA214. *Phytochemistry Letters*, 5(4), 738-742.
- Klamann, L., Boss, O., Peroni, O., Kim, J., Martino, J., Zabolotny, J., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y., Sharpe, A., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G., Neel, B., & Kahn, B. (2000). Increased

- energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5479-5489.
- Krishnan, N., Konidaris, K., Gasser, G., & Tonks, N. (2018). A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1517-1525.
 - Li, H., Huang, H., Shao, C., Huang, H., Jiang, J., Zhu, X., Liu, Y., Liu, L., Lu, Y., Li, M., Lin, Y., & She, Z. (2011). Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1230-1235.
 - Li, K., Chen, S., Pang, X., Cai, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhu, Y., & Zhou, X. (2022). Natural products from mangrove sediments-derived microbes: Structural diversity, bioactivities, biosynthesis, and total synthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 230, 114117.
 - Liu, D., Li, X., Meng, L., Li, C., Gao, S., Shang, Z., Proksch, P., Huang, C., & Wang, B. (2011). Nigerapyrones A–H, α -pyrone derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. *Journal of Natural Products*, 74(8), 1787-1791.
 - Liu, L., Zhang, J., Chen, C., Teng, J., Wang, C., & Luo, D. (2015). Structure and biosynthesis of fumosorinone, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor firstly isolated from the entomogenous fungus *Isaria fumosorosea*. *Fungal Genetics and Biology*, 81, 191-200.
 - Loach, R., Fenton, O., & Movassaghi, M. (2016). Concise Total synthesis of (+)-Asperazine, (+)-Pestalazine a, and (+)-iso-Pestalazine a. Structure revision of (+)-Pestalazine a. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 1057-1064.
 - Martínez-Aldino, I., Villaseca-Murillo, M., Morales-Jiménez, J., & Rivera-Chávez, J. (2021). Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429. *Bioorganic Chemistry*, 115, 105166.
 - Mata, R., Flores-Bocanegra, L., Ovalle-Magallanes, B., & Figueroa, M. (2023). Natural products from plants targeting key enzymes for the future development of antidiabetic agents. *Natural Product Reports*.
 - Organización Mundial de la Salud. (5 de Abril de 2023). *Diabetes*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
 - Pilevneli, A., Ebada, S., Kaşatepe, B., & Konuklugil, B. (2021). Penicacids H–J, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus oryzae*. *Royal Society of Chemistry Advances*, 11(55), 34938-34944.
 - Proença, C., Ribeiro, D., Freitas, M., Carvalho, F., & Fernandes, E. (2022). A comprehensive review on the antidiabetic activity of flavonoids targeting PTP1B and DPP-4: a structure-activity relationship analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(15), 4095-4151.
 - Rivera Chávez Natural Products Research. (4 de Junio de 2020). *Functional Natural Products From Fungi*. <https://sites.google.com/iqumica.unam.mx/rivera-chavezlab/research?authuser=0>.
 - Rivera-Chávez, J., Coporo-Blancas, D., & Morales-Jiménez, J. (2020). One-step partial synthesis of (\pm)-asperteretone B and related hPTP1B1–400 inhibitors from butyrolactone I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(24), 115817.
 - Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C., Zárate-Rojas, E., Villalpando, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2018). Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Pública de México*, 60(3), 224-232.
 - Sakurai, M., Kohno, J., Yamamoto, K., Okuda, T., Nishio, M., Kawano, K., & Ohnuki, T. (2002). TMC-256A1 and C1, new inhibitors of IL-4 signal transduction produced by *Aspergillus niger* var *niger* TC 1629. *The Journal of Antibiotics*, 55(8), 685-692.
 - Shang, Z., Li, X., Li, C., & Wang, B. (2012). Diverse Secondary Metabolites Produced by Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. MA75 on Various Culture Media. *Chemistry & Biodiversity*, 9(7), 1338-1348.
 - Shao, C., Wang, C., Wei, M., Gu, Y., Xia, X., She, Z., & Lin, Y. (2008). Structure elucidation of two new xanthone derivatives from the marine fungus *Penicillium* sp. (ZZF 32#) from the South China Sea. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46(11), 1066-1069.
 - Shiomi, K., Matsui, R., Isozaki, M., Chiba, H., Sugai, T., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Chiba, T., Yan, H., Kitamura, Y., Sugiura, W., Omura, S., & Tanaka, H. (2005). Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 65-68.
 - Vega-López, M., & González-Pérez, G. (2021). Mortalidad por diabetes mellitus y su impacto en la esperanza de vida a los 60 años en México. *Revista de Saúde Pública*, 55, 61.

- Villamar-Cruz, O., Loza-Mejía, M., Arias-Romero, L., & Camacho-Arroyo, I. (2021). Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer. *Bioscience Reports*, 41(11), BSR20211994.
- Wang, K., Wang, S., Wu, B., & Wei, J. (2014). Bioactive natural compounds from the mangrove endophytic fungi. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(4), 370-391.
- Xiao, J., Zhang, Q., Gao, Y., Shi, X., & Gao, J. (2014). Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus* sp. associated with *Melia azedarach*. *Natural Product Research*, 28(17), 1388-1392.
- Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Lin, W., Wu, J., & Proksch, P. (2009). Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Journal of Natural Products*, 72(4), 662-665.
- Yang, R., Dong, Q., Xu, H., Gao, X., Zhao, Z., Qin, J., Chen, C. & Luo, D. (2020). Identification of phomoxanthone A and B as protein tyrosine phosphatase inhibitors. *American Chemical Society Omega*, 5(40), 25927-25935.
- Zhang, J., Meng, L., Wei, J., Fan, P., Liu, S., Yuan, W., Zhao, Y., & Luo, D. Q. (2017). PTP1B inhibitors from the entomogenous fungi *Isaria fumosorosea*. *Molecules*, 22(12), 2058.
- Zhang, S., & Zhang, Z. (2007). PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discovery Today*, 12(9-10), 373-381.
- Zhang, Y., Zhang, W., Hong, D., Shi, L., Shen, Q., Li, J., Li, J., & Hu, L. H. (2008). Oleanolic acid and its derivatives: new inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B with cellular activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(18), 8697-8705.
- Zhou, G., Zhang, X., Shah, M., Che, Q., Zhang, G., Gu, Q., Zhu, T., & Li, D. (2021). Polyhydroxy p-terphenyls from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus candidus* LDJ-5. *Marine Drugs*, 19(2), 82.