



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS α -GLUCOSIDASAS OBTENIDOS DE LAS
ESPECIES FÚNGICAS MEXU 27095, *Xylaria feejeensis* Y *Chaetomium globosum*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. José Alberto Rivera Chávez

Tutora: Dra. Rachel Mata Essayag

Comité Tutor:

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Dra. Adela Rodríguez Romero

Instituto de Química

MÉXICO, D.F., MARZO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Leovigildo Quijano
VOCAL:	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
VOCAL:	Dr. Adolfo Andrade Cetto
VOCAL:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
SECRETARIO:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

CONGRESOS

Hongos endófitos de la especie medicinal *Hintonia latiflora*, una fuente potencial de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. Póster. José Rivera-Chávez, María del Carmen González y Rachel Mata. 8ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (23-25 de Mayo, 2012), Huatulco, Oaxaca, México.

Thielavins A, J and K: α -glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus associated with *Hintonia latiflora*. Póster. José Rivera-Chávez, Martín González-Andrade, María del Carmen González, Anthony Gleen, and Rachel Mata. 2013 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (13-17 de Julio, 2013), St. Louis, Missouri, E.U.A. **Student travel award.**

Thielavins A, J and K: α -glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus associated with *Hintonia latiflora*. Póster. José Rivera-Chávez, Martín González-Andrade, María del Carmen González, Anthony Gleen, and Rachel Mata. QUIMIUNAM 2013, (13-15 de Noviembre, 2013), México D.F., México. **Segundo lugar carteles.**

Hongos endófitos de la especie medicinal *Hintonia latiflora*, una fuente potencial de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. Póster. José Rivera-Chávez, Martín González-Andrade, María del Carmen González, Anthony Gleen, y Rachel Mata. Semana de la Investigación en la Facultad de Química, 2013 (12-16 de Agosto, 2013), México D.F., México. **Segundo lugar carteles.**

Epitiodioxopiperazinas como inhibidores de Calmodulina, aisladas de la especie fúngica *Chaetomium globosum*. Póster. José Rivera-Chávez, Martín González-Andrade, Genoveva García-Aguirre y Rachel Mata. 10ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (21-24 de Mayo, 2014), Mérida, Yucatán, México, 2014.

A novel pestalotin 4'-O-methyl- β -mannopyranoside from the endophytic fungus *Xylaria* sp. Póster. José Rivera-Chávez, María del Carmen González, Anthony Gleen, and Rachel Mata. 2014 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (2-6 de Agosto, 2014), Oxford, Mississippi, E.U.A.

Chaetomin a new calmodulin inhibitor from *Chaetomium globosum*. Póster. José Rivera-Chávez, Martín González-Andrade, Genoveva García-Aguirre y Rachel Mata. 2014 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy (2-6 de Agosto, 2014), Oxford, Mississippi, E.U.A.

ARTÍCULOS

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

Rachel Mata, Mario Figueroa, Martín González-Andrade, José Rivera-Chávez, Abraham Madariaga-Mazón, and Paulina Del Valle., 2015. **Calmodulin inhibitors from natural sources: an update.** *Journal of Natural Products*. DOI: 10.1021/np500954x.

Rivera-Chávez, J., Figueroa, M., González, M.C., Glenn, A.E., Mata, R., 2015. **α -Glucosidase inhibitors from a *Xylaria feejeensis* associated with *Hintonia latiflora*.** *Journal of Natural Products*. DOI: 10.1021/np500897y.

AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, que a través de su **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas** me dio la oportunidad de continuar con mi formación académica y profesional.
- Agradezco especialmente a la **Dra. Rachel Mata** por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Por la dedicación, paciencia y compromiso mostrado durante el desarrollo de este trabajo. Asimismo, por los valiosos consejos brindados, mismos que han servido para ampliar mis horizontes profesionales y personales. Mil gracias Doctora.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado (becario **227165**), y por el financiamiento autorizado a través del proyecto **CONACyT 219765**.
- A las **Doctoras María del Carmen González Villaseñor y Genoveva García Aguirre** del **Instituto de Biología de la UNAM**, por proporcionar el material fúngico para el desarrollo de este proyecto.
- Al **Dr. Anthony Gleen** por la identificación taxonómica de los microorganismos fúngicos utilizados en el presente estudio.
- Al personal técnico de la **Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI, Facultad de Química)**, por los análisis espectroscópicos y espectrométricos.
- Al **Departamento de Supercómputo (Miztli-UNAM) de la Dirección General de Computo y de Tecnologías de Información y Computación** por la asignación de recursos computacionales para la realización de los estudios de modelado molecular.
- A los miembros del comité tutor, **Dra. Martha L. Macías Rubalcava** y **Dra. Adela Rodríguez Romero**, por sus valiosos comentarios, observaciones y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto de investigación.
- A los Doctores **Leovigildo Quijano, Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Adolfo Andrade Cetto, Martha L. Macías Rubalcava** y **Mario Alberto Figueroa Saldívar**, miembros del jurado, quienes revisaron y realizaron observaciones sobre el presente manuscrito, valiosas críticas que sirvieron para enriquecer este trabajo.
- A la **Dra. Isabel Rivero** por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo de investigación, y en especial, por su valiosa amistad.
- Mi más sincera gratitud al **Dr. Mario Alberto Figueroa** del **Departamento de Farmacia de la Facultad de Química** por su apoyo para la realización de los cálculos de modelado molecular, el registro de espectros de RMN, y sobre todo, por la confianza brindada.

- Finalmente, mi más profundo agradecimiento a mi familia, por su comprensión, apoyo, y en especial, por el amor incondicional que siempre me han brindado. Gracias por todo.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE ESQUEMAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. Introducción	6
2. Antecedentes	8
2.1 Microorganismos endófitos	8
2.2 Hongos endófitos como una fuente potencial de productos naturales bioactivos	9
2.3 Criterios de selección de material vegetal útil para el aislamiento de hongos endófitos	11
2.4 Diabetes mellitus: generalidades	16
2.5 Panorama mundial y nacional de la diabetes mellitus	17
2.6 Estrategias empleadas en el tratamiento de la diabetes mellitus	19
2.7 Generalidades sobre las enzimas α -glucosidasas	24
2.8 Agentes inhibidores de las α -glucosidasas	26
2.9 Antecedentes sobre el género <i>Chaetomium</i> (Chaetomiaceae)	30
2.10 Antecedentes sobre el género <i>Xylaria</i> (Xylariaceae)	32
3. Hipótesis	34
4. Justificación y objetivos	35

	Página
5. Parte experimental	38
5.1 Material vegetal	38
5.2 Obtención del material fúngico	38
5.3 Análisis cromatográfico	39
5.4 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	40
5.5 Estudio químico de la especie fúngica MEXU 27095 (Chaetomiaceae)	41
5.5.1 Fermentación	41
5.5.2 Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de MEXU 27095 (Chaetomiaceae)	41
5.5.3 Aislamiento, purificación e identificación de las thielavinas A (171), J (172) y K (173) a partir de la fracción primaria F _{VI}	41
5.5.4 Aislamiento, purificación e identificación de la fimetarona (174) a partir de la fracción primaria F _{IV}	43
5.6 Estudio químico de la especie <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae)	45
5.6.1 Fermentación	45
5.6.2 Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae)	45
5.6.3 Aislamiento, purificación e identificación del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) a partir de la fracción primaria F _{VI}	46
5.6.4 Aislamiento, purificación e identificación de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)-4-hidroximeleina (176), 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -(+)-4-hidroximeleina (177) y 3 <i>S</i> -(+)-8-metoximeleina (178) a partir de la fracción F _{III}	47
5.6.5 Aislamiento, purificación e identificación de la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179), 4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> -4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) y 4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) F _{IV}	48
5.7 Estudio químico del microorganismo fúngico <i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)	50
5.7.1 Fermentación	50

	Página	
5.7.2	Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de <i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)	50
5.7.3	Aislamiento y purificación de la chaetomina (128)	51
5.8	Evaluación <i>in vitro</i> del potencial inhibitorio de los extractos orgánicos, fracciones y productos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas	52
5.9	Estudios de cinética enzimática de productos puros	53
5.10	Evaluación de la eficacia preclínica de la thielavina K (173)	54
5.10.1	Evaluación del potencial antihiper glucémico e hipoglucemiente de la thielavina K (173)	54
5.10.2	Inducción experimental de hiperglucemia	55
5.10.3	Efecto hipoglucemiente agudo de la thielavina K (173)	55
5.10.4	Prueba oral de tolerancia a la sacarosa de la thielavina K (173)	56
5.11	Estudios de acoplamiento molecular	56
5.11.1	Proteínas	56
5.11.2	Preparación de los ligandos	57
5.11.3	Acoplamiento molecular	57
5.12	Cálculos de modelado molecular	58
5.13	Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor <i>bCaM M124C-AF₃₅₀</i>	60
6.	Resultados y discusión	61
6.1	Estrategia general utilizada en el estudio de las especies fúngicas MEXU 27095 (Chaetomiaceae), <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylaraceae) y <i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)	61
6.2	Estudio químico y biológico de la especie fúngica MEXU 27095 (Chaetomiaceae)	63
6.2.1	Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α GHY de los metabolitos aislados de la especie MEXU 27095 (Chaetomiaceae)	64
6.2.2	Estudios de acoplamiento molecular de los productos 171-173	69
6.2.3	Evaluación del potencial antihiper glucémico e hipoglucemiente <i>in vivo</i> de la thielavina K (173)	72

	Página	
6.3	Estudio químico biodirigido de la especie fúngica <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae)	77
6.3.1	Caracterización de los metabolitos secundarios de <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae)	77
6.3.1.1	Elucidación estructural del producto 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175)	78
6.3.1.2	Elucidación estructural del producto 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)-4-hidroximeleina (176)	85
6.3.2	Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α <i>GHY</i> de los metabolitos aislados de <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae)	89
6.3.3	Estudios de acoplamiento molecular de los productos 176 y 177	89
6.4	Estudio químico biodirigido de la especie fúngica <i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)	91
6.4.1	Elucidación estructural de la chetomina (128)	92
6.4.2	Evaluación del efecto inhibitorio de la chaetomina (128) sobre la actividad de la enzima α <i>GHY</i>	93
6.4.3	Estudios de acoplamiento molecular de la chaetomina (128) con la enzima α <i>GHY</i>	93
6.4.4	Evaluación de la interacción chaetomina (128)-calmodulina a través de ensayos de apagamiento de la fluorescencia	94
6.4.5	Estudios teóricos de acoplamiento molecular de la chaetomina (128) con la calmodulina	96
7.	Conclusiones	99
8.	Bibliografía	100
9.	ANEXO I	110
10.	ANEXO II	161
11.	PUBLICACIONES	165

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos.	12
Cuadro 2. Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos a partir de la fermentación de los hongos endófitos de <i>H. latiflora</i> en diferentes condiciones de cultivo.	62
Cuadro 3. Parámetros de inhibición y cinética enzimática de los productos 171-173 y acarbosa.	69
Cuadro 4. Datos espectroscópicos del producto 175 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 500 MHz, ¹³ C 125 MHz).	79
Cuadro 5. Constantes de acoplamiento (¹ H- ¹ H) experimentales y calculadas para el producto 175.	85
Cuadro 6. Datos espectroscópicos de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)-4-hidroximeleina (176) en MeOH- <i>d</i> ₄ (¹ H 400 MHz, ¹³ C 100 MHz).	86

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Reacción de hidrólisis del <i>p</i> NPG en presencia de una α -glucosidasa.	65
Esquema 2. Equilibrio de la enzima α GHY en presencia y ausencia de las thielavinas (inhibidores reversibles no competitivos).	67
Esquema 3. Equilibrio de la enzima α GHY en presencia y ausencia de acarbosa (inhibidor competitivo).	68
Esquema 4. Diseño racional de biosensores de CaM.	96

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fármacos derivados de microorganismos aprobados por la FDA en el periodo comprendido entre 2008 y 2013.	7
Figura 2. Relación costo-beneficio establecida entre un hongo endófito y su planta hospedera. (A) Teoría del antagonismo balanceado. (B) Enfermedad provocada por un hongo patógeno. (C) Reciprocidad endófito-patógeno. (D) Estrategia de supervivencia de un hongo endófito. (E) Sinergismo balanceado. Tomado y editado de: <i>Chemistry & Biology</i> , 2012, 19, 792-798.	9
Figura 3. Principales complicaciones de la DM.	17
Figura 4. Número de personas con DMTII por región de la IDF. Tomado de: IDF Atlas, 6 ed. Revisión 2014.	18
Figura 5. Ejemplos selectos de modalidades terapéuticas usadas en el tratamiento de la DMTII.	20
Figura 6. Mecanismo enzimático de hidrólisis de enlaces <i>O</i> -glicosídicos. En color naranja se representa el residuo de ácido aspártico (Asp). En color rojo se representa el residuo de ácido glutámico (Glu).	25
Figura 7. Principales tipos de sitios catalíticos encontrados en las glicosil-hidrolasas de la familia GH13. (A) Hueco (enzimas de tipo I). (B) Hendidura (enzimas de tipo IV).	26
Figura 8. Ejemplos selectos de inhibidores de α -glucosidasas. Plantas medicinales (naranja); microorganismos (azul); síntesis (negro).	28
Figura 9. Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas aislados de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana. <i>L. porteri</i> (verde); <i>A. indica</i> (rojo); <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> (negro); <i>B. cavanillesii</i> (morado); <i>I. batatas</i> (azul marino), y <i>M. charantia</i> (naranja).	29
Figura 10. Ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos aislados de especies del género <i>Chaetomium</i> (Chaetomiaceae).	30
Figura 11. Ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos aislados de especies del género <i>Xylaria</i> (Xylariaceae).	32
Figura 12. Hojas y flor de <i>Hintonia latiflora</i> (Rubiaceae); Fotografía tomada por Sol Cristians Niizawa.	38

	Página
Figura 13. (A) Especie fúngica MEXU 27095 (Chaetomiaceae). (B) Especie fúngica <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae). (C) Especie fúngica <i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae).	39
Figura 14. Cromatograma de la fracción secundaria F _{VI-4} .	42
Figura 15. Cromatograma de la fracción primaria F _{IV} .	44
Figura 16. Cromatograma de la fracción primaria F _{VI} .	46
Figura 17. Cromatograma de la fracción primaria F _{VI} .	47
Figura 18. Cromatograma de la fracción primaria F _{IV} .	49
Figura 19. Cromatograma de la fracción primaria F _{IV} .	51
Figura 20. Efecto de los extractos orgánicos (250 ppm) de los hongos endófitos de <i>Hintonia latiflora</i> sobre la actividad de las enzimas α GHY (barras azules) y CR (barras naranjas). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).	62
Figura 21. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de MEXU 27095 (Chaetomiaceae).	64
Figura 22. Curvas concentración-respuesta del efecto de los compuestos: (A) acarbosa, (B) thielavina A (171), (C) thielavina J (172) y (D) thielavina K (173) sobre la actividad de la enzima α GHY.	66
Figura 23. Gráficos de doble recíprocos de Linewaver-Burk de los compuestos: (A) acarbosa, (B) thielavina A (171), (C) thielavina J (172) y (D) thielavina K (173) sobre la actividad de la enzima α GHY.	67
Figura 24. Gráficos de Linewaver-Burk para: (A) acarbosa y (B) thielavina J (172) ilustrando el tipo de inhibición sobre la actividad de la enzima α GHBs.	68
Figura 25. Modelo estructural generado para los complejos: (A) acarbosa (bastones amarillos)- α GHBs, (B) thielavina A (171, bastones morados)- α GHBs, (C) thielavina J (172, bastones azules)- α GHBs y (D) thielavina K (173, bastones naranjas)- α GHBs. En líneas color azul claro se muestran los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de cada uno de los productos. Gráficos generados con PyMol.	71
Figura 26. Modelo estructural generado para los complejos: (A) acarbosa (bastones amarillos)- α GHBs, (B) thielavina A (171, bastones morados)- α GHBs, (C) thielavina J (172, bastones azul rey)- α GHBs y (D) thielavina K (173, bastones naranjas)- α GHBs. En líneas azul claro se muestran los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de cada uno de los productos. Gráficos generados con PyMol.	72

	Página
Figura 27. Efecto antihiper glucémico de la thielavina K (173) en ratones sanos. (A) Gráfica general, (B) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 3.1 mg/kg), (C) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 10.0 mg/kg), (D) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 31.6 mg/kg). * $p \leq 0.05$ en comparación a la SSI. (E) Gráfico de área bajo la curva. Cada barra o punto representa el promedio \pm EE para los animales de cada grupo.	75
Figura 28. Efecto antihiper glucémico de la thielavina K (173) en ratones hiper glucémicos. (A) Gráfica general, (B) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 3.1 mg/kg), (C) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 10.0 mg/kg), (D) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 31.6 mg/kg). * $p \leq 0.05$ en comparación a la SSI. (E) Gráfico de área bajo la curva. Cada barra o punto representa el promedio \pm EE para los animales de cada grupo.	75
Figura 29. Efecto hipogluce miente agudo de la thielavina K (173) en ratones sanos. (A) Gráfica general, (B) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 3.1 mg/kg), (C) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 10.0 mg/kg), (D) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 31.6 mg/kg). * $p \leq 0.05$ en comparación a la SSI. (E) Gráfico de área bajo la curva. Cada barra o punto representa el promedio \pm EE para los animales de cada grupo.	76
Figura 30. Efecto hipogluce miente de la thielavina K (173) en ratones hiper glucémicos. (A) Gráfica general, (B) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 3.1 mg/kg), (C) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 10.0 mg/kg), (D) SSI <i>vs</i> thielavina K (173, 31.6 mg/kg). * $p \leq 0.05$ en comparación a la SSI. (E) Gráfico de área bajo la curva. Cada barra o punto representa el promedio \pm EE para los animales de cada grupo.	76
Figura 31. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de <i>Xylaria feejeensis</i> (Xylariaceae).	77
Figura 32A. Espectros de ^1H -RMN del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175, 500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄).	79
Figura 32B. Espectros de ^{13}C -RMN del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175, 500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄).	80
Figura 33. Espectro ROESY del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175).	80
Figura 34. Espectro de HMBC del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175).	81
Figura 35. Estructuras de mínima energía de los cuatro posibles diastereoisómeros de 175.	83

	Página
Figura 36: Comparación entre los espectros de DC calculados (línea azul, 175a; línea verde 175c) y experimental (línea roja) para el producto 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175).	83
Figura 37. (A) Espectro de ¹ H-RMN de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)-4-hidroximeleina (176, 400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄). (B) Espectro de ¹ H-RMN de la 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -(+)-4-hidroximeleina (177, 500 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄).	86
Figura 38. Estructura de los cuatro posibles diastereoisómeros del producto 176.	87
Figura 39. Comparación entre los espectros de DC calculados (línea azul) y experimental para la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)-4-hidroximeleina (176, línea roja) y la 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -(+)-4-hidroximeleina (177, línea verde).	88
Figura 40. Curvas concentración-respuesta de la inhibición de enzima α <i>GHY</i> por los productos (A) 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)-4-hidroximeleina (176) y (B) 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -(+)-4-hidroximeleina (177).	89
Figura 41. (A) Modelo estructural generado para los complejos isomaltosa (bastones amarillos)-α <i>GHY</i> , 176 (bastones azules)-α <i>GHY</i> y 177 (bastones naranjas)-α <i>GHY</i> . (B) Aminoácidos involucrados en la interacción de 176 (bastones azules) con la enzima α <i>GHY</i> (líneas azul claro). (C) Aminoácidos involucrados en la interacción de 177 (bastones naranjas) con la enzima α <i>GHY</i> (líneas azul claro). Gráficos generados con PyMol.	90
Figura 42. Curvas concentración-respuesta de la inhibición de la enzima α <i>GHY</i> por el extracto orgánico de <i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae).	91
Figura 43. Ciclo redox entre la especie reducida (ditiol) y oxidada (puente disulfuro) de una EPT.	92
Figura 44: Curva concentración-respuesta de la inhibición de la actividad de la enzima α <i>GHY</i> por la chaetomina (128).	93
Figura 45. (A) Modelo estructural generado para el complejo chaetomina (128, bastones naranjas)-α <i>GHY</i> en la superficie de la proteína. (B) Aminoácidos involucrados en la interacción de la chaetomina (128, bastones naranjas) con la enzima α <i>GHY</i> (líneas azul claro). Gráficos generados con PyMol.	94
Figura 46. Estructura tridimensional de la calmodulina (CaM), obtenida del Proteín Data Banck; código PDB: 1CLL.	95
Figura 47. Espectros de fluorescencia y curvas de titulación del biosensor <i>b</i> CaM M124C- <i>AF</i> ₃₅₀ con (A) TFP y (B) chaetomina (128).	98

Figura 48. La figura a la derecha muestra los sitios de unión del producto KAR-2 (bastones amarillos) y chaetomina (**128**, bastones naranjas) con la CaM. La figura superior a la izquierda muestra el sitio de unión modelado para la el producto KAR-2. La figura inferior izquierda muestra el sitio de unión modelado para la chaetomina (**128**). Las líneas azul claro representan los aminoácidos involucrados en la interacción de cada uno de los productos con la CaM. Gráficos generados con PyMol.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abrviatura	Significado
$[\alpha]_D$	Rotación óptica específica
^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear protónica
Å	Angström
AF_{350}	Alexa 350
APD	Agar Papa-Dextrosa
CaM	Calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CH_2Cl_2	Cloruro de metileno
CH_3CN	Acetonitrilo
CH_3OH	Metanol
$\text{CH}_3\text{OH}-d_4$	Metanol deuterado
CI_{50}	Concentración inhibitoria cincuenta
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CPD	Caldo Papa-Dextrosa
d	Señal doble
DC	Dicroísmo circular
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de dobles de dobles
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
dt	Doble de triples
EM-AR	Espectrometría de masas de alta resolución
EM-ESI	Espectrometría de masas modalidad de ionización electrospray
EM-IE	Espectrometría de masas modalidad de ionización impacto electrónico
FDA	Food and Drug Administration
Gli	Glibenclamida

Abrviatura	Significado
h	Hora
Hex	Hexano
Hz	Hertz
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k_d</i>	Constante de disociación
kg	Kilogramo
<i>k_i</i>	Constante de inhibición
m	multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio anhidro
nm	Nanómetro
nM	Concentración nanomolar
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p.o.</i>	Administración oral
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDB	Protein Data Bank
ppm	Partes por millón
q	Cuarteto
s	Señal simple
t	Señal triple
td	Triplete de dobles
TDDFT	Teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo

Abrviatura	Significado
TFP	Trifluoroperazina
UV	Ultravioleta
α GHBs	Alfa glucosidasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
α GHY	Alfa glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ak_i	Constante de inhibición no competitiva
δ	Desplazamiento químico
μ g	Microgramo
μ L	Microlítro
μ M	Concentración micromolar

RESUMEN

La presente investigación se realizó como parte de un programa multidisciplinario encaminado a la obtención de nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas, a partir de microorganismos fúngicos, de utilidad para el desarrollo de fármacos antidiabéticos. Las especies seleccionadas comprenden dos hongos endófitos de la especie medicinal *Hintonia latiflora*, MEXU 27095 (Chaetomiaceae) y *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae), y un microorganismo patógeno del maíz, *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae).

El estudio químico biodirigido del extracto orgánico de la especie MEXU 27095 (Chaetomiaceae) cultivada en medio sólido APD permitió el aislamiento de la mezcla P/M-fimetarona (174), así como tres tridépsidos identificados como thielavina A, J y K (171-173, respectivamente). Los productos 171-173 inhibieron la actividad de la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración con valores de CI_{50} de 23.8, 15.8 y 22.1 μ M, respectivamente. Su acción inhibitoria fue mejor que la de la acarbosa (CI_{50} =514 μ M), usada como control positivo. Los estudios de cinética enzimática permitieron establecer que los tres productos se comportan como inhibidores no competitivos con valores de k_i de 27.8, 66.2 y 55.4 μ M, respectivamente, mientras que la acarbosa se comportó como un inhibidor competitivo con un valor de k_i = 156.1 μ M. La thielavina J (172) inhibió también la actividad de la enzima α GHBs con un valor de CI_{50} de 30.5 μ M, siendo menos activa que la acarbosa (CI_{50} =0.015 μ M), en este caso ambos productos se comportaron como inhibidores no competitivos. Los estudios de acoplamiento molecular de los productos 171-173 y acarbosa con la enzima α GHBs construida por homología y la enzima α GHY (código PDB: 3A4A) predijeron que los productos se unen a éstas en un lugar cercano al sitio catalítico. La actividad inhibitoria de la thielavina K (173) sobre las enzimas α -glucosidasas se confirmó *in vivo* ya que este producto provocó una disminución del pico postprandial de glucosa en una PTOS, tanto en ratones sanos como en animales hiperglucémicos.

El análisis del extracto orgánico de la especie *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae), permitió el aislamiento de dos metabolitos secundarios descritos por primera vez en la literatura y que se caracterizaron como el 6S,7S-4'-O-metil- β -D-manopiranosido de

pestalotina (175) y la 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (176). De manera adicional, se aislaron la 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (177), la 3*S*-(+)-8-metoximeleina (178), la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179), la 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) y la 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181). La estructura química de los productos 175 y 176 se estableció usando un conjunto de métodos espectroscópicos y espectrométricos. La configuración absoluta de los productos 175 y 176 se determinó empleando la técnica de DC combinada con cálculos computacionales utilizando TDDFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. En el caso del producto 175, la comparación de la constante de acoplamiento ($^3J_{6-7}$) experimental con aquella obtenida a partir de cálculos teóricos empleando el mismo nivel de teoría, proporcionó información adicional para la asignación de la configuración absoluta del centro estereogénico C-7. Los productos 176 y 177, inhibieron la actividad de la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración con valores de CI_{50} de 441 y 549 μ M, respectivamente. Su potencia fue comparable con la de la acarbosa. Los estudios de acoplamiento molecular indicaron que ambos productos se podrían unir a la enzima en un sitio distinto al dominio catalítico, lo cual puede implicar una inhibición de tipo alostérica.

La investigación química del microorganismo *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae) condujo al aislamiento de la chaetomina (128). La estructura química del producto se dedujo a través del análisis de sus espectros de RMN uni y bidimensionales y EM-AR-ESI. La chaetomina (128) inhibió a la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración, con una CI_{50} de 14.30 μ M. Los estudios de acoplamiento molecular predijeron que el producto 128 se une a la enzima en el sitio catalítico. Por otra parte, estudios de apagamiento de la fluorescencia, utilizando el biosensor *h*CaM M124C-*AF*₃₅₀, permitieron comprobar que la chaetomina (128) tiene gran afinidad por la CaM. La k_d calculada fue de 57 nM, 11 veces más afín que la TFP (190) [$k_d = 627$ nM], usada como control positivo. Los resultados obtenidos a partir de los estudios de acoplamiento molecular indicaron que la chaetomina (128) se une a la CaM de manera no clásica, en un sitio similar al del producto KAR-2 (191), un antitumoral

derivado de la vinblastina. Estos resultados podrían dar sustento a las propiedades citotóxicas de la chaetomina (128).

ABSTRACT

The present investigation was conducted as part of a multidisciplinary program aimed at the discovery of new α -glucosidase inhibitors from fungal microorganisms, useful for the development of antidiabetic drugs. The species selected with this propose included two endophytic fungi, isolated from *Hintonia latiflora* [MEXU 27095 (Chaetomiaceae) and *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae)] and a pathogen of maize (*Chaetomium globosum*, Chaetomiaceae).

Bioassay-guided fractionation of the active organic extract obtained from solid-media culture of MEXU 27095, led to the separation of *P/M*-fimetarone (**174**) as well as three tridepsides which were identified as thielavins A (**171**), J (**172**) and K (**173**). Compounds **171-173** inhibited *Saccharomyces cerevisiae* α -glucosidase (α GHY) in a concentration-dependent manner with IC₅₀'s of 23.8, 15.8, and 22.1 μ M, respectively. The inhibitory action of **171-173** was higher than that of acarbose (IC₅₀ = 545 μ M), used as positive control. Kinetic analysis revealed that compound **171-173** acted as non-competitive inhibitors with k_i 's values of 27.8, 66.2 and 55.4 μ M, respectively; acarbose behaved as competitive inhibitor with a k_i value of 156.1 μ M. Thielavin J (**172**) inhibited the activity of α -glucosidase from *Bacillus stearothermophilus* (α GHBs) with an IC₅₀ of 30.5 μ M, being less active than acarbose (IC₅₀ = 0.015 μ M); in this case compound **172** (k_i = 20.0 μ M) and acarbose (k_i = 0.008 μ M) behaved as non-competitive inhibitors. Docking analysis predicted that **171-173** and acarbose bind to α GHBs and α GHY (PDB: 3A4A) in a pocket close to the catalytic site for maltose and isomaltose, respectively. The α -glucosidase inhibitory properties of compound **173** were corroborated *in vivo* since it induced a noted antihyperglycemic action during an oral sucrose tolerance test in normal and diabetic mice.

Two new compounds, pestalotin 6*S*,7*S*-4'-*O*-methyl- β -D-mannopyranoside (**175**) and 3*S*,4*R*-(+)-4-hydroxymellein (**176**) were isolated from an organic extract of a *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae). In addition, the known compounds 3*S*,4*S*-(+)-4-hydroxymellein (**177**), 3*S*-(+)-8-methoxymellein (**178**) and the quinone derivatives 2-hydroxy-5-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (**179**), 4*S*,5*S*,6*S*-4-hydroxy-3-

methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one (**180**), and 4*R*,5*R*-dihydroxy-3-methoxy-5-methylcyclohexen-2-en-1-one (**181**), were obtained. The structure of **175** and **176** were elucidated using a set of spectroscopic and spectrometric techniques. The absolute configuration of the stereogenic centers of **175** and **176** was determined using CD spectroscopy combined with TDDFT calculations. In the case of **175**, comparison of the experimental and theoretical $^3J_{6-7}$ coupling constants provided further evidence for the stereochemical assignments. Compounds **176** and **177** inhibited α *GHY*, with IC₅₀ values of 441 and 549 μ M, respectively. Their activity was comparable to that of acarbose (IC₅₀ = 545 μ M), used as positive control. Molecular docking predicted that both compounds bind to α *GHY* in a site different to the catalytic domain, which could imply an allosteric type of inhibition.

Bioassay-guided fractionation of an active organic extract of *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae), a maize pathogenic fungus, led to the separation of the epipolythiodioxopiperazine alkaloid chaetomine (**128**). The alkaloid inhibited the activity of α *GHY* in a concentration dependent manner with an IC₅₀ of 14.30 μ M. Docking analysis predicted that **128** bind to the enzyme at the catalytic center. Compound **128** also bind to the *h*CaM M124C-*AF350* biosensor with a k_d value of 57 nM, eleven-fold higher than TFP (**190**). Molecular docking predicted that **128** interacted with Ca²⁺-*h*CaM in similar manner to KAR-2 (**191**). The anti-CaM properties of **128** can be related with its cytotoxic activity.

1. Introducción

Los productos naturales (PN) derivados de plantas han desempeñado un papel importante en el tratamiento de numerosas enfermedades por milenios. Sin embargo, desde la obtención de la penicilina a partir de *Penicillium notatum* a principios del siglo XX (Fleming, 1929), los microorganismos fúngicos se han convertido también en una de las principales fuentes de moléculas bioactivas. De tal forma que la investigación química y farmacológica del reino fúngico es de gran interés (Demain y Sanchez, 2009).

Los microorganismos en general producen la mayoría de los fármacos de mayor importancia en la terapéutica contemporánea. La amplia diversidad estructural mostrada por los metabolitos bacterianos y fúngicos se refleja en las actividades farmacológicas tan variadas de éstos. Así, muchos son antibióticos y fungicidas (penicilina, eritromicina, tetraciclina, vancomicina, amfotericina, etc.), otros anticancerígenos (daunorubicina, doxorubicina, mitomicina, etc.) e inmunosupresores (ciclosporina, rapamicina, etc.) y, los menos, antihipercolesterolemiantes (lovastatina y mevastatina) o antidiabéticos (acarbose). Cabe destacar que su pronto desarrollo como fármacos se debe en gran medida a sus excelentes propiedades farmacocinéticas (Farnet y Zazopoulos, 2005).

Recientemente, diversos laboratorios farmacéuticos importantes han lanzado al mercado varios productos derivados de microorganismos; algunos ejemplos son el ceftobiprol, un derivado de cefalosporina aislado de hongos del género *Acremonium*, eficaz contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina (Fernandez et al., 2010); el umirolimus, un inmunosupresor derivado del sirolimus obtenido de *Streptomyces hygroscopicus* (Christiansen et al., 2013; Sprimont et al., 2014); el tebipemen, un producto de semisíntesis de la thienamicina, obtenida de *Streptomyces catleya* (Kahan et al., 1979; Kato et al., 2010); la telavancina, un derivado de la vancomicina obtenida de la especie *Nocardia orientalis* (Song et al., 2013); la romidepsina, un péptido cíclico producido por la bacteria *Chromobacterium violaceum*, y que resultó eficaz para el tratamiento del cáncer de piel (Shigematsu et al., 1994; Nakajima et al., 1998), y por último el fingolimod, un derivado la miriocina, aislada de la especie fúngica *Isaria sinclairii* y de utilidad para el

tratamiento de la esclerosis múltiple (Peláez et al., 2000; Sanchez et al., 2003) [Figura 1]. Cabe mencionar que los ejemplos antes señalados fueron aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre Enero de 2008 y Diciembre de 2013 (Butler et al., 2014).

En términos de biodiversidad, el reino fúngico constituye uno de los más bastos. Un estudio reciente sugiere que existen entre 1.5 y cinco millones de especies fúngicas, de las cuales, sólo han sido identificadas alrededor del 5 % y un número aún menor han sido estudiados desde el punto de vista químico (Pearce, 2011). En este contexto, es evidente que existen muchos microorganismos fúngicos por estudiar, con la finalidad de obtener nuevos metabolitos secundarios. Asimismo, un estudio realizado por Ito y colaboradores en 2011 (Ito et al., 2011) demostró que cada microorganismo puede producir entre uno y tres metabolitos nuevos. Tomando en cuenta estos datos, se estima que el reino fúngico tiene una reserva potencial de entre cinco y 15 millones de nuevos productos naturales, útiles en los campos de la medicina, agricultura e industria alimentaria (Pearce, 2011). Por lo tanto, la exploración de diferentes nichos ecológicos (ambientes terrestres y marinos) puede conducir al descubrimiento de nuevos microorganismos y prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos.

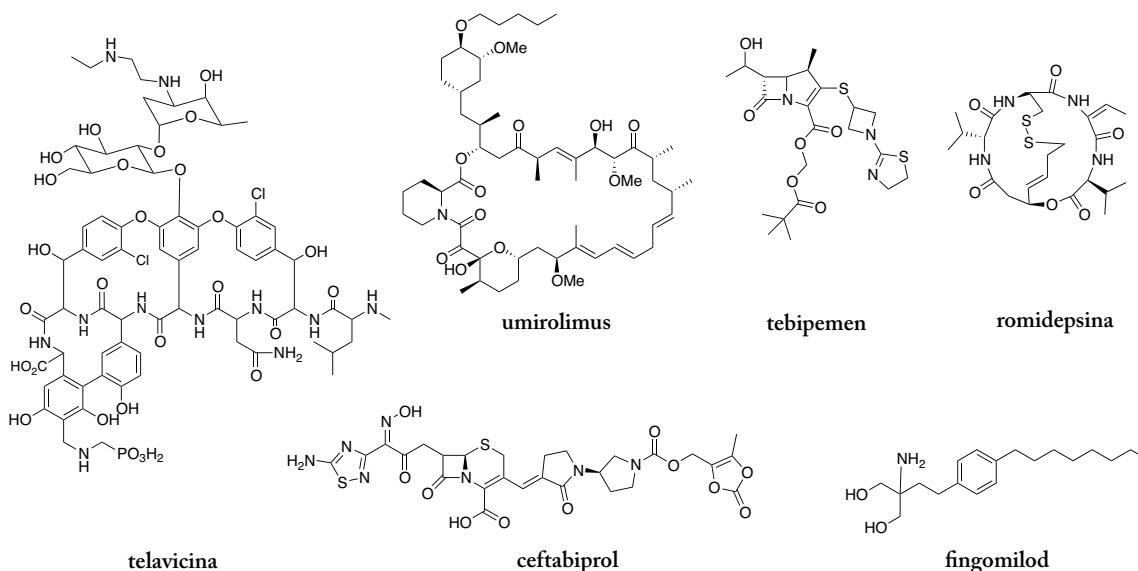


Figura 1. Fármacos derivados de microorganismos aprobados por la FDA en el periodo comprendido entre 2008 y 2013.

2. Antecedentes

2.1 Microorganismos endófitos

El término endófito (*endon*: dentro, *phyton*: planta) se refiere a cualquier microorganismo (bacterias, algas, protozoarios unicelulares y hongos) que colonicen, intracelular o extracelularmente, los tejidos de una planta sin causar un daño aparente (Strobel et al., 2004a; Schulz y Boyle, 2005; Rodríguez et al., 2009). Así, la relación microorganismo-planta hospedera se refiere a una asociación costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, que se establece dentro de los tejidos de los distintos órganos de la planta hospedera (Spiteller et al., 2012).

La relación establecida entre el endófito y su planta hospedera puede ir desde un estado de patogénesis latente hasta una simbiosis mutualista (Tan y Zou, 2001). En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos potencialmente tóxicos: el endófito produce factores de virulencia como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas tanto químicas como bioquímicas. Por ende, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado (**Figura 2**) que depende de la virulencia del endófito y las defensas de la planta (Tan y Zou, 2001; Schulz y Boyle, 2005; Sánchez-Fernández et al., 2013).

Desde el punto de vista ecológico, el estado de antagonismo balanceado entre un microorganismo endófito y su hospedera da origen a una relación mutualista, en la que el endófito toma nutrientes y protección de su hospedera, y algunos de ellos, en retribución, producen metabolitos secundarios que pueden beneficiarla, induciendo su crecimiento, aumentando su tolerancia a condiciones de estrés y/o brindándole protección contra herbívoros y microorganismos fitopatógenos (Strobel et al., 2004a; Sánchez-Fernández et al., 2013).

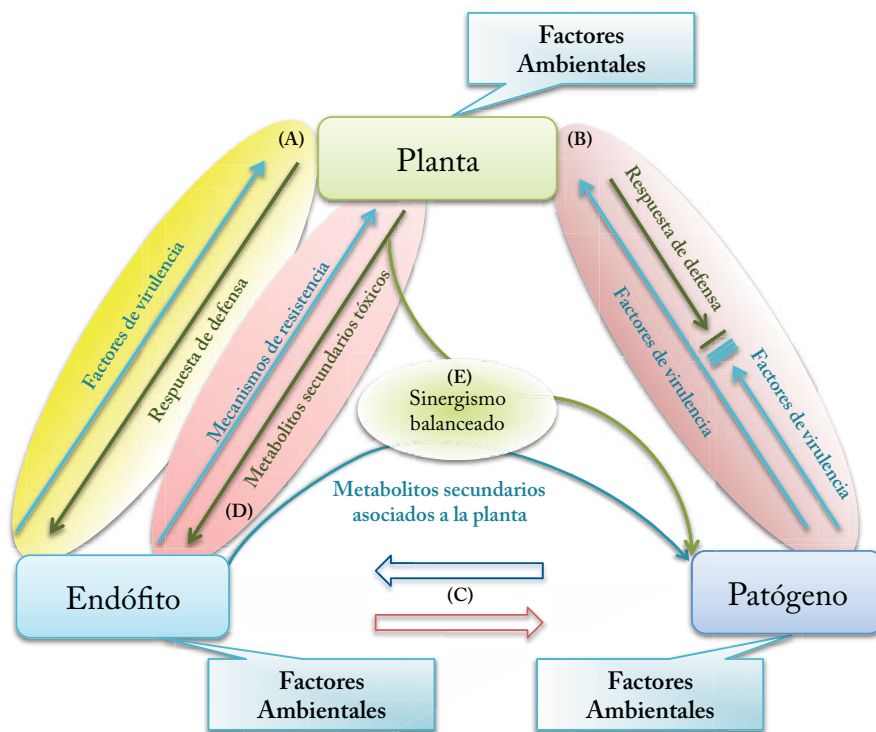


Figura 2. Relación costo-beneficio establecida entre un hongo endófito y su planta hospedera. (A) Teoría del antagonismo balanceado. (B) Enfermedad provocada por un hongo patógeno. (C) Reciprocidad endófito-patógeno. (D) Estrategia de supervivencia de un hongo endófito. (E) Sinergismo balanceado. Tomado y editado de: Chemistry & Biology, 2012, 19, 792-798.

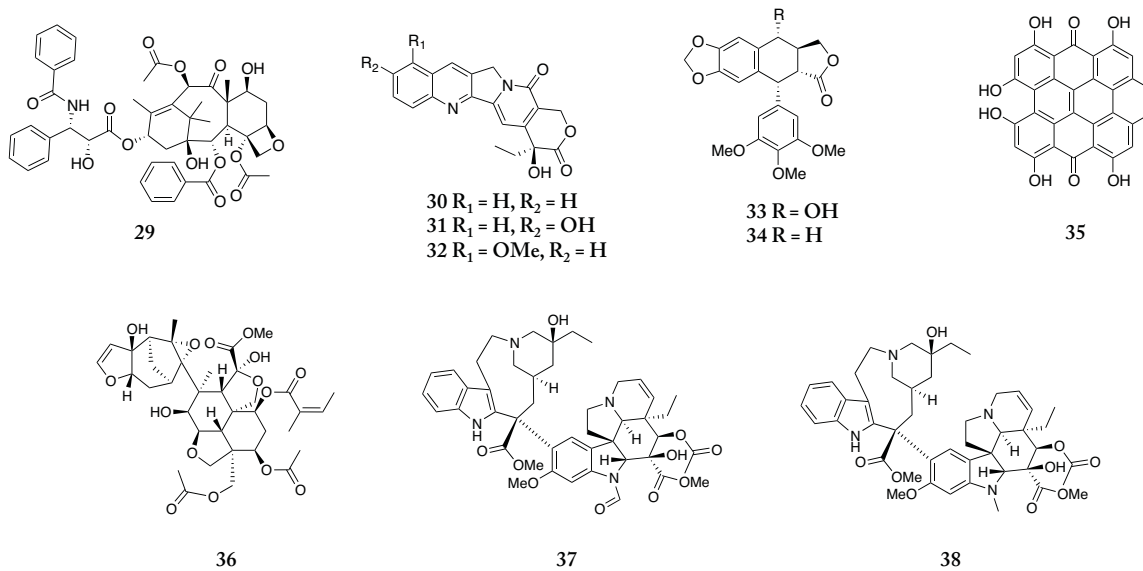
2.2 Hongos endófitos como una fuente potencial de productos naturales bioactivos

Los hongos endófitos son un grupo diverso de microorganismos que pueden desarrollarse asintómicamente ya sea en las partes aéreas (corteza, tallos y hojas) o subterráneas (raíces) de una planta (Kusari et al., 2012; Rodríguez et al., 2009; Sánchez-Fernández et al., 2013; Schulz et al., 2002; Strobel y Daisy et al., 2003). Muchos hongos endófitos tienen la habilidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, como resultado de la asociación costo-beneficio establecida entre el hongo y la hospedera. Por esta razón, estos microorganismos son considerados una fuente potencial valiosa para el descubrimiento de moléculas bioactivas novedosas, con una aplicación potencial en la medicina, la agricultura y la industria de alimentos (Strobel et al., 2004b; Gunatilaka, 2006; Verma et al., 2008). De hecho, un estudio realizado por Schulz y colaboradores en 2002 indicó que el 51 % de las moléculas bioactivas obtenidas a partir de

hongos endófitos resultaron inéditas, en comparación con el 38 % obtenidas a partir de microorganismos de la microflora de suelo (Schulz et al., 2002; Strobel, 2003).

Los metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos tienen una amplia diversidad química e incluyen: alcaloides, péptidos, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides y lignanos, fenoles y ácidos fenólicos, compuestos alifáticos y lactonas, entre otros (Tan y Zou, 2001; Strobel, 2003; Li et al., 2005; Gallo et al., 2008; Joseph y Priya, 2011). En el Cuadro 1 se muestran algunos ejemplos selectos de metabolitos secundarios biodinámicos obtenidos a partir de hongos endófitos.

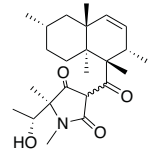
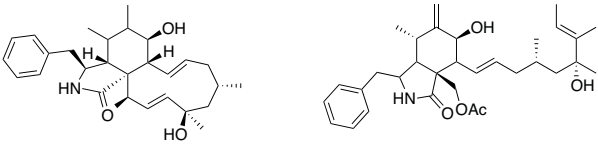
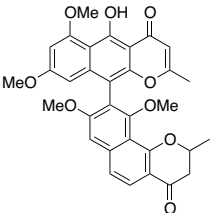
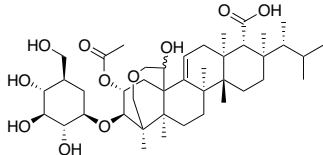
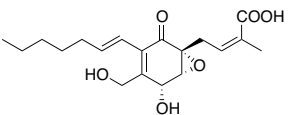
Sin duda alguna, una de las principales razones por las cuales se intensificó el estudio de hongos endófitos como fuentes de moléculas bioactivas se relaciona con la capacidad de algunos de estos organismos de biosintetizar los metabolitos activos de su planta hospedera. Así, desde el descubrimiento del compuesto anticancerígeno Taxol® (29) a partir de *Taxomyces andreanae*, un hongo endófito de *Taxus brevifolia* (Stierle et al., 1993), se han realizado numerosas investigaciones encaminadas a la identificación de endófitos como fuente de moléculas producidas por plantas. Dentro de estos esfuerzos se han encontrado varias cepas de hongos asociadas a *Camptotheca acuminata* productoras de camptotecina (30) y sus análogos 10-hidroxicamptotecina (31) y 9-metoxicamptotecina (32) [Puri et al., 2005; Kusari, Zühlke, et al., 2009; Shweta et al., 2010]. Asimismo, se han identificado varios hongos productores de podofilotoxina (33) [Eyberger et al., 2006; Puri et al., 2006] y desoxipodofilotoxina (34) [Kusari, Lamshöft, et al., 2009], dos sustancias aisladas de la especie vegetal *Podophyllum peltatum*. Otros ejemplos relevantes son los hongos productores del antidepresivo hipericina (35), sustancia aislada de *Hypericum perforatum* (Kusari et al., 2008), la azadiractina A (36), un insecticida aislado de la especie vegetal *Azadirachta indica* (Kusari et al., 2012) y los alcaloides de la vinca (*Catharanthus roseus*), vincristina (37) y vinblastina (38) [Kumar et al., 2013], por mencionar algunos ejemplos relevantes.



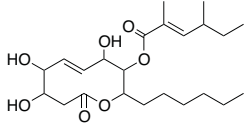
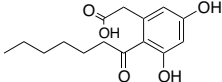
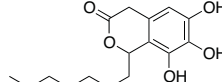
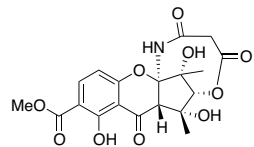
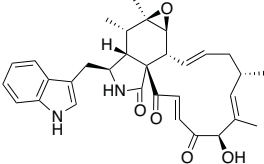
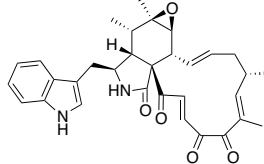
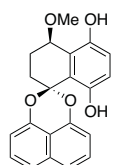
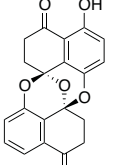
2.3 Criterios de selección de material vegetal útil para el aislamiento de hongos endófitos

Las especies vegetales que han resultado de mayor utilidad para el aislamiento de hongos endófitos novedosos y apropiados para la obtención de productos biodinámicos incluyen: 1) aquellas que se desarrollan sin síntomas de enfermedad, pero rodeadas por otras especies infectadas por patógenos; 2) especies que crecen en zonas de alta biodiversidad o se desarrollan en ambientes únicos; 3) plantas medicinales; 4) y por último, plantas que poseen una longevidad inusual (Sánchez-Fernández et al., 2013).

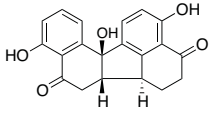
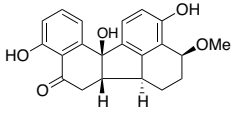
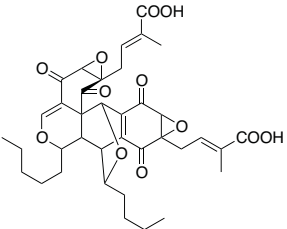
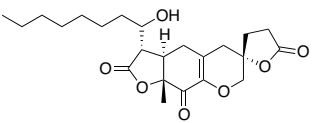
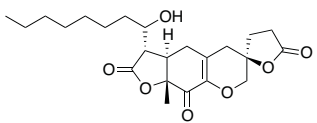
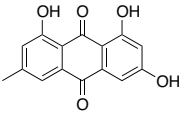
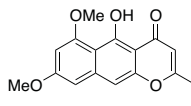
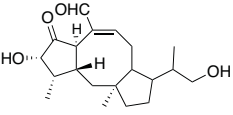
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos.

Compuesto	Hongo endófito	Planta hospedera	Referencia
 criptocina (1)	<i>Cryptosporiopsis</i> cf. <i>quercina</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	(Li et al., 2000)
 citocalasina H (2) citocalasina N (3)	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Gossypium hirsutum</i>	(Fu et al., 2011)
 fonsecinona A (4)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	(Song, et al., 2004)
 enfumafungin (5)	<i>Hormonema</i> sp.	<i>Juniperus communensis</i>	(Peláez et al., 2000)
 ácido ambúico (6)	<i>Pestalotopsis</i> sp.	Árbol de selva	(Li et al., 2001)

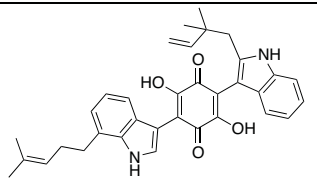
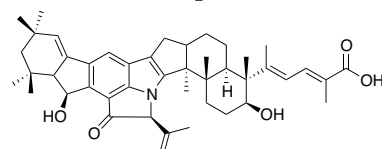
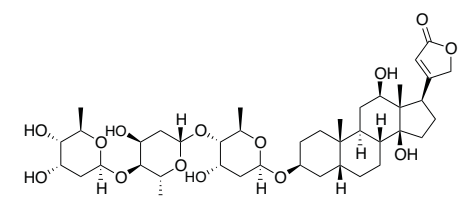
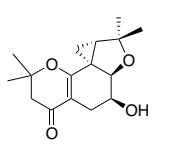
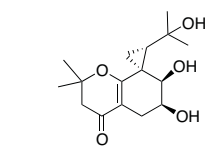
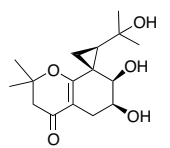
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos.

Compuesto	Hongo endófito	Planta hospedera	Referencia
Antibacterianos			
 fomol (7)	<i>Phomopsis</i> sp. (E02018)	<i>Erythrina crista-galli</i> L.	(Weber et al., 2004)
 citosporona A (8)	<i>Cryptospora</i> sp.	<i>Conocarpus erecta</i> <i>Forsteronia spicata</i>	(Brady et al., 2000)
 citosporona D (9)			
 criptosporioptido (10)	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	<i>Viburnum tinus</i>	(Saleem et al., 2013)
Fitotóxicos			
 chaetoglobosina A (11)	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	(Li et al., 2014)
 chaetoglobosina C (12)			
 preusomerina EG1 (13)	<i>Edenia gomezpompae</i>	<i>Callicarpa acuminata</i>	(Macías-Rubalcava et al., 2014)
 preusomerina EG4 (14)			

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos.

Compuesto	Hongo endófito	Planta hospedera	Referencia
Anticancerígenos			
 daldinona C (15)	 daldinona D (16)	<i>Hypoxyylon truncatum</i> IFB-18	<i>Artemisia annua</i> (Gu et al., 2007)
 ácido torreyánico (17)		<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i> (Lee et al., 1996)
 sequoiamonasina A (18)	 sequoiamonasina B (19)	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i> (Stierle et al., 2003)
 emodina (20)	 rubrofusarina (21)	<i>Thielavia subthermophila</i> <i>Aspergillus niger</i> IFB-E003	<i>Hypericum perforatum</i> <i>Cynodon dactylon</i> (Kusari et al., 2008) (Song et al., 2004)
 periconicina (22)		<i>Periconia atropurpurea</i>	<i>Xylopiya aromatica</i> (Ge et al., 2011)

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos.

Compuesto	Hongo endófito	Planta hospedera	Actividad	Referencia
Otras actividades				
 desmetilasterriquinona B1 (23)	<i>Pseudomassaria</i> sp.	No identificada	Activador de receptores de insulina	(Zhang, 1999)
 ácido nodulispórico (24)	<i>Nodulisporium</i> sp. MF 5954	<i>Bontia daphnoides</i> L.	Insecticida	(Hensens et al., 1999)
 sequoiamonasina A (25)	Cinco especies no identificadas	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico	(Kaul et al., 2013)
 pestaloficol A (26)	<i>Pestalotopsis fici</i>	No identificada	Anti-VIH	(Liu et al., 2008)
 pestaloficol B (27)				
 pestaloficol D (28)				

2.4 Diabetes mellitus: generalidades

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico complejo y caracterizado por dos principales defectos: una deficiencia en la secreción de insulina por el páncreas y/o la resistencia a la acción de esta hormona en varios tejidos (Guariguata et al., 2014). Este padecimiento se caracteriza por un estado de hiperglucemia crónica, asociado a la producción descontrolada de glucosa por parte del hígado y a la disminución en el catabolismo de glucógeno y captación de glucosa por parte de las células. Estos eventos que convergen en la aparición de trastornos degenerativos, a consecuencia de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (IDF, 2013).

Los síntomas de la enfermedad surgen como una consecuencia de una deficiencia en el transporte de glucosa al interior de las células; por esta razón, el organismo reacciona como si estuviera en un estado de alimentación insuficiente, estimulando la glucogenólisis, gluconeogénesis, lipólisis y la cascada de señalización de consumo de alimentos (polifagia). Por otra parte, cuando los niveles de glucosa en sangre sobrepasan su capacidad de reabsorción, ésta se elimina a través de la orina (glucosuria). Este fenómeno genera un cambio en la presión osmótica que exige el aumento de líquido de dilución y, por lo tanto, el fenómeno de diuresis (poliuria). Así, la excesiva pérdida de agua aumenta la osmolaridad del plasma, incitando la ingesta constante de agua (polidipsia) [Ross et al., 2004].

Las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden provocar discapacidad o la muerte. La hiperglucemia crónica puede conducir al desarrollo de complicaciones microvasculares, neurológicas y macrovasculares, incluyendo retinopatía (daño en pequeños vasos de la retina), nefropatía (insuficiencia renal crónica), neuropatía (daño en fibras nerviosas periféricas) y enfermedades cardíacas (**Figura 3**) [Ross et al., 2004; Aguirre et al., 2013].

Existen dos tipos principales de diabetes mellitus: la tipo I (DMTI) y la tipo II (DMTII). Los pacientes con DMTI tienen una absoluta insuficiencia de insulina, debido a la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas que sintetizan esta hormona. La DMTII es más compleja en etiología, y se caracteriza por una deficiencia relativa de insulina, una acción reducida

de ésta y/o resistencia a la acción de esta hormona en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo (Ross et al., 2004; Bilous y Donnelly, 2010).

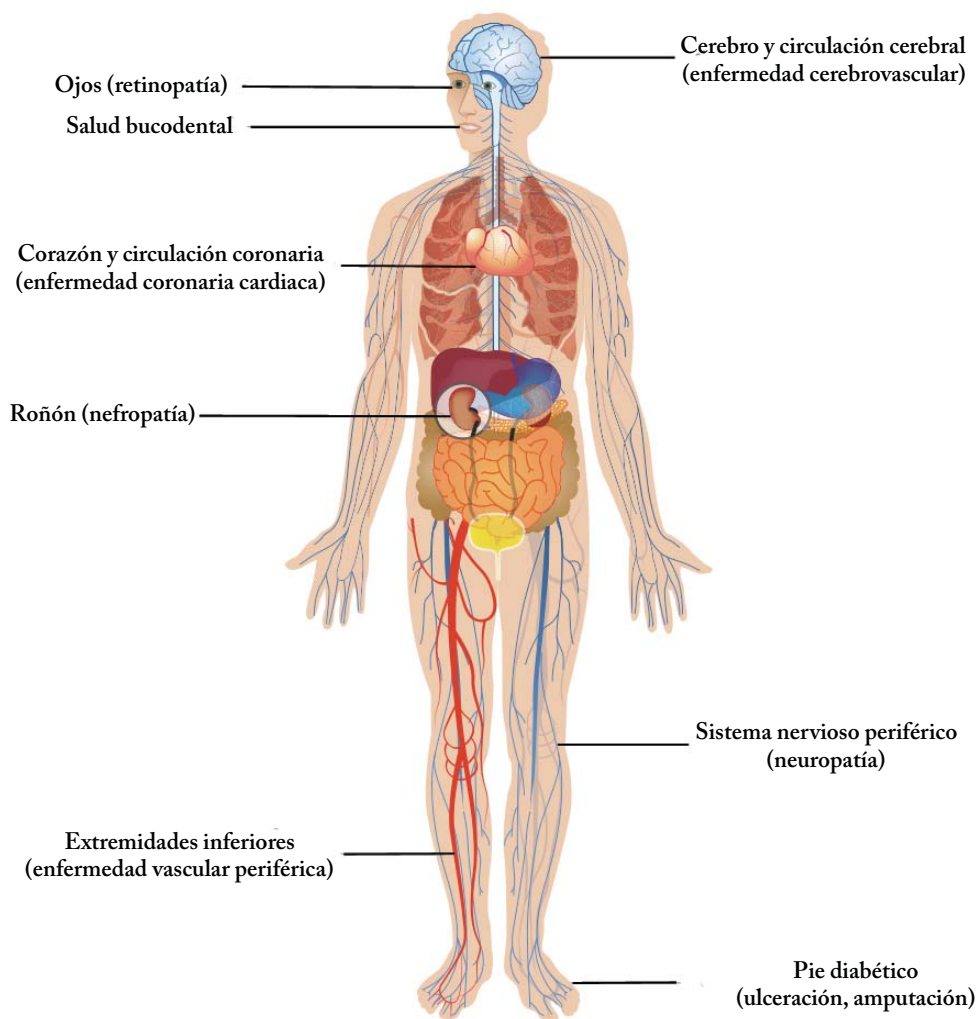


Figura 3. Principales complicaciones de la DM.

2.5 Panorama mundial y nacional de la diabetes mellitus

La diabetes es una de las enfermedades no transmisibles más comunes. Su oportuno tratamiento impone una gran carga económica para los individuos y los sistemas de salud a nivel global. En la mayoría de los países de ingresos altos, la DMTII representa entre el 85 % y el 95 %

de los casos y es la cuarta causa de muerte; en los países en vía de desarrollo y de reciente industrialización, la DMTII es ya una epidemia y la incidencia de casos es aún mayor (Lguariguata, 2012). La diabetes y sus complicaciones son las principales causas de muerte prematura.

De acuerdo con el informe generado en 2013 (actualización 2014) por la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), en el mundo existen alrededor de 387 millones de personas con diabetes (8.3 % de la población adulta; **Figura 4**), y se prevé que esta cifra incremente a 592 millones en 2035, siendo China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México –en ese orden– los países con mayor número de enfermos (Lguariguata, 2012). Asimismo, 5.1 millones de personas entre 20 y 79 años murieron en 2013 a causa de este padecimiento, lo que representa el 8.4 % de la mortalidad por todas las causas a nivel mundial (Lguariguata, 2012).

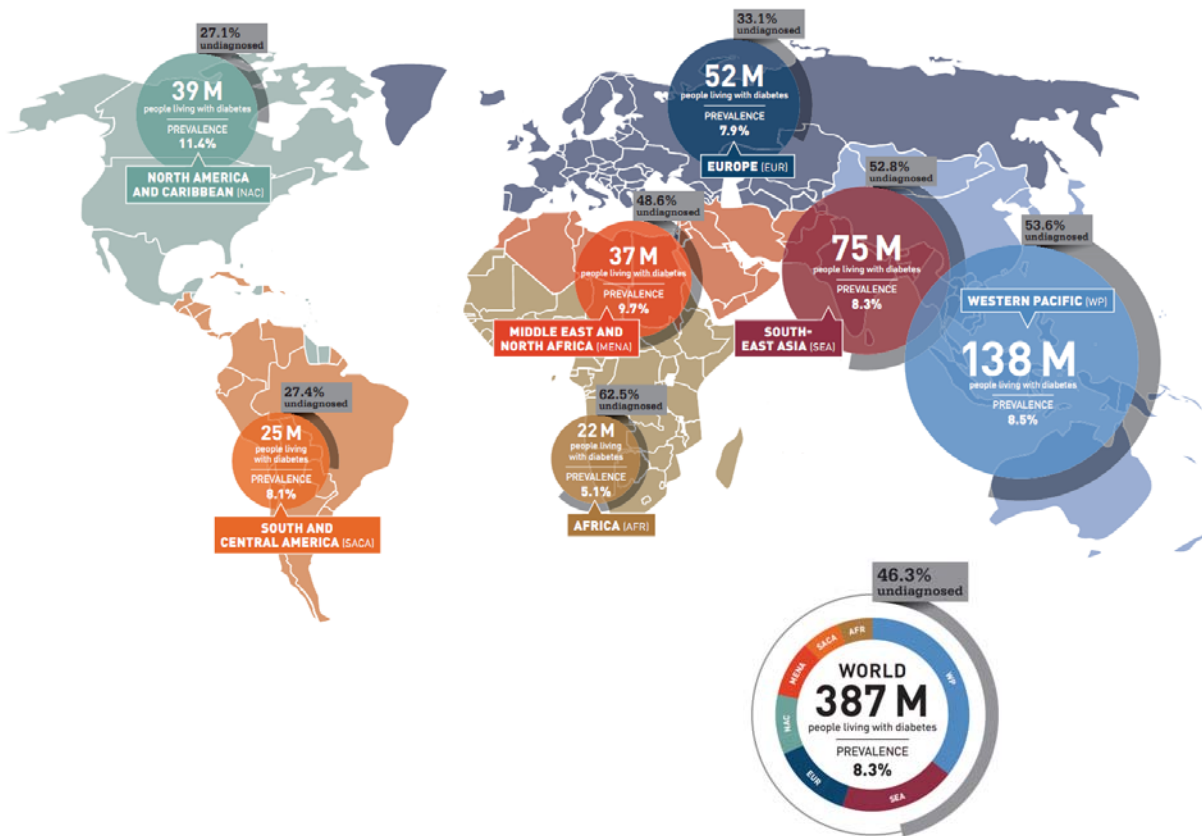


Figura 4. Número de personas con DMTII por región de la IDF. Tomado de: IDF Atlas, 6 ed. Revisión 2014.

En México, la DMTII ha incrementado de manera importante entre 1993 y 2012, con un aumento en la prevalencia del 5.17 %. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en 2012, la DMTII fue la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes. Por otra parte, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) identificó 6.4 millones de personas diagnosticadas con DMTII, es decir, un 9.2 % de prevalencia de la enfermedad a nivel nacional. Estas cifras son indicativas del grave problema de salud que representa la DMTII en México.

Entonces, la DMTII es un reto para la sociedad, no sólo por los recursos económicos e infraestructura que se requieren para el tratamiento de los enfermos, sino también por el costo emocional en las personas que la padecen. Se estima que esta enfermedad reduce entre 5 y 10 años la esperanza de vida de la población (INSP, SSA, 2012), por ello, es importante generar el interés público sobre el problema de la DMTII en el ámbito nacional y así consolidar una respuesta social para reducir el impacto de este padecimiento en México a través de estrategias que incidan en mejorar el estilo de vida poco saludable (dieta, sedentarismo, obesidad y sobrepeso) asociado al desarrollo de la DMTII (Hernández-Ávila et al., 2013).

2.6 Estrategias empleadas en el tratamiento de la diabetes mellitus

La estrategia de primera elección para la prevención de la DM se centra en modificaciones en el estilo de vida, un control en la dieta, una reducción en el sobrepeso y obesidad, así como un incremento en la actividad física. Sin embargo, la implementación de esta táctica en la población ha resultado una tarea complicada, motivo por el cuál, es necesario complementarla con un tratamiento farmacológico que contribuya a un control óptimo de la hiperglicemia crónica (Israili, 2011).

El tratamiento de la diabetes tiene como propósito disminuir la hiperglucemia, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o sus complicaciones (Cheng, 2005; IDF, 2013; Israili, 2011; Irons y Minze, 2014).

Así, este tratamiento enfoca en: 1) incrementar los niveles de insulina, ya sea por administración directa o a través de la ingesta de agentes que promuevan su secreción; 2) aumentar la sensibilidad de los tejidos a la acción de esta hormona, y; 3) reducir la tasa de absorción de glucosa del intestino a torrente sanguíneo (Israili, 2011). Las modalidades terapéuticas actuales en el tratamiento de la diabetes incluyen al menos siete clases de agentes: 1) sulfonilureas, 2) biguanidas, 3) meglitinidas, 4) tiazolidinedionas, 5) inhibidores de la dipeptidil-peptidasa IV e incretinas, 6) inhibidores de α -glucosidasas, y 7) otros (Figura 5) [Cheng, 2005; Israili, 2011; Olokoba et al., 2012].

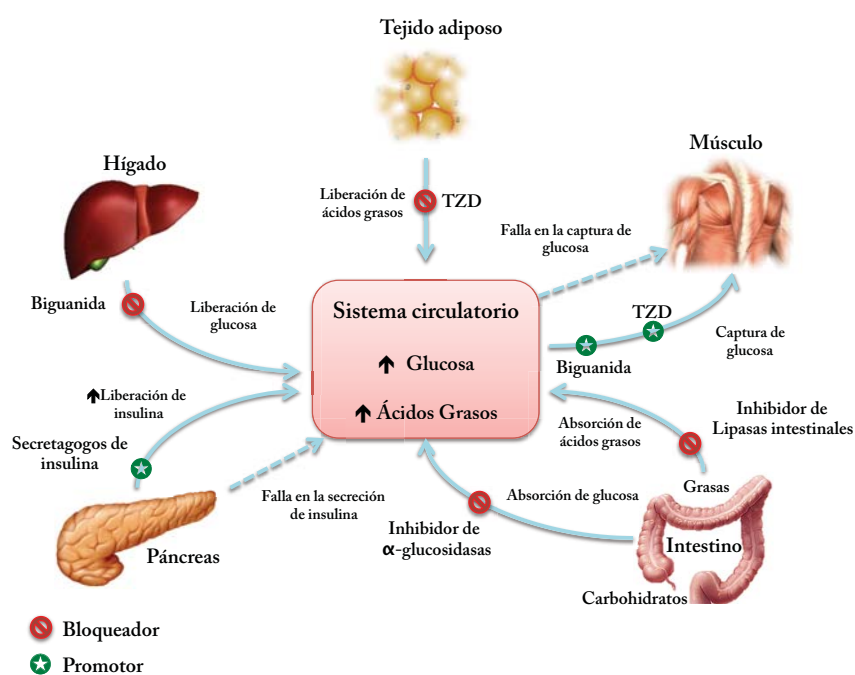
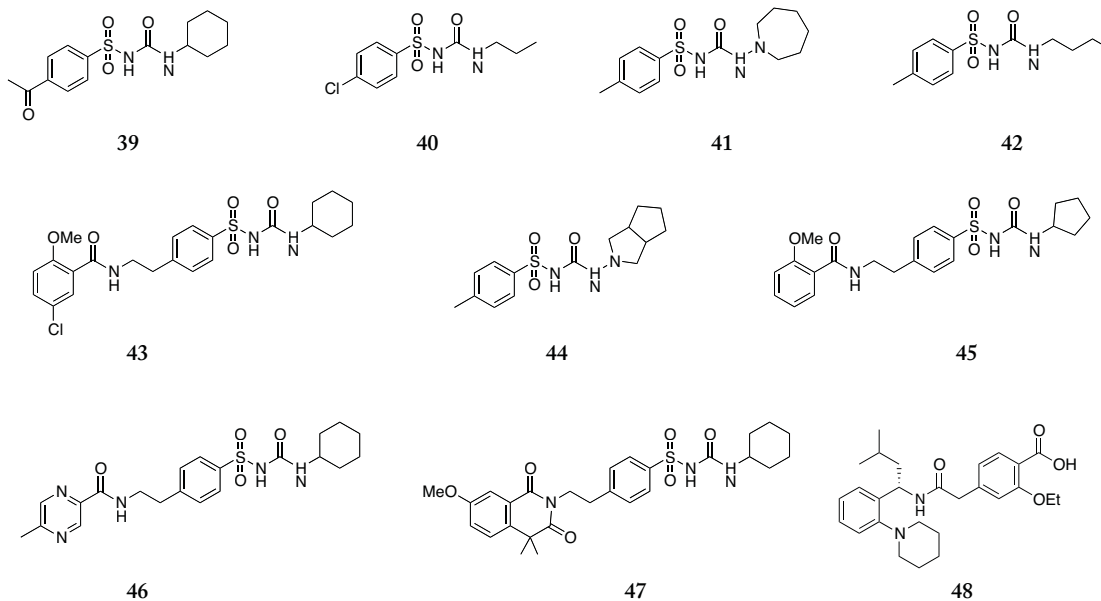


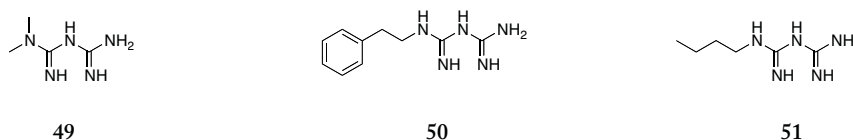
Figura 5. Ejemplos selectos de modalidades terapéuticas usadas en el tratamiento de la DMTII.

Las sulfonilureas ejercen su acción en las células β -pancreáticas, donde promueven la secreción de insulina y, por lo tanto, reducen la glucosa plasmática. El efecto adverso más frecuente de este grupo de fármacos es la hipoglucemia, que puede ser intensa y prolongada, dependiendo de la potencia y tiempo de vida media de cada uno de ellos. Entre las moléculas de primera generación se encuentran: la acetoheamida (39), la clorpropamida (40), la tolazamida (41) y la tolbutamida (42); dentro de los fármacos de segunda generación destacan la glibenclamida (43), la gliclazida (44), la glipentida (45), la glipizida (46) y la gliquidona (47).

Otro grupo de moléculas que estimulan la secreción de insulina a partir de las células β -pancreáticas son las meglitinidas, dentro de las que destaca la repaglinida (48) [Israili, 2011; Rang et al., 2011; Cheng et al., 2012; Olokoba et al., 2012].

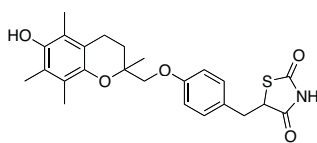


Dentro del grupo de las biguanidas, la metformina (49) se mantiene como el fármaco de elección y, a diferencia de las sulfonilureas, no causa disminución de los niveles de glucosa por debajo de los niveles normales. El mecanismo de acción de esta molécula no se conoce del todo, pero es claro que incrementa la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina, reduce la absorción intestinal de glucosa y disminuye la liberación de glucosa en el hígado al inhibir la gluconeogénesis hepática. Otros ejemplos de esta clase de fármacos son la fenformina (50) y la buformina (51). Los efectos adversos más comunes son los trastornos digestivos dependientes de la dosis (diarrea, náuseas y anorexia) y la acidosis láctica (Cheng, 2005; Israili, 2011; Rang et al., 2011; Olokoba et al., 2012).

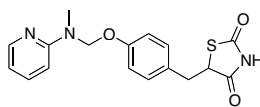


Las tiazolidinedionas (TZD) son sensibilizadores de insulina y actúan a través de la unión selectiva al receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ). Este grupo de fármacos incluye a la troglitazona (52), la rosiglitazona (53) y la pioglitazona (54). Las TZD

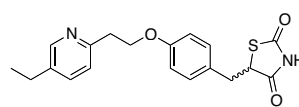
reducen la síntesis hepática de glucosa y aumentan la captación de glucosa por el músculo, aumentando así la eficacia de la insulina endógena. La reducción de la glucemia suele acompañarse de disminuciones de insulina y ácidos grasos libres circulantes. Los triglicéridos descienden, mientras que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las de alta densidad (HDL) permanecen igual o aumentan ligeramente. Los efectos adversos más comunes son el aumento de peso y la retención de líquidos (Israili, 2011; Rang et al., 2011; Olokoba et al., 2012).



52



53



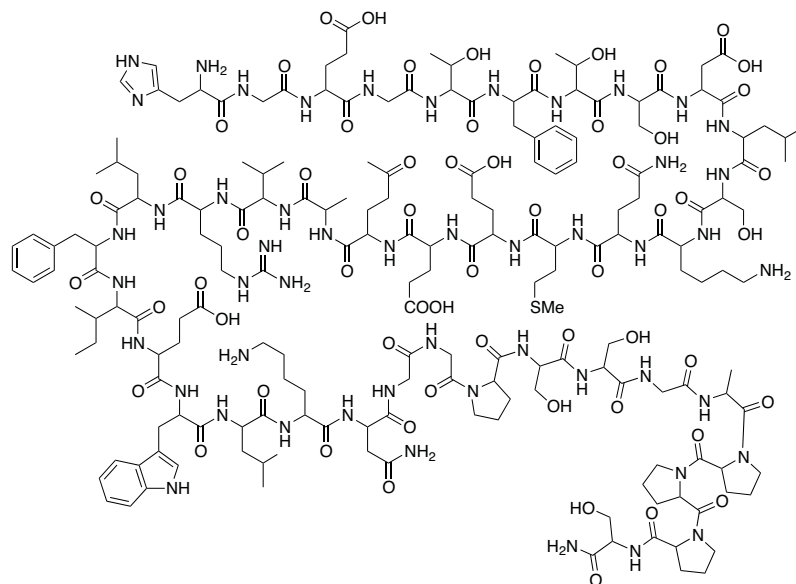
54

Las incretinas son hormonas producidas en el tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta de alimentos y con efectos sobre las células β -pancreáticas, que aumentan la secreción y liberación de la insulina y disminuyen la secreción de glucagón. Las principales incretinas son la GLP1 y la GIP. El efecto de las incretinas se puede aumentar de dos formas: a través de la administración de análogos de la GLP1, o mediante la inhibición de la enzima que desactiva las incretinas (dipeptidil-peptidasa IV, DPP4). En la actualidad, la exenatida (55) es el único un análogo de la GLP1. Asimismo, existen tres inhibidores de la DPP4, la sitagliptina (56), la vidagliptina (57) y la saxagliptina (58) [Zúñiga-Guajardo, 2010].

Dentro del grupo de fármacos que reducen la absorción intestinal de glucosa se encuentran los inhibidores de las α -glucosidasas, útiles para prevenir la progresión de la enfermedad (Israili, 2011). Los mejores inhibidores de las α -glucosidasas son la acarbosa (59), aislada de la especie *Actinoplanes* sp.; el miglitol (60), un producto derivado de la 1-desoxinojirimicina, molécula aislada de la especie *Morus alba* L.; y la voglibosa (61), un derivado del producto natural valiolamina (Cheng, 2005; Wardrop y Waidyarachchi, 2010; Israili, 2011). La inhibición de estas enzimas por cualquiera de los fármacos antes mencionados retrasa la absorción de glucosa y reduce el pico postprandial (Israili, 2011).

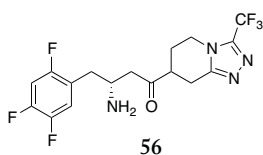
En la actualidad, existen varios blancos moleculares atractivos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la DM. Algunos ejemplos de éstos son: las acetil-CoA carboxilasas 1 y 2 (CCA), la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), el receptor 1 de

canabinoides, el receptor de incretinas, la fructosa 1,6-bisfosfatasa, el receptor de glucagón, proteínas involucradas en la gluconeogénesis, la glucógeno fosforilasa, la glucocinasa y la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), entre otros (Israili, 2011; Olokoba et al., 2012).

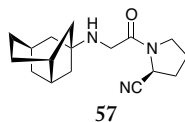


His-Gly-Glu-Glu-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂

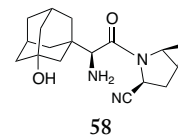
55



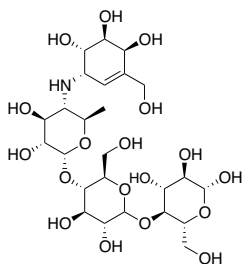
56



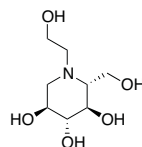
57



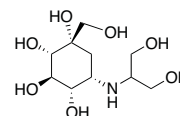
58



59



60



61

2.7 Generalidades sobre las enzimas α -glucosidasas

Las glicosidasas hidrolasas (GH) son un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos de polisacáridos, oligosacáridos o glicoconjugados para producir glucosa y monosacáridos relacionados. Estas enzimas se localizan en las microvellosidades del intestino delgado, donde catalizan el paso final en la digestión de carbohidratos (Israili, 2011). Varias glicosidasas son específicas para el rompimiento de enlaces glicosídicos dependiendo del número, posición o configuración de los grupos hidroxilo en las moléculas de azúcar (Borges de Melo et al., 2006).

Las α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) catalizan la liberación de α -D-glucopiranososa a partir del extremo no reductor de varios sustratos y, con base en su secuencia de aminoácidos, éstas se clasifican en dos familias: GH13 y GH31 (Hakamata et al., 2005). Durante la hidrólisis, las GH de las familias 13 y 31 liberan α -D-glucopiranososa con retención de la configuración en la posición anomérica (**Figura 6**) [Davies y Henrissat, 1995].

La hidrólisis del enlace glicosídico se lleva a cabo a través de una catálisis ácida convencional que requiere dos residuos críticos: un donador de protón (Glu) y un nucleófilo (Asp). En este mecanismo, el nucleófilo se encuentra cerca del carbono anomérico. En el primer paso de la hidrólisis, el nucleófilo desplaza la aglicona y, al mismo tiempo un residuo ácido protona el oxígeno de la posición anomérica para formar un intermediario glucosil-enzima. Posteriormente, el intermediario se hidroliza a través del mismo mecanismo con la participación de una molécula de agua (Davies y Henrissat, 1995).

Las enzimas α -glucosidasas 3.2.1.20 de diversos orígenes manifiestan diferencias significativas en el reconocimiento de su sustrato, característica que permite dividir las en cuatro grupos: tipo I-IV. Las enzimas de tipo I pertenecen a la familia GH13 y, generalmente, se obtienen a partir de bacterias, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e insectos; éstas son capaces de hidrolizar sustratos heterogéneos tales como la sacarosa y el *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido (*p*NPG), de manera más eficiente que sustratos homogéneos como la maltosa y casi no muestran actividad contra sustratos poliméricos como el almidón. Este tipo de enzimas reconocen la subunidad de α -D-glucopiranosido del sustrato. Las de tipo II y III son miembros de la familia

GH31. Las α -glucosidasas de tipo II se encuentran en microorganismos fúngicos e hidrolizan con mayor facilidad sustratos homogéneos y poliméricos que sustratos heterogéneos, lo cual significa que este grupo muestra reconocimiento por la subunidad maltósido. Las de tipo III se encuentran con mayor frecuencia en plantas y animales, éstas muestran una elevada actividad contra sustratos homogéneos y poliméricos, y casi no muestran actividad frente a sustratos heterogéneos. Las enzimas que pertenecen a este grupo reconocen la subunidad maltósido así como subunidades poliméricas (Nakai, 2005). Finalmente las enzimas de tipo IV se aíslan a partir de bacterias, pertenecen a la familia GH13 y muestran mayor especificidad por sustratos homogéneos tales como maltosa.

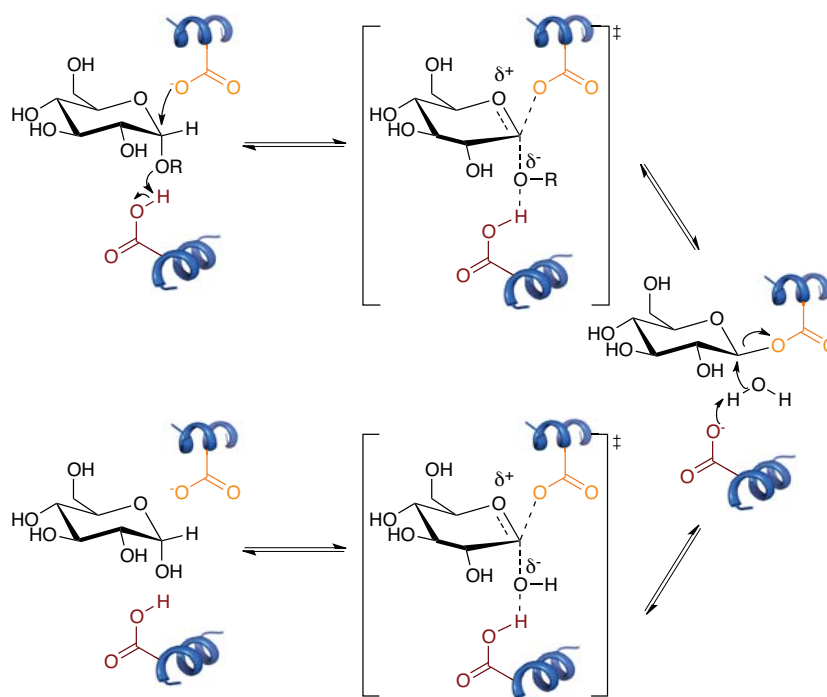


Figura 6. Mecanismo enzimático de hidrólisis de enlaces O-glicosídicos. En color naranja se representa el residuo de ácido aspártico (Asp). En color rojo se representa el residuo de ácido glutámico (Glu).

Las diferencias anteriores se pueden explicar en términos de la topología del sitio activo. Así, por ejemplo, la especificidad por el sustrato en la familia GH13 (enzimas tipo I y IV) se debe a que en las enzimas de tipo I el sitio activo está menos expuesto (hueco), a diferencia del correspondiente en las enzimas de tipo IV, que es más superficial y tiene forma de hendidura (Figura 7) [Davies y Henrissat, 1995].

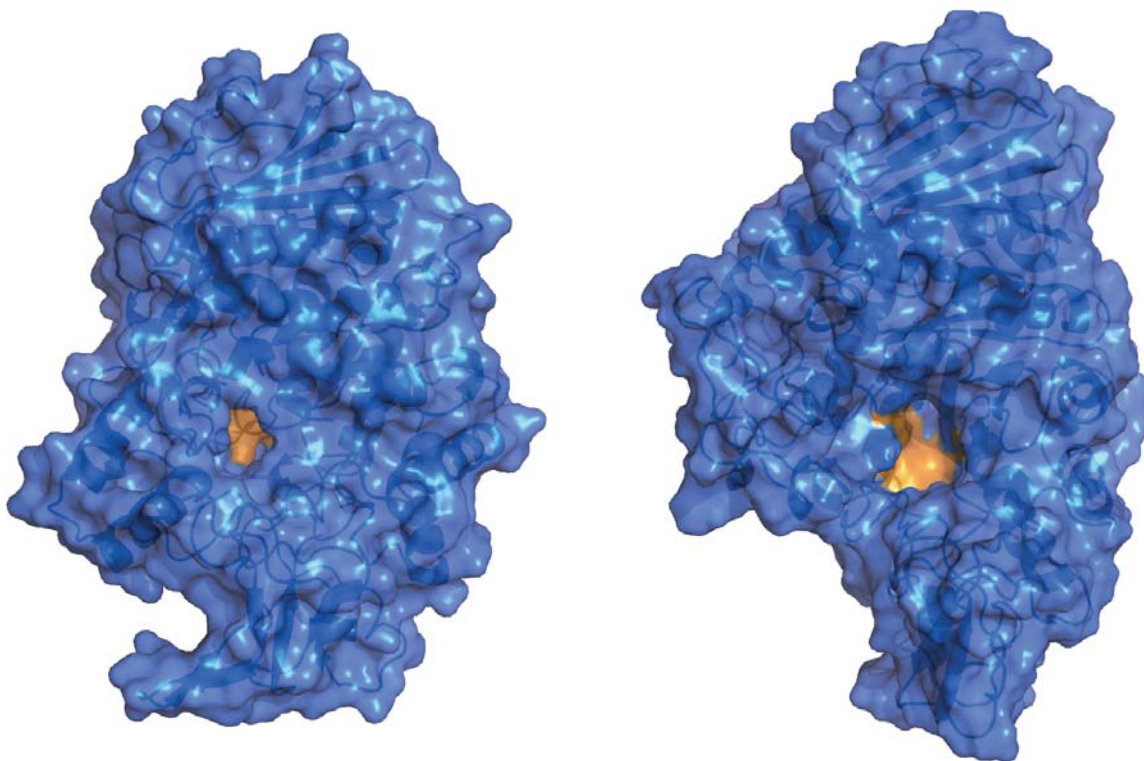


Figura 7. Principales tipos de sitios catalíticos encontrados en las glicosil-hidrolasas de la familia GH13. (A) Huevo (enzimas de tipo I). (B) Hendidura (enzimas de tipo IV).

2.8 Agentes inhibidores de las α -glucosidasas

La actividad de las α -glucosidasas es fundamental en numerosos procesos bioquímicos tales como *i*) la degradación de polisacáridos de la dieta para producir unidades de monosacáridos, las cuales se absorben y metabolizan por el organismo, *ii*) la hidrólisis de glicoconjugados y, *iii*) la biosíntesis de glicoproteínas (Borges de Melo et al., 2006).

El uso de inhibidores de las α -glucosidasas en el tratamiento de la diabetes es importante ya que estas moléculas retrasan considerablemente la liberación de glucosa proveniente de la dieta y, por lo tanto, su absorción a nivel intestinal. El resultado de este retraso es la disminución del pico posprandial de glucosa, fenómeno asociado con las complicaciones microvasculares de la DMII (Hanefeld et al., 2004).

Así, desde el descubrimiento de la acarbosa (59), la búsqueda de inhibidores de α -glucosidasas a partir de fuentes naturales (plantas y microorganismos) ha incrementado

considerablemente, de tal forma que un buen número de los productos naturales inhibidores de las α -glucosidasas han sido aislados en estudios enfocados a la obtención de herramientas de investigación que ayuden a discernir los procesos bioquímicos en los que se encuentran involucradas estas enzimas, o como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos (Borges de Melo et al., 2006; Mata et al., 2013).

A la fecha se han descubierto una gran cantidad de inhibidores naturales de estas enzimas, bien sea a partir de productos herbolarios usados para el tratamiento de la DMII, a partir de microorganismos, o de síntesis. Los productos más importantes se pueden agrupar como sigue: disacáridos, iminoazúcares, carboazúcares y pseudoaminoazúcares, tioazúcares, alcaloides polihidroxiados, aminociclitoles, ciclitoles y polifenoles (**Figura 8**) [Borges de Melo et al., 2006; Matsui et al., 2006; Benalla et al., 2010].

En el caso específico de México, debido al apego de la población por el uso remedios herbolarios como una alternativa en el tratamiento de la DMII, una gran parte de la población utiliza plantas medicinales dejando de lado los tratamientos alopáticos convencionales. Así, se han reportado al menos 383 especies usadas con este propósito (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005), de las cuales, sólo 38 han sido analizadas como fuentes potenciales de inhibidores de las α -glucosidasas, y sólo siete han conducido al aislamiento de nuevos inhibidores de estas enzimas (Mata et al., 2013). Las siete especies antes mencionadas incluyen: *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), *Ipomea batatas* (L.) Lam (Convolvulaceae), *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), *Ligusticum porteri* Coult. & Rose (Apiaceae), *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae), *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae) y *Hintonia latiflora* (Sessé & Moc. Ex DC.) Bullock (Rubiaceae), de las cuales se han aislado 25 productos con propiedades inhibitorias sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas (**Figura 9**) [Mata et al., 2013].

Debido a la gran diversidad estructural de los inhibidores de α -glucosidasas, numerosos grupos de investigación alrededor del mundo han realizado estudios encaminados a la obtención de información acerca de la relación estructura actividad de estos inhibidores. Los resultados han mostrado que lo mejores candidatos para el desarrollo de nuevos inhibidores de estas enzimas son aquellos productos que mimetizan azúcares, que tienen la capacidad de formar enlaces iónicos con nucleófilos, que presentan una elevada capacidad de formar enlaces de hidrógeno y que

pueden unirse a proteínas a través de interacciones iónicas e hidrofóbicas (Hakamata et al., 2009; Moorthy et al., 2012).

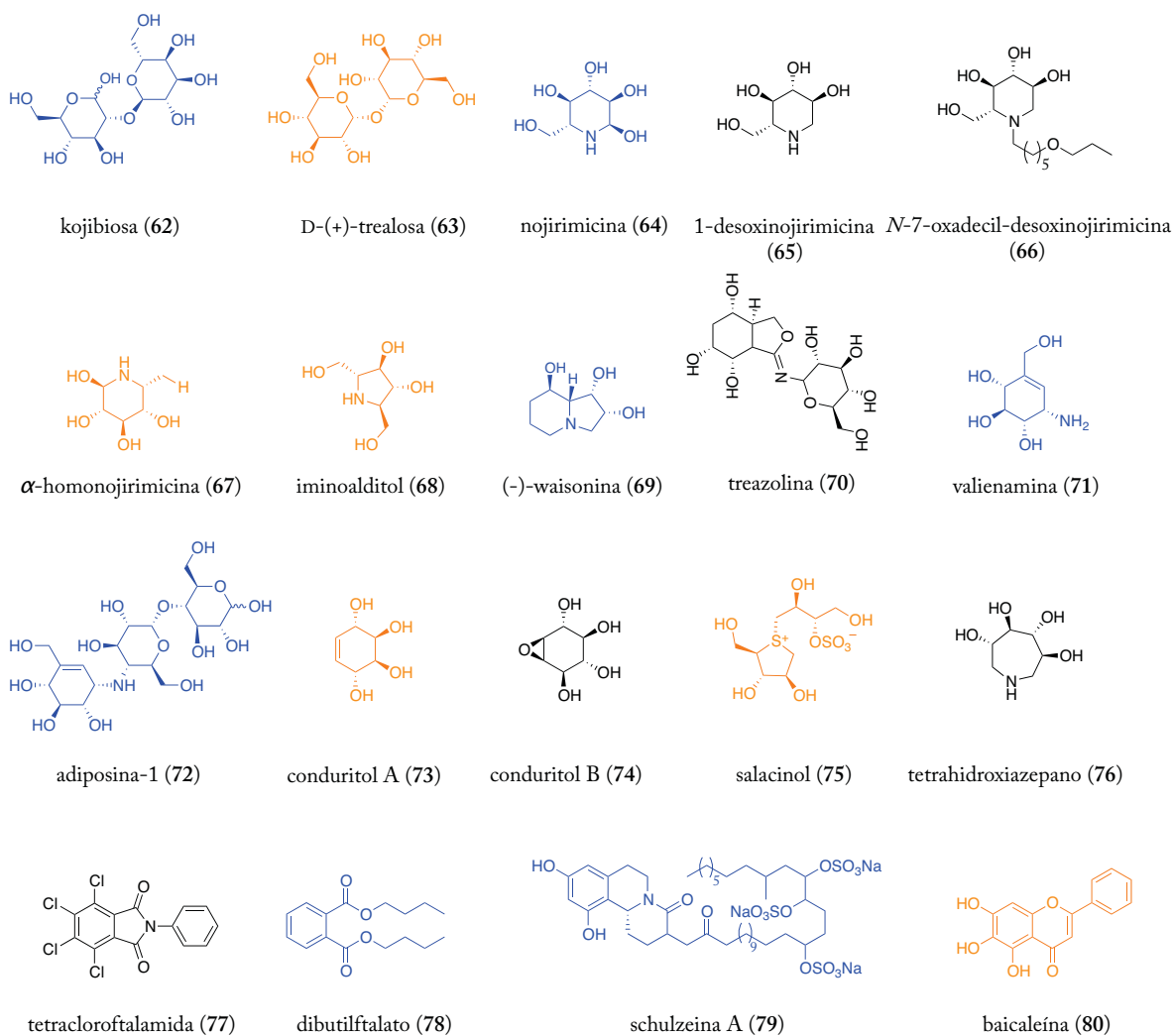


Figura 8. Ejemplos selectos de inhibidores de α -glucosidasas. Plantas medicinales (naranja); microorganismos (azul); síntesis (negro).

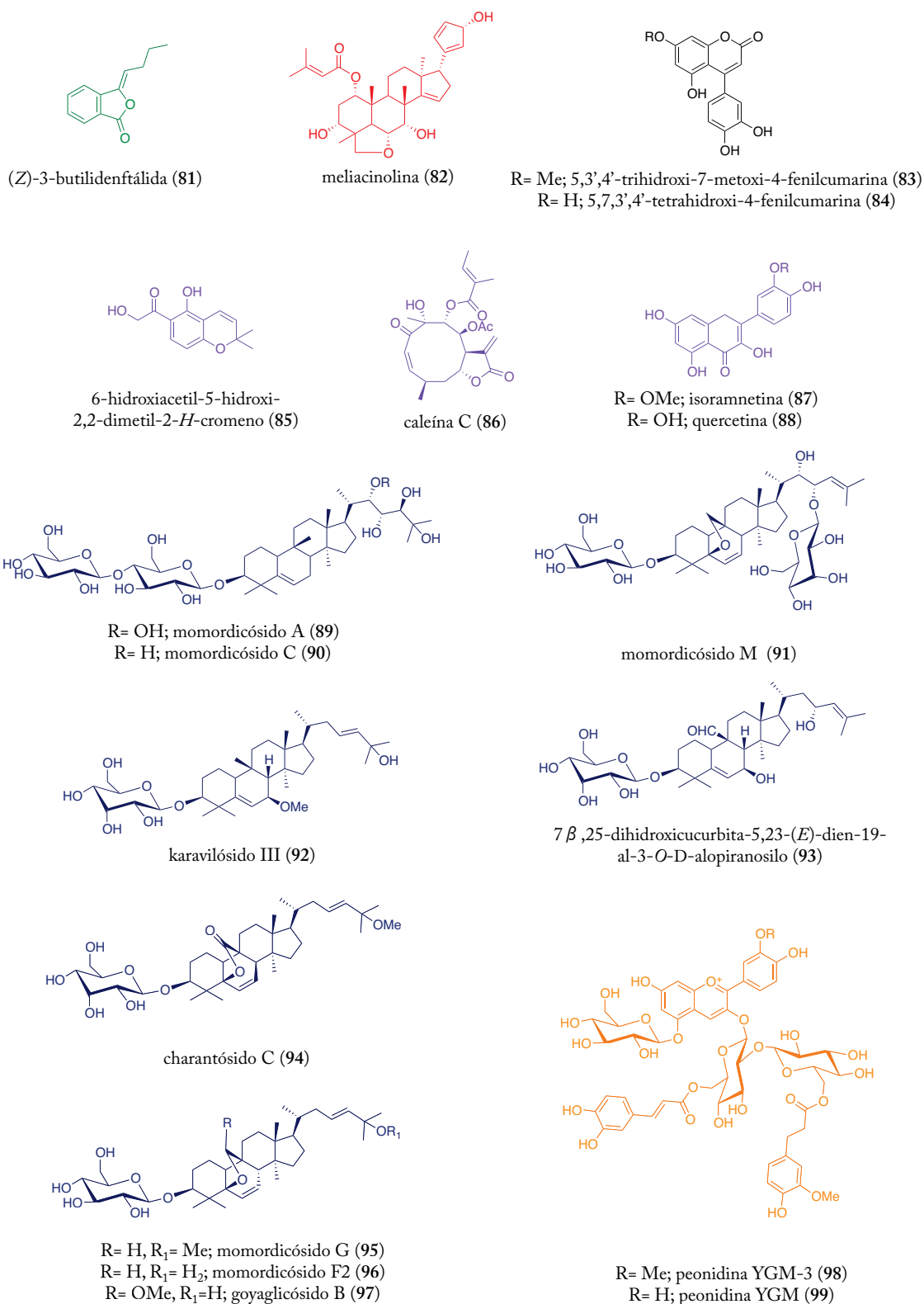


Figura 9. Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas aislados de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana. *L. porteri* (verde); *A. indica* (rojo); *H. standleyana* y *H. latiflora* (negro); *B. cavanillesii* (morado); *I. batatas* (azul marino), y *M. charantia* (naranja).

2.9 Antecedentes sobre el género *Chaetomium* (Chaetomiaceae)

Las especies fúngicas del género *Chaetomium* constituyen una fuente muy importante de metabolitos secundarios bioactivos. A la fecha, se han descrito más de 200 compuestos activos pertenecientes a diversas clases estructurales, dentro de las que destacan las chaetoglobosinas, las epipolítiodioxopiperazinas, las azafilonas, xantonas, antraquinonas, cromonas, depsidonas y terpenoides (Figura 10) [Zhang et al., 2012].

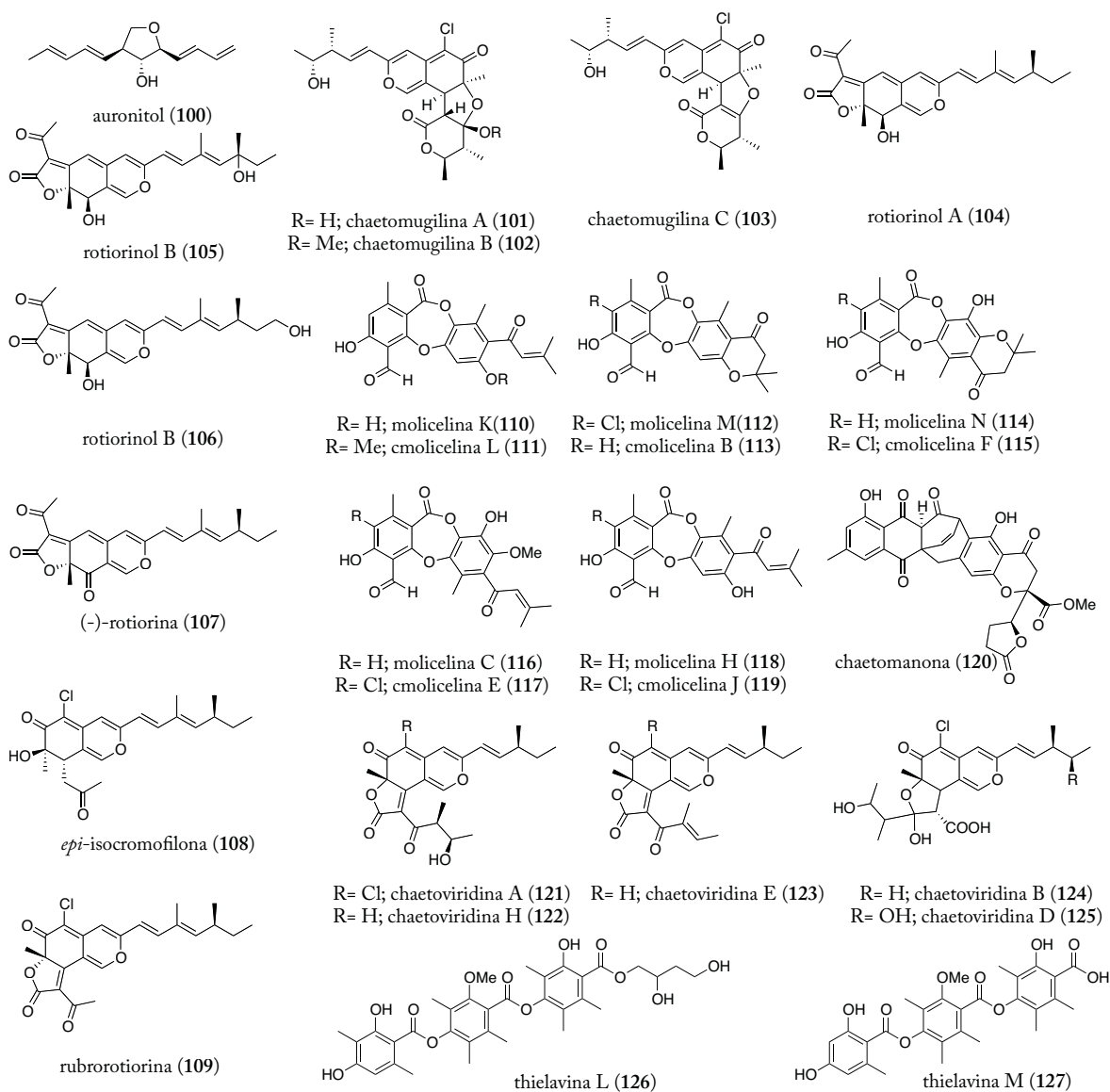


Figura 10. Ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos aislados de especies del género *Chaetomium* (Chaetomiaceae).

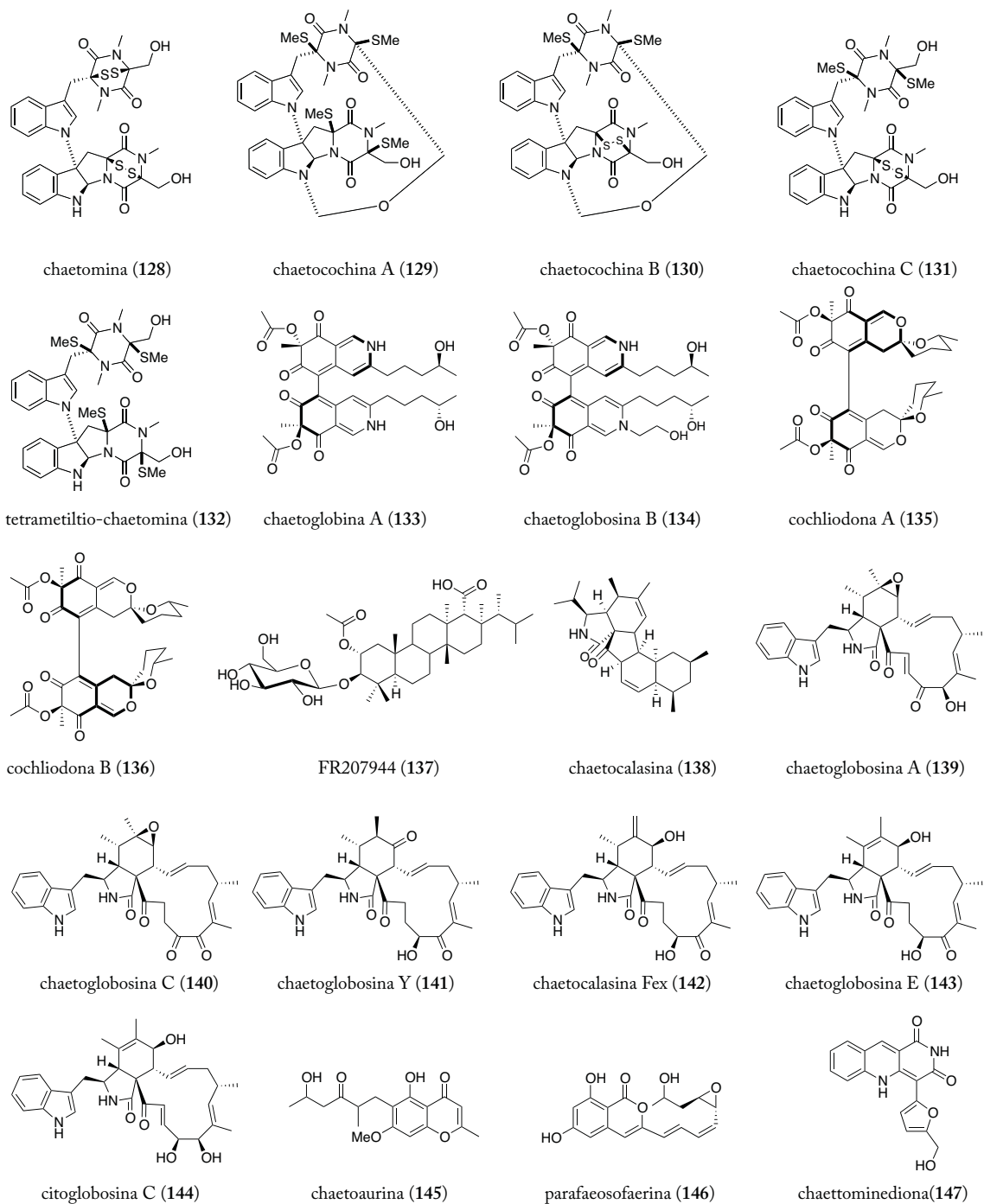


Figura 10. Continuación. Ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos aislados de especies del género *Chaetomium* (Chaetomiaceae).

2.10 Antecedentes sobre el género *Xylaria* (Xylariaceae)

El género *Xylaria* Hill ex Schrank es uno de los géneros más diversificados de la familia *Xylariaceae* (Ainsworth, 2008) con sus más de 300 especies, la gran mayoría tropicales. Las especies de este género se distribuyen ampliamente desde zonas templadas hasta zonas tropicales alrededor del mundo. Comúnmente, las especies de *Xylaria* son saprófitas o, en algunas ocasiones, parasíticas sobre plantas leñosas, y muchas son endófitas en plantas vasculares como palmeras, orquídeas, bromelias, aráceas y helechos (Bayman y Angulo-Sandoval, 1998; Song et al., 2014). Los estudios químicos realizados sobre hongos del género han permitido aislar una gran cantidad de metabolitos secundarios, incluyendo sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenos, alcaloides, compuestos aromáticos, derivados de pironas y policétidos (**Figura 11**) [Song et al., 2014]. Muchos de estos productos son citotóxicos, antiprotozoarios, antifúngicos y antibacterianos (Pittayakhajonwut et al., 2005; Song et al., 2014).

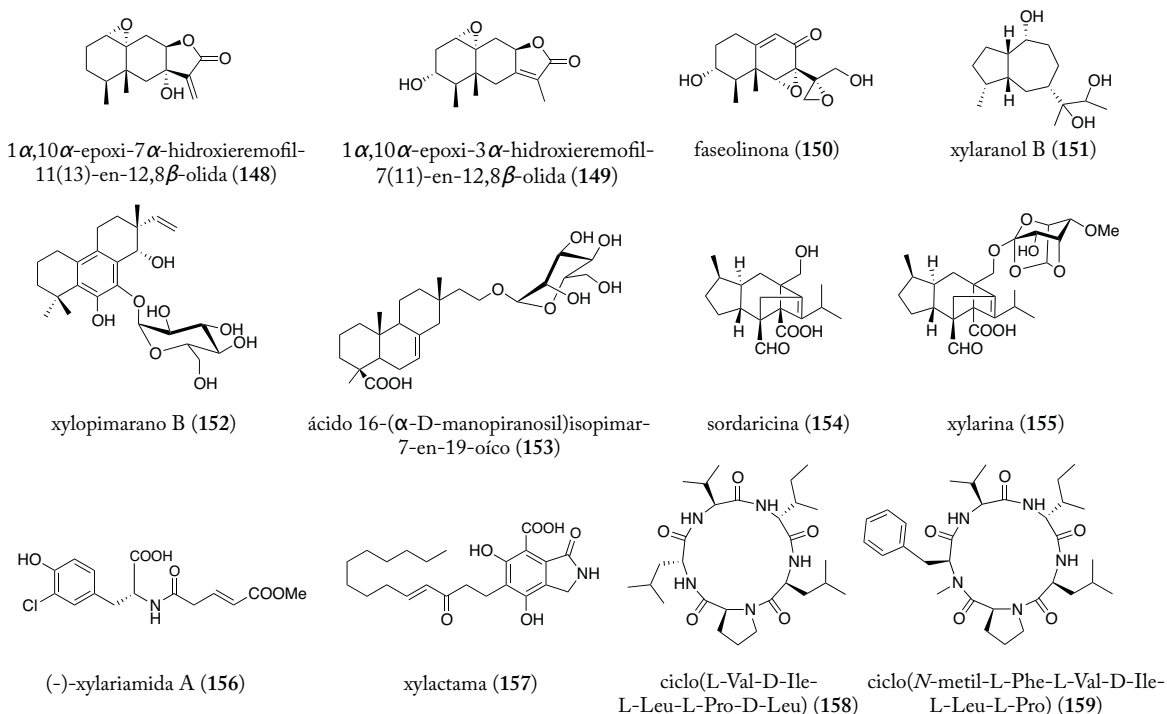


Figura 11. Ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos aislados de especies del género *Xylaria* (Xylariaceae).

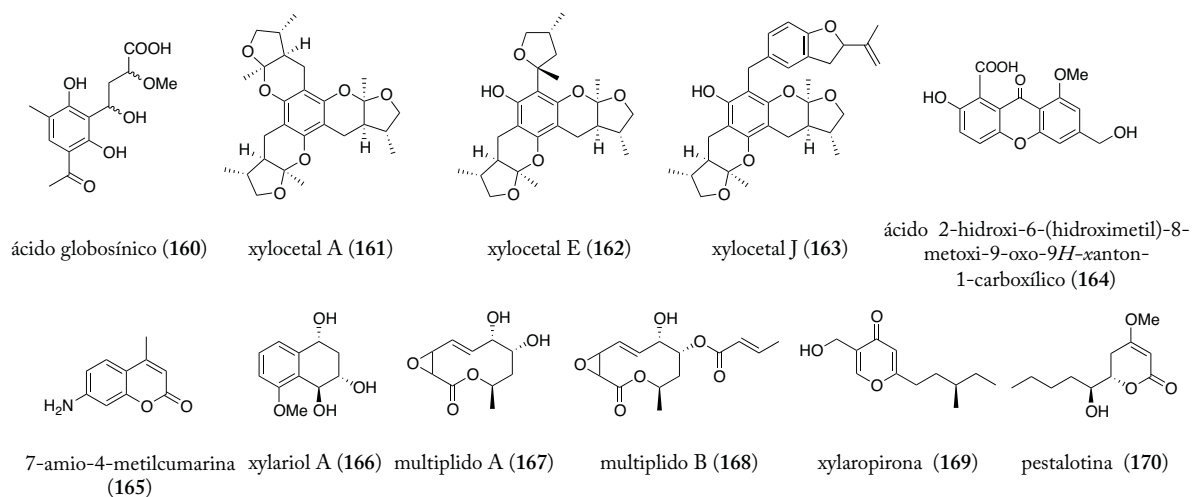


Figura 11. Continuación. Ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos aislados de especies del género *Xylaria* (Xylariaceae).

3. Hipótesis

Considerando que la especie *Hintonia latiflora* biosintetiza metabolitos secundarios con propiedades antihiper glucémicas que inhiben a las enzimas α -glucosidasas, es probable que algunos de sus hongos endófitos produzcan compuestos estructuralmente relacionados con propiedades farmacológicas similares.

4. Justificación y objetivos

La DMTII se encuentra entre las principales causas de muerte a nivel mundial, cobrando millones de vidas al año. A pesar de la gran variedad de herramientas (tratamientos farmacológicos, mejores técnicas de diagnóstico, así como estrategias educativas y preventivas) para hacer frente a la enfermedad, su prevalencia sigue aumentando desmesuradamente, al punto tal que la OMS prevé un incremento del 55 % en un período menor a 25 años (OMS, Aguirre et al., 2013).

El objetivo principal del tratamiento de la DMTII radica en controlar los niveles altos de glucosa; de esta forma se pueden evitar las complicaciones asociadas a la exposición sostenida a concentraciones elevadas de este carbohidrato. Como ya se indicó en los antecedentes de este trabajo, el retraso de la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal mediante la inhibición de las α -glucosidasas constituye una de las dianas terapéuticas más exitosas para el control de los niveles posprandiales de glucosa (Israili, 2011). Los fármacos utilizados con este fin [acarbose (59), miglitol (60) y voglibosa (61)] también inducen una disminución de la hemoglobina glicosilada (fenómeno asociado a problemas macro y microvasculares), no provocan aumento en el peso corporal de los pacientes y son altamente seguros (Kimmel y Inzucchi, 2005). De manera adicional, estas sustancias no se absorben para ejercer su efecto farmacológico. Sin embargo, los fármacos de este tipo ocasionan problemas gastrointestinales (flatulencia, meteorismo, diarrea y dolor abdominal).

Por otra parte, los productos naturales derivados de plantas y/o microorganismos han contribuido de manera muy importante al desarrollo de moléculas útiles con este propósito. En consecuencia, la búsqueda de compuestos de origen natural que sirvan como prototipo estructural para el desarrollo de nuevos fármacos con un efecto sobre la actividad hidrolasa de las enzimas α -glucosidasas ha cobrado gran interés. En este sentido, la gran biodiversidad fúngica de México permite explorar un sinnúmero de especies de origen endófito, mismas que han demostrado ser una fuente exitosa para la obtención de productos biodinámicos, especialmente si éstas se obtienen de plantas utilizadas en la medicina tradicional.

Por las consideraciones anteriores, el presente trabajo tiene como objetivo principal obtener nuevos agentes inhibidores de las α -glucosidasas a partir de hongos endófitos de la especie medicinal *Hintonia latiflora* (Rubiaceae) [planta ampliamente utilizada en México y Europa como agente antihiper glucémico e hipoglucemiante], con la finalidad de contribuir al descubrimiento de productos naturales útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos novedosos para el tratamiento de la DMII.

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

- Obtener el material fúngico a partir de las partes aéreas de la especie vegetal *Hintonia latiflora* mediante las técnicas microbiológicas adecuadas y establecer sus mejores condiciones de cultivo.
- Seleccionar las especies más adecuadas para la obtención de inhibidores de las α -glucosidasas.
- Cultivar en mediana escala las especies fúngicas con un efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas, con la finalidad de obtener los componentes activos en forma pura y en cantidades apropiadas, para la determinación de sus estructuras químicas y la valoración de su actividad biológica.
- Establecer el efecto de los principios activos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas, a través de un ensayo espectrofotométrico *in vitro*.
- Determinar la estructura química de los compuestos activos mediante la aplicación de un conjunto de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y cálculos de modelado molecular.
- Determinar el tipo de interacción establecida entre la enzima de prueba y los productos aislados mediante estudios de cinética enzimática.
- Realizar cálculos de acoplamiento molecular con la finalidad de predecir el probable sitio de unión de los compuestos aislados con las enzimas α -glucosidasas y de esta manera complementar los resultados obtenidos a partir de los ensayos de cinética enzimática.

- Establecer la eficacia preclínica de al menos un metabolito secundario mediante la evaluación de su potencial antidiabético a través de ensayos agudos y de tolerancia a la sacarosa.

5. Parte experimental

5.1 *Material vegetal*

Las hojas de *Hintonia latiflora* (Figura 12) fueron recolectadas e identificadas por Sol Cristians Niizawa en Huetamo (18°31.7090 N, 101°4.6920 W; 221 msnm), Michoacán, México, en Julio de 2010. Un voucher de referencia (131,316) se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.



Figura 12. Hojas y flor de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae); Fotografía tomada por Sol Cristians Niizawa.

5.2 *Obtención del material fúngico*

Los microorganismos endófitos MEXU 27095 (Chaetomiaceae) y *Xylaria feejeensis* (Berk.) Fr [MEXU 27555] (Xylariaceae) [Figura 13 A y 13 B, respectivamente] se obtuvieron a partir de hojas frescas y sanas de la especie *Hintonia latiflora*, de acuerdo con el procedimiento descrito por Leyte-Lugo y colaboradores en 2012 (Leyte-Lugo et al., 2012). La identificación y clasificación taxonómica de las especies fúngicas fue establecida por la Dra. María del Carmen González Villaseñor (Instituto de Biología, UNAM) y por el Dr. Anthony Glenn (Toxicology & Mycotoxin Research Unit, USDA-ARS, Georgia, E.U.A.). Para la identificación molecular se secuenció el espaciador transcrito interno (ITS), región 1 y 2, así como el RNA ribosomal 5.8S y 28S. Las

secuencias se depositaron en el GenBank y se compararon con la base de datos utilizando el programa de alineamiento de secuencias BLAST. Una muestra de referencia de cada una de las especies se encuentra depositada en la colección fúngica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología.

La especie *Chaetomium globosum* Kunze y Schmidt (Chaetomiaceae) [Figura 13C] fue proporcionada por la Dra. Genoveva García Aguirre, Investigadora del Instituto de Biología, UNAM. Este microorganismo se obtuvo como un fitopatógeno de granos de maíz.

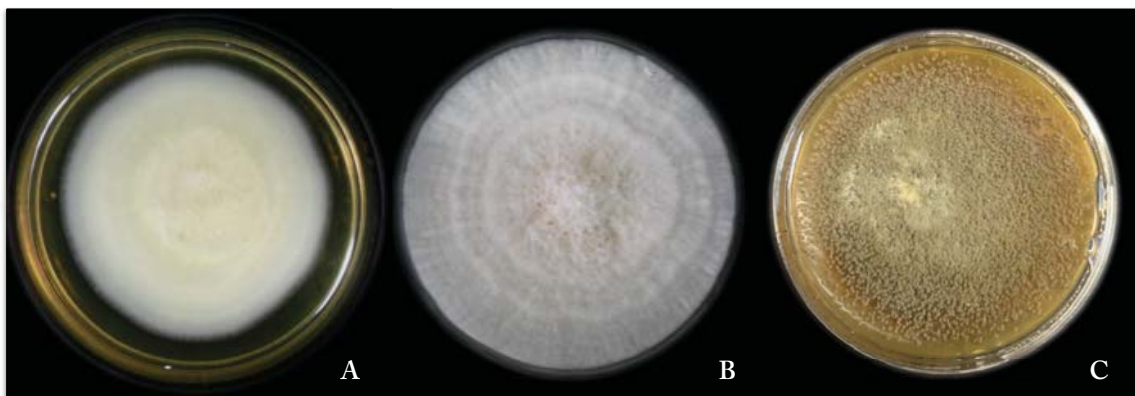


Figura 13. (A) Especie fúngica MEXU 27095 (Chaetomiaceae). (B) Especie fúngica *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae). (C) Especie fúngica *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae).

5.3 Análisis cromatográfico

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron en placas de vidrio (modalidad preparativa) o aluminio (modalidad analítica), recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck® [tamaño de partícula 3.5-7.0 ASTM y de 0.25 mm de espesor]. Se emplearon diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con lámpara de luz UV a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm). Como agente revelador se utilizó una solución de sulfato sérico amoniacal en ácido sulfúrico.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck® [tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM] o Sephadex® LH-20 (Pharmacia-Biotech) de acuerdo a las técnicas convencionales, empleando diferentes sistemas de elución. En el primer caso se utilizaron mezclas de polaridad

creciente preparadas con hexano, CH_2Cl_2 y CH_3OH . En el segundo, se utilizó CH_2Cl_2 o CH_3OH como eluyente.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2996 o 2998). Para el control del equipo, así como para la adquisición y manipulación de datos se utilizó el programa Empower® Versión 2.0 o 3.0 (Waters®). Los análisis cromatográficos se realizaron en fase reversa utilizando diferentes gradientes de elución y en columnas C_{18} : SymmetryPrep™ $7\mu\text{m}$ (7.8×300 mm, 2.0 mL/min) [Waters®], Symmetry® $5\mu\text{m}$ (4.6×250 mm, 0.6 mL/min) [Waters®], Gemini-NX (21.2×250 mm, 20.0 mL/min) y Gemini-NX (4.6×250 mm, 1.0 mL/min) [Phenomenex]. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

5.4 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros en el IR se obtuvieron por reflectancia y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 400 FT-IR. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV, en CH_3OH o CH_3CN . Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Jasco modelo P-1030 a $25\text{ }^\circ\text{C}$, a la longitud de onda de la línea D-sodio (589 nm) en CH_3OH o CHCl_3 . Los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron en los siguientes espectrómetros: Varian Inova 500 a 500 (^1H) y 125 MHz (^{13}C); JEOL ECA 500 a 500 (^1H) y 125 MHz (^{13}C); Bruker Avance III a 400 (^1H) y 100 MHz (^{13}C); Varian Mercury 300 a 300 (^1H) y 75.4 MHz (^{13}C), utilizando CDCl_3 o $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ como disolvente y en algunos casos TMS como referencia interna; los desplazamientos químicos fueron registrados en ppm (δ). Los espectros de masas se generaron mediante ionización por electroespray (EM-ESI) en un espectrómetro LECO Pegasus 4D, o impacto electrónico (EM-IE) en un espectrómetro de masas JEOL JMS AX-505 HA; en tanto que los espectros de masas de alta resolución (EM-AR-ESI) se obtuvieron empleando un espectrómetro Orbitrap. El registro de los espectros se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química,

UNAM, el Instituto de Química, UNAM, y/o en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro (UNCG), Carolina del Norte, E.U.A.

5.5 Estudio químico de la especie fúngica MEXU 27095 (Chaetomiaceae)

5.5.1 Fermentación

El microorganismo MEXU 27095 se cultivó en 15 cajas de Petri (140 × 20 mm) conteniendo 120 mL de medio sólido agar papa-dextrosa (APD) por un periodo de 21 días a 25 °C. El inóculo consistió en un cultivo previo de ocho días de crecimiento del microorganismo en medio líquido papa-dextrosa (CPD).

5.5.2 Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de MEXU 27095 (Chaetomiaceae)

El extracto orgánico del microorganismo cultivado en cajas de Petri se preparó mediante una maceración del cultivo utilizando una mezcla de CH₂Cl₂-CH₃OH 9:1 (3 × 2 L). Al término de cada maceración, el extracto resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). Una vez que se eliminó el disolvente *in vacuo* se generaron 4.1 g de un residuo de color café. Parte de este extracto se sometió a un proceso de fraccionamiento preliminar mediante CCA, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil mezclas binarias de polaridad creciente, iniciando con hexano, luego CH₂Cl₂, hasta finalizar con una mezcla de CH₂Cl₂-CH₃OH [Hex-CH₂Cl₂ (100:0→0:100); CH₂Cl₂-CH₃OH (100:0→50:50)]. Este procedimiento generó seis fracciones primarias (F_I-F_{VI}).

5.5.3 Aislamiento, purificación e identificación de las thielavinas A (171), J (172) y K (173) a partir de la fracción primaria F_{VI}

La resolución de la fracción primaria F_{VI} (500 mg) mediante CCA con Sephadex® LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil, generó cuatro fracciones secundarias (F_{VI-1}-F_{VI-4}). La resolución de la fracción F_{VI-4} (390 mg) a través de CLAE-FR (Figura 14), utilizando una columna Symmetry® C-18 como fase estacionaria y una solución al 0.5 % de ácido fórmico en CH₃CN como fase móvil condujo, al aislamiento de las thielavinas A (171; 31 mg), J (172; 60.2 mg) y K (173; 68.5 mg).

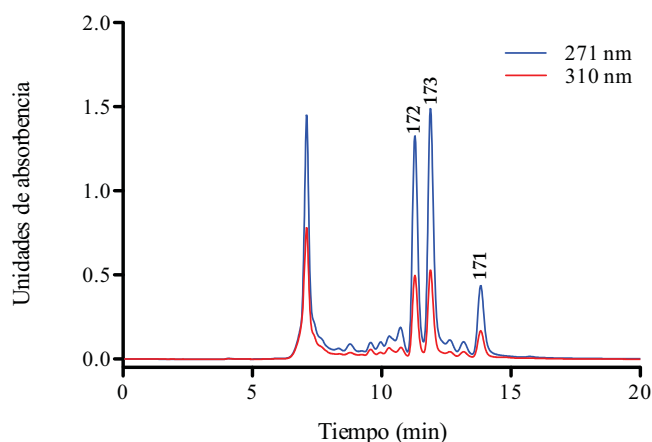


Figura 14. Cromatograma de la fracción secundaria F_{VI-4}.

Thielavina A (171): polvo blanco, ¹H-RMN (500 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm): 6.36 (1H, s, H-5''), 2.64 (3H, s, CH₃-6''), 2.61 (3H, s, CH₃-6), 2.55 (3H, s, CH₃-6'), 2.11 (3H, s, CH₃-5'), 2.09 (3H, s, CH₃-3'), 2.08 (3H, s, CH₃-3), 2.05 (3H, s, CH₃-3''); ¹³C-RMN δ_C (ppm): 169.9 (COOR-1''), 169.5 (COOR-1'), 168.9 (COOR-1), 164.0 (C-2''), 161.3 (C-4''), 157.8 (C-2'), 157.1 (C-2), 151.5 (C-4), 150.4 (C-4'), 140.1 (C-6''), 137.0 (C-6'), 136.3 (C-6), 121.3 (C-5), 119.5 (C-5'), 116.4 (C-3), 114.9 (C-1'), 114.8 (C-3'), 113.5 (C-1), 110.9 (C-5''), 109.0 (C-3''), 102.1 (C-1''), 23.5 (CH₃-6''), 17.5 (CH₃-6), 17.1 (CH₃-6'), 11.9 (CH₃-5), 11.8 (CH₃-5'), 8.7 (CH₃-3'), 8.6 (CH₃-3), 6.5 (CH₃-3'') [Figuras AI-1-AI-3]; EM-AR-ESI *m/z* [M-H]⁻ 537.1765 (Calcd. para C₂₉H₂₉O₁₀, 537.1772, -0.2 ppm).

Thielavina J (172): polvo blanco, ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 - $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$, 7:3) δ_{H} (ppm): 6.65 (1H, s, H-5), 6.34 (1H, s, H-5''), 3.87 (3H, s, OCH_3 -2'), 2.65 (3H, s, CH_3 -6''), 2.61 (3H, s, CH_3 -6), 2.39 (3H, s, CH_3 -6'), 2.19 (3H, s, CH_3 -3), 2.16 (3H, s, CH_3 -3'), 2.13 (3H, s, CH_3 -3''), 2.12 (3H, s, CH_3 -5'); ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 173.9 (COOR-1), 169.9 (COOR-1''), 166.3 (COOR-1'), 164.1 (C-2''), 163.2 (C-2), 160.4 (C-4''), 154.0 (C-2'), 152.9 (C-4), 149.4 (C-4'), 140.4 (C-6), 140.3 (C-6''), 132.9 (C-6'), 126.7 (C-1'), 125.7 (C-5'), 122.0 (C-3'), 116.7 (C-3), 115.9 (C-5), 111.2 (C-5''), 109.7 (C-1), 109.4 (C-3''), 102.9 (C-1''), 62.3 (OCH_3 -2'), 24.7 (CH_3 -6''), 23.9 (CH_3 -6), 16.8 (CH_3 -6'), 12.9 (CH_3 -5'), 10.1 (CH_3 -3'), 8.9 (CH_3 -3), 7.7 (CH_3 -3'') [Figuras AI-4-AI-7]; EM-AR-ESI m/z $[\text{M-H}]^+$ 539.1903 (Calcd. para $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{O}_{10}$, 539.1911, -3.7 ppm).

Thielavina K (173): polvo blanco, ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 - $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$, 7:3) δ_{H} (ppm): 6.36 (1H, s, H-5''), 3.86 (3H, s, OCH_3 -2'), 2.65 (3H, s, CH_3 -6''), 2.58 (3H, s, CH_3 -6), 2.41 (3H, s, CH_3 -6'), 2.23 (3H, s, CH_3 -3), 2.22 (3H, s, CH_3 -5), 2.18 (3H, s, CH_3 -3'), 2.13 (3H, s, CH_3 -5'), 2.12 (3H, s, CH_3 -3''); ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 170.1 (COOR-1), 169.9 (COOR-1''), 166.2 (COOR-1'), 164.0 (C-2''), 160.7 (C-4''), 157.8 (C-2), 154.3 (C-2'), 150.6 (C-4), 149.5 (C-4'), 140.2 (C-6''), 137.8 (C-6), 133.6 (C-6'), 126.3 (C-1'), 125.7 (C-5'), 122.0 (C-3'), 120.1 (C-5), 115.3 (C-3), 115.2 (C-1), 111.2 (C-5''), 109.4 (C-3''), 102.7 (C-1''), 62.0 (OCH_3 -2'), 24.6 (CH_3 -6''), 18.0 (CH_3 -6), 17.0 (CH_3 -6'), 12.9 (CH_3 -5'), 12.9 (C-5), 10.1 (CH_3 -3'), 9.6 (CH_3 -3), 7.5 (CH_3 -3'') [Figuras AI-8-AI-11]; EM-AR-ESI m/z $[\text{M-H}]^+$ 553.2060 (Calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{O}_{10}$, 539.1911, -3.5 ppm).

5.5.4 Aislamiento, purificación e identificación de la fimetarona (174) a partir de la fracción primaria F_{IV}

La resolución de la fracción primaria F_{IV} (100 mg) por CLAE-FR (Figura 15) utilizando una columna Symmetry[®] C-18 como fase estacionaria y una mezcla isocrática

CH₃CN-H₂O 35:65 como fase móvil, condujo a la obtención del producto fimetarona (174) como una mezcla equimolecular de atropoisómeros.

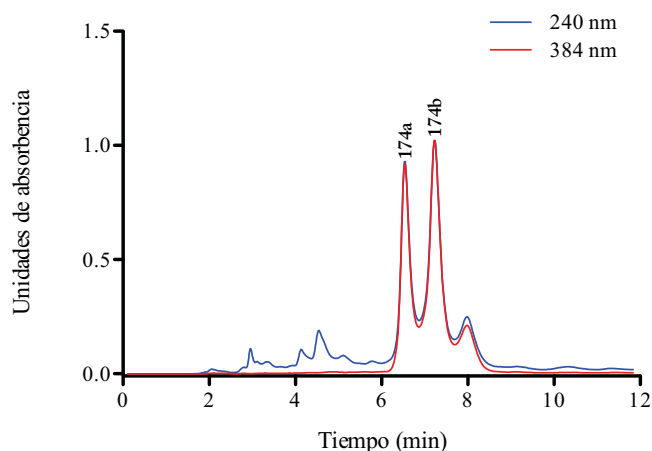


Figura 15. Cromatograma de la fracción primaria F_{IV}.

Fimetarona (174a): polvo amarillo, ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.64 (1H, s, H-13), 7.24 (1H, s, H-22), 6.62 (H, s, H-4), 4.83 (1H, d, *J* = 11.8 Hz, H-8b), 4.18 (1H, d, *J* = 11.8 Hz, H-8a), 3.94 (3H, s, OCH₃-31), 3.93 (3H, s, OCH₃-30), 3.90 (3H, s, OCH₃-29), 3.77 (3H, s, OCH₃-32), 3.10 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-17b), 2.46 (3H, s, CH₃-26), 2.43 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-17b), 2.27 (3H, s, CH₃-27); ¹³C-RMN δ_C (ppm): 201.3 (C-25), 191.2 (C-10), 189.7 (C-1), 170.8 (C-24), 165.5 (C-28), 163.1 (C-14), 155.2 (C-15), 151.0 (C-12), 150.9 (C-5), 148.7 (C-7), 147.6 (C-21), 142.8 (C-19), 136.9 (C-20), 134.5 (C-6), 126.4 (C-3), 121.1 (C-23), 114.6 (C-11, C16), 114.2 (C-18), 112.7 (C-2), 107.4 (C-13), 106.4 (C-22), 105.2 (C-4), 74.2 (C-8), 56.7 (OCH₃-30), 56.6 (OCH₃-31), 53.8 (C-9), 53.4 (OCH₃-29), 52.6 (OCH₃-32), 32.8 (C-26), 28.9 (C-17), 20.4 (C-27) [Figuras AI-12–AI-19]; EM-AR-ESI *m/z* 637.1556 [M + H]⁺ (Calcd. para C₃₂H₂₉O₁₄, 637.1557, +0.7 ppm).

Fimetarona (174b): polvo amarillo, ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.69 (1H, s, H-13), 7.27 (1H, s, H-22), 6.58 (H, s, H-4), 4.56 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, H-8b), 4.23 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, H-8a), 3.90 (3H, s, OCH₃-31), 3.89 (3H, s, OCH₃-30),

3.86 (3H, s, OCH₃-29), 3.73 (3H, s, OCH₃-32), 3.25 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-17b), 2.47 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-17b), 2.44 (3H, s, CH₃-26), 2.30 (3H, s, CH₃-27); ¹³C-RMN δ_c (ppm): 201.9 (C-25), 192.3 (C-10), 190.7 (C-1), 170.3 (C-24), 165.3 (C-28), 163.0 (C-14), 155.4 (C-15), 149.9 (C-12), 149.6 (C-5), 148.7 (C-7), 147.7 (C-21), 142.2 (C-19), 136.8 (C-20), 134.6 (C-6), 126.2 (C-3), 121.7 (C-23), 115.2 (C-11, C16), 114.1 (C-18), 112.7 (C-2), 107.1 (C-13), 106.7 (C-22), 105.4 (C-4), 74.4 (C-8), 56.9 (OCH₃-30), 56.8 (OCH₃-31), 52.6 (C-9), 53.1 (OCH₃-29), 52.6 (OCH₃-32), 33.0 (C-26), 29.5 (C-17), 22.8 (C-27); [Figuras AI-12–AI-19]; EM-AR-ESI m/z 637.1556 [M + H]⁺ (Calcd. para C₃₂H₂₉O₁₄, 637.1557, +0.7 ppm).

5.6 Estudio químico de la especie *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae)

5.6.1 Fermentación

La especie fúngica *Xylaria feejeensis* se cultivó en cajas de Petri en un medio de agar-papa-dextrosa (APD) durante 8 días a 37 °C. Posteriormente, fragmentos de 1 cm² del cultivo se transfirieron a un medio líquido estéril de papa-dextrosa (CPD, 2 × 20 mL). El cultivo se realizó a temperatura ambiente por un periodo de ocho días en agitación (250 rpm). Al cabo de este tiempo, los inóculos se transfirieron a dos matraces de cultivo para su fermentación en medio sólido (200 g de arroz en 400 mL de agua). El cultivo se mantuvo durante 30 días a temperatura ambiente.

5.6.2 Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae)

El extracto orgánico se obtuvo por sucesivas maceraciones del medio de cultivo utilizando como disolvente una mezcla CH₂Cl₂-CH₃OH, 9:1 (3 × 2 L). Al término de cada maceración la solución resultante se secó sobre Na₂SO₄ y concentró *in vacuo* (4.0 g). Posteriormente, el extracto (3.5 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento preliminar mediante CCA sobre gel de sílice; como fase móvil se emplearon mezclas binarias de

polaridad creciente, iniciando con hexano, luego incorporando CH_2Cl_2 , para finalizar con una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH (50:50). Este procedimiento generó seis fracciones primarias (F_I - F_VI).

5.6.3 Aislamiento, purificación e identificación del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -*D*-manopiranosido de pestalotina (175) a partir de la fracción primaria F_VI

La resolución de la fracción primaria F_VI (700 mg) a través de CLAE-FR (Figura 16), utilizando una columna Symmetry[®] C-18 como fase estacionaria y una mezcla isocrática CH_3CN - H_2O 30:70 como fase móvil, condujo a la obtención del producto 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -*D*-manopiranosido de pestalotina (175) como un sólido vítreo de color café.

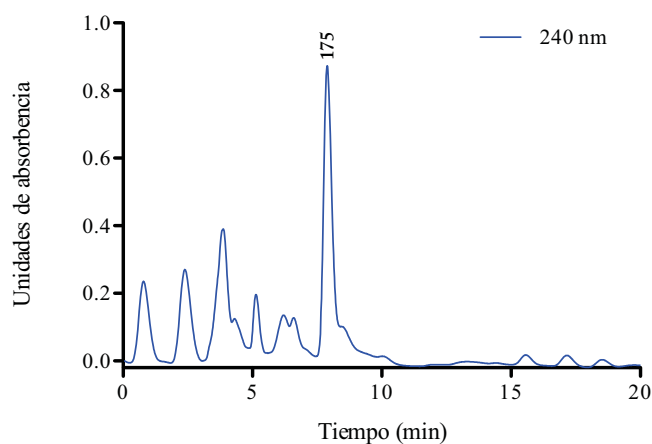


Figura 16. Cromatograma de la fracción primaria F_VI .

6*S*,7*S*-(-)-4'-*O*-metil- β -*D*-manopiranosido de pestalotina (175): sólido vítreo color café; $[\alpha]_\text{D} = -49.0$ (c 0.1, CH_3OH); UV (CH_3OH) λ_{max} 239 nm; DC (CH_3OH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 210 nm (20.3) y 242 nm (-21.2); Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C NMR [Figuras AI-20-AI-25] se resumen en el Cuadro 4; EM-AR-ESI m/z 391.1944 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (Calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_9$, 391.1963, -4.8 ppm).

5.6.4 Aislamiento, purificación e identificación de la 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (176), 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (177) y 3*S*-(+)-8-metoximeleina (178) a partir de la fracción F_{III}

La resolución de la fracción primaria F_{III} (200 mg) se realizó por CLAE-FR en su modalidad preparativa (**Figura 17**) utilizando una columna Gemini-NX como fase estacionaria y un gradiente de 0.1 % de ácido fórmico acuoso-CH₃CN como fase móvil (100:0, 0-3 min; 50:50, 3-13 min; 50:50, 13-20 min). Este procedimiento condujo a la obtención de los productos 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (**176**; 3.0 mg), 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (**177**; 1.9 mg) y 3*S*-(+)-8-metoximeleina (**178**; 3.2 mg).

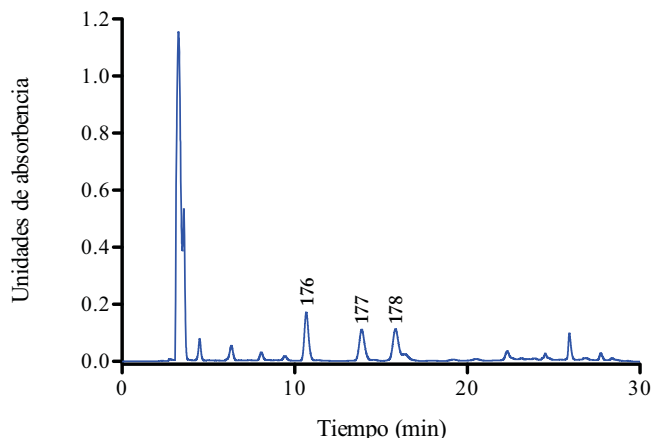


Figura 17. Cromatograma de la fracción primaria F_{VI}.

3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (176): sólido amarillo; $[\alpha]_D = + 32.0$ (*c* 0.1, CH₃OH); UV λ_{\max} CH₃OH 207.5 nm (0.917), 233.5 nm (0.392) y 326.0 (0.535); DC CH₃OH λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 207 (-5.08), 224 (-0.63), 251 (+2.44) y 316 (-0.5) (-21.17); Los datos de RMN de ¹H y ¹³C NMR [**Figuras AI-26–AI-29**] se resumen en la **Cuadro 5**; EM-AR-ESI *m/z* 195.0652 [M + H]⁺ (Calcd. para C₁₀H₁₁O₄, 195.0652, +0.1 ppm).

3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (177): sólido amarillo; $[\alpha]_D = + 3.0$ (*c* 0.1, CH₃OH); UV λ_{\max} CH₃OH 205.5 nm (0.781), 245.0 nm (0.174) y 313.0 (0.124); DC CH₃OH λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 207 (+10.31), 243 (- 3.58) y 263 (+1.32); ¹H-RMN (500 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H

(ppm) 7.58 (1H, dd, $J = 7.5, 8.5$ Hz, H-6), 7.08 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 6.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 4.56 (1H, m, H-4), 4.56 (1H, m, H-3), 1.47 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃-3); ¹³C-RMN (125 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_C (ppm) 170.3 (C-1), 162.6 (C-8), 141.8 (C-4a), 137.8 (C-6), 117.7 (C-5), 117.7 (C-7), 108.5 (C-8a), 81.6 (C-3), 69.5 (C-4), 18.2 (CH₃-3) [Figuras AI-30–AI-33]; EM-AR-ESI m/z 195.0653 [M + H]⁺ (Calcd. para C₁₀H₁₁O₄, 195.0652, +0.6 ppm).

3*S*-(+)-8-metoximeleina (178): ¹H-RMN (500 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 7.54 (1H, dd, $J = 7.8, 8.2$ Hz, H-6), 7.06 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-7), 6.90 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 4.57 (1H, m, H-3), 3.89 (3H, s, 8-OCH₃), 2.97 (1H, dd, $J = 3.0, 16.2$ Hz, H-4b), 2.88 (1H, dd, $J = 11.2, 16.2$ Hz, H-4a), 1.45 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-3); ¹³C-RMN (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_C (ppm) 165.5 (C-1), 162.5 (C-8), 143.8 (C-4a), 136.3 (C-6), 120.6 (C-5), 117.7 (C-8a), 112.1 (C-7), 76.1 (C-3), 56.4 (OCH₃-8), 36.6 (C-4), 20.7 (CH₃-3) [Figuras AI-34–AI-37]; EM-AR-ESI m/z 193.0859 [M + H]⁺ (Calcd. para C₁₁H₁₃O₃, 193.0865, -0.1 ppm).

*5.6.5 Aislamiento, purificación e identificación de la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179), 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) y 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) F_{IV}*

La resolución de la fracción primaria F_{IV} (200 mg) por CLAE-FR (Figura 18) utilizando la misma columna que para la fracción F_{III} y un gradiente 0.1 % de ácido fórmico acuoso-CH₃CN como fase móvil (90:10, 0-5 min; 0:100, 5-22 min) condujo a la obtención de los productos 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (**179**; 5.0 mg), 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (**180**; 28.5 mg) y 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (**181**; 13.2 mg).

2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179): sólido naranja; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm) 5.84 (1H, s, H-6), 3.87 (3H, s, OCH₃-5), 1.95

(3H, s, CH₃-3); ¹³C-RMN (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_C (ppm) 182.5 (C-1), 182.0 (C-4), 161.2 (C-5), 151.6 (C-2), 114.8 (C-3), 102.2 (C-6), 56.8 (OCH₃-5), 7.8 (CH₃-3) [Figuras AI-38-A-39]; EM-IE *m/z* 168 [M]⁺ (Calcd. para C₈H₈O₄).

4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180): sólido cristalino incoloro; [α]_D = -95.0 (*c* 0.16, CH₃OH); ¹H-RMN (400 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 5.26 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 4.51 (1H, s, H-6), 3.76 (3H, s, OCH₃-3), 3.22 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4), 1.57 (3H, s, CH₃-5); ¹³C-RMN (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_C (ppm) 196.3 (C-1), 175.8 (C-3), 98.5 (C-2), 69.5 (C-4), 61.2 (C-6), 60.8 (C-5), 57.5 (OCH₃-3), 19.1 (CH₃-5) [Figuras AI-40-A-43]; EM-AR-ESI *m/z* 171.0649 [M + H]⁺ (Ccalcd. para C₈H₁₁O₄, 171.0652, -1.7 ppm).

4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181): sólido cristalino; [α]_D = +57.0 (*c* 0.16, CH₃OH); ¹H-RMN (400 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 5.37 (1H, s, H-2), 4.15 (1H, s, H-4), 3.79 (3H, s, OCH₃-3), 2.65 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-6b), 2.44 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-6a), 1.31 (3H, s, CH₃-5); ¹³C-RMN (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_C (ppm) 200.2 (C-1), 178.9 (C-3), 101.9 (C-2), 74.3 (C-4), 73.2 (C-5), 57.5 (OCH₃-3), 48.8 (C-6), 25.7 (CH₃-5) [Figuras AI-44-AI-47]; EM-AR-ESI *m/z* 173.0810 [M + H]⁺ (Calcd. para C₈H₁₃O₄, 173.0808, +1.0 ppm).

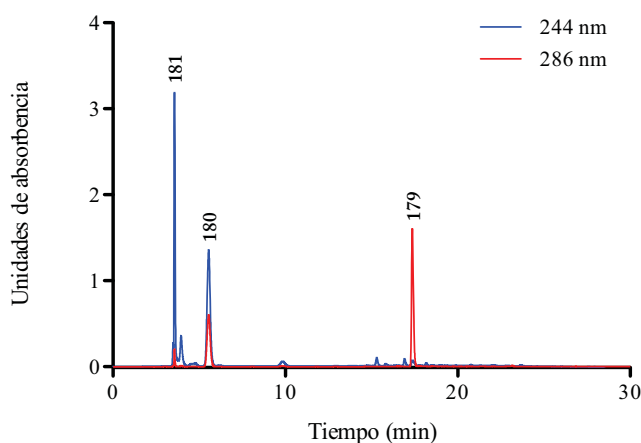


Figura 18. Cromatograma de la fracción primaria FIV.

*5.7 Estudio químico del microorganismo fúngico *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae)*

5.7.1 Fermentación

El inóculo se obtuvo tras un cultivo en cajas de Petri (50 × 10 mm) utilizando el medio APD durante 8 días a 37 °C. Fragmentos de 1 cm² del cultivo se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL (2 × 20 mL) con medio líquido CPD. El cultivo del microorganismo se realizó a temperatura ambiente por un periodo de ocho días en agitación (250 rpm). Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, los inóculos se transfirieron a un frasco fermentador de 10 L conteniendo 2.5 L de medio CPD. El cultivo del microorganismo se mantuvo por 30 días a temperatura ambiente.

*5.7.2 Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae)*

Una vez finalizado el proceso de fermentación, el micelio (biomasa) y el medio de crecimiento se separaron por medio de una filtración simple. El extracto orgánico del micelio se preparó mediante un proceso de maceración por tres días, utilizando una mezcla CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1); este proceso se realizó por triplicado. El extracto orgánico del medio de cultivo se obtuvo mediante repartos sucesivos utilizando una mezcla CH₂Cl₂-CH₃OH (9:1). Los extractos orgánicos obtenidos (micelio y medio de crecimiento) fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica obteniéndose 1.4 g de un residuo de color amarillo. Parte del extracto orgánico (600 mg) se sometió a un proceso de fraccionamiento primario por CCA sobre Sephadex LH-20, utilizando como sistema de elución CH₃OH. El procedimiento anterior generó un conjunto de cinco fracciones primarias (F_I-F_V).

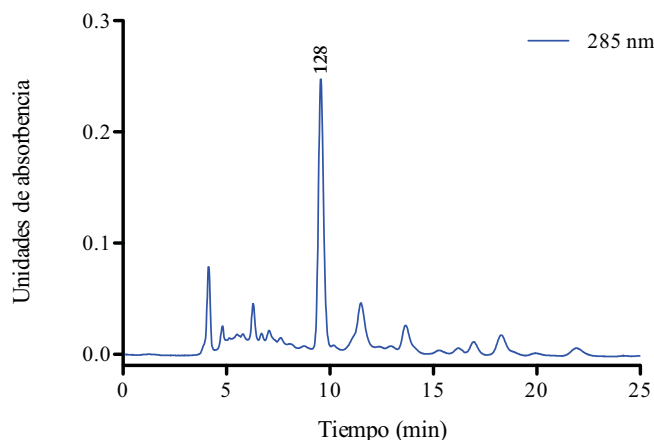


Figura 19. Cromatograma de la fracción primaria F_{IV}.

5.7.3 Aislamiento y purificación de la chaetomina (128)

La resolución de la fracción primaria F_{IV} (300 mg) por CLAE-FR (Figura 19) utilizando una columna Symetry C-18 y una mezcla isocrática 70:30 CH₃CN-H₂O como fase móvil condujo al aislamiento de la chaetomina (128, 45.2 mg).

Chaetomina (128): sólido amarillo, ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.65 (1H, m, H-11'), 7.34 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-7), 7.29 (H, m, H-9), 7.29 (1H, m, H-14'), 7.23 (1H, m, H-12'), 7.22 (1H, m, H-13'), 7.19 (1H, brs, H-9'), 6.95 (1H, td, *J* = 0.9, 7.5 Hz, H-8), 6.80 (1H, d, *J* = 7.9, H-10), 6.21 (1H, s, H-5), 5.32 (1H, s, NH-6), 4.41 (1H, d, *J* = 15.3 Hz, H-11-b), 3.87 (1H, dd, *J* = 1.0, 15.4 Hz, H-7'b), 3.70 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-7'a), 3.08 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-11-a), 3.20 (3H, s, NCH₃-2), 3.17 (3H, s, NCH₃-2'), 3.20 (3H, s, NCH₃-5'); ¹³C-RMN δ_C (ppm): 167.0 (C-4'), 165.7 (C-1), 165.7 (C-1'), 1634 (C-4), 148.5 (C-6a), 134.2 (C-10'a), 136.1 (C-9), 130.6 (C-14'a), 127.4 (C-9'), 126.7 (C-10a), 125.2 (C-7), 123.0 (C-12'), 120.8 (C-13'), 120.6 (C-8), 119.3 (C-11'), 111.5 (C-14'), 111.3 (C-10), 107.9 (C-8'), 80.3 (C-11a), 80.3 (C-5), 76.7 (C-6'), 75.0 (C-3'), 73.7 (C-10b), 73.3 (C-3), 61.4 (C-3'a), 60.8 (C-3a), 42.8 (C-11), 28.4 (NCH₃-5'), 27.7 (NCH₃-2), 27.5 (NCH₃-2'), 27.3 (C-7') [Figuras AI-48–AI-52];

EM-AR-ESI $m/z = 711.1187$ $[M + H]^+$ (calcd. para $C_{31}H_{31}N_6O_6S_4$, 711.1182, +0.6 ppm).

5.8 Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio de los extractos orgánicos, fracciones y productos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas

El efecto de los extractos, fracciones y productos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas se realizó espectrofotométricamente en cajas de 96 pozos con un equipo iMark (BioRad®; $\lambda = 405$ nm), a 37 °C. Los extractos orgánicos (2500 ppm), las fracciones (2500 ppm), los compuestos (10 mM) y la acarbosa (control positivo, 30 mM) fueron disueltos en CH_3OH -buffer de fosfatos (100 mM, pH = 7). Posteriormente, alícuotas de entre 0 y 10 μ L de la sustancia de prueba (triplicado) se incubaron por 10 minutos con 20 μ L de una solución enzimática obtenida a partir de intestino de rata (CR), 0.4 U/mL de α -glucosidasa de *Bacillus stearothermophilus* (α GHBs), o 0.75 U/mL de α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (α GHY) en buffer de fosfatos. Después de la incubación, se adicionaron 10 μ L de la solución de sustrato [α -D-glucopiranosido de paranitrofenilo (p NPG), 10 mM para α GHBs y CR, y 5 mM para α GHY], y se tomó la primera lectura de absorbancia ($t = 0$). Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó por un periodo de 20 minutos a 37 °C para las enzimas α GHBs y α GHY. En el caso de la enzima CR el periodo de incubación fue de 30 minutos. Al término de este tiempo se realizó una segunda lectura de absorbancia ($t = 20, 30$). Para el control del equipo, así como para la adquisición, el manejo y la manipulación de datos se utilizó el programa MicroPlate Manager 6® (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013; Anaya-Eugenio et al., 2014). El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de las muestras se calculó en comparación con un blanco (enzima sin inhibidor) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición GH} = \left(1 - \frac{A_{405} t}{A_{405} c}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde $A_{405} t$ es la absorbancia corregida de la sustancia de prueba ($A_{405}t_{\text{final}} - A_{405}t_{\text{inicial}}$) y $A_{405} c$ es la absorbancia del blanco corregida ($A_{405}c_{\text{final}} - A_{405}c_{\text{inicial}}$). La concentración de muestra requerida para inhibir el 50 % de la actividad enzimática (CI_{50}) fue calculada mediante una regresión no lineal, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^s} \quad \text{Ecuación 2}$$

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

5.9 Estudios de cinética enzimática de productos puros

Para la determinación del tipo de inhibición de los productos evaluados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas se siguió el protocolo descrito en el inciso anterior, realizando curvas de saturación por sustrato (0-2 mM) a diferentes concentraciones del inhibidor. El modo de inhibición de los productos se analizó mediante los gráficos de doble recíprocos de Lineweaver-Burk. El valor de las constantes de inhibición se calculó a través de un análisis de regresión no lineal utilizando la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\max}S}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + S \left(1 + \frac{[I]}{\alpha k_i}\right)} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde v es la velocidad inicial en ausencia y presencia de inhibidor; S e I son las concentraciones de sustrato en inhibidor, respectivamente; V_{\max} es la velocidad máxima; k_m es la constante de Michaelis-Menten; k_i es la constante de inhibición competitiva; y αk_i es

la constante de inhibición no competitiva. El análisis de datos se realizó con el programa Origin 8.0 o Prisma 5.0 (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013).

5.10 Evaluación de la eficacia preclínica de la thielavina K (173)

Para la evaluación de la eficacia preclínica del producto **173** se utilizaron ratones macho de la cepa ICR de un peso aproximado de 20-30 g, adquiridos comercialmente de Harlan México S.A. de C.V. Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura 21 ± 2 °C, alimento y agua *ad libitum*, 70-80 % de humedad relativa y un ciclo de 12 h luz/oscuridad, atendiendo además los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999.

Para el desarrollo de los experimentos, los animales fueron privados de alimento cuatro horas antes de la evaluación pero con acceso libre al agua. Las muestras a evaluar se disolvieron en solución salina isotónica (NaCl 0.9 %) y administraron a razón de 0.2 mL/10 g de peso. En las pruebas biológicas se utilizaron dos tipos de controles uno positivo y un blanco conteniendo solamente el vehículo (Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013; Anaya-Eugenio et al., 2014).

5.10.1 Evaluación del potencial antihiper glucémico e hipoglucemiante de la thielavina K (173)

La actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica de la thielavina K (**173**) se evaluó en modelos de tipo agudo diseñados a partir de protocolos ya descritos en la literatura, tanto en ratones normoglucémicos como en hiper glucémicos. Para cada ensayo se emplearon 40 ratones divididos en cinco grupos ($n = 8$) [Rivera-Chávez et al., 2013]. En todos los experimentos, las muestras sanguínea se recolectaron de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en la cola. Los niveles de glucemia se determinaron empleando el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un

glucómetro comercial (One Touch Ultra 2™, Jhonson-Jhonson, Milpitas, CA, E.U.A.) (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013).

5.10.2 Inducción experimental de hiperglucemia

Para la inducción experimental de hiperglucemia se administró por vía intraperitoneal (*i.p.*) una dosis de 50 mg/kg de nicotinamida (NA, Sigma Co., St Louis MO) a animales normoglicémicos. Quince minutos después les fue administrada una dosis única de 120 mg/kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en solución amortiguadora de citratos 0.1 M (pH=4.5). Ambas soluciones fueron administradas a razón de 0.1 mL/10 g peso. La glucemia fue medida siete días después de la administración de la STZ (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013).

5.10.3 Efecto hipoglucemiante agudo de la thielavina K (173)

Después de cuatro horas de ayuno, los ratones normoglicémicos o hiperglicémicos, según el caso, se dividieron en cinco grupos (I-V) y fueron tratados *p.o.* de la siguiente forma: al primer grupo se le administró el vehículo (solución salina isotónica, NaCl 0.9 %), al segundo el control positivo glibenclamida (10.0 mg/kg) y los restantes (III-V) recibieron el tratamiento con thielavina K (173) a las dosis de 3.1, 10.0 y 31.6 mg/kg. Luego, los niveles de glucosa sanguínea (mg/dL) se determinaron a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas posteriores a la administración de los tratamientos.

La variación porcentual de glucemia de los animales se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Variación de glucemia} = \left(\frac{G_i}{G_t} \right) 100 \text{ Ecuación 4}$$

donde G_i es la glucemia basal (0 horas) y G_t es cada uno de los valores de glucemia a los distintos tiempos de muestreo (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013).

5.10.4 Prueba oral de tolerancia a la sacarosa de la thielavina K (173)

La prueba oral de tolerancia a la sacarosa (PTOS) se realizó en animales normoglucémicos e hiperglucémicos empleando cuarenta animales de experimentación divididos en cinco grupos ($n = 8$). Al primer grupo, se le administró el vehículo (solución salina isotónica, NaCl 0.9 %); al segundo, el control positivo acarbosa (5.0 mg/kg) y a los restantes (III-V), se les suministró thielavina K (173) a las dosis de 3.1, 10.0 y 31.6 mg/kg. Todos los tratamientos fueron administrados *p.o.* a razón de 0.2 mL/10 g de peso. Treinta minutos luego de los tratamientos, se administró a todos los animales una carga de sacarosa *p.o.* (3.0 g/kg). Los niveles de glucemia se midieron a los 0, 30, 60, 90 y 180 minutos posteriores a la administración de sacarosa; el porcentaje de variación de glucemia se determinó como se indicó en el apartado anterior (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012; Rivera-Chávez et al., 2013; Anaya-Eugenio et al., 2014).

5.11 Estudios de acoplamiento molecular

5.11.1 Proteínas

La estructura cristalográfica de la enzima α -glucosidasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, α GHY) se obtuvo del Protein Data Bank (código PDB: 3A4A). La estructura cristalográfica de la enzima α -glucosidasa de *Bacillus stearothermophilus* no se encuentra disponible en el PDB, por lo tanto se generó un modelo por homología. La secuencia de aminoácidos de la enzima (α GHB; EC 3.2.1.20) se obtuvo de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con clave de acceso (GenBank: D84648.1). La secuencia de aminoácidos se guardó en formato FASTA para

posteriormente realizar la búsqueda de secuencias homólogas (Park et al., 2008; Brindis et al., 2011). La búsqueda de secuencias homólogas de la enzima con estructuras cristalográficas reportadas se realizó utilizando el servidor PDB/BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El modelo tridimensional para la proteína α GHBs se construyó utilizando el servidor en línea SWISS-MODEL (<http://swissmodel.exp-asy.org>), y como estructura base el modelo cristalográfico de una α -glucosidasa aislada de *Geobacillus* sp. cepa HTA-462 (código PDB: 2ZE0), la cuál mostró un 94 % de identidad. El modelo generado fue optimizado geoméricamente con el programa HyperChem 8.0 y validado utilizando el programa ProCheck (Laskowski et al., 1996; Cavasotto y Phatak, 2009).

Las estructuras de las proteínas utilizadas en los cálculos de acoplamiento molecular se prepararon en la interfaz gráfica de AutoDock (AutoDockTool 1.5.4, ADT), donde se agregaron todos los átomos de hidrógeno y cargas de Kolleman. Los archivos fueron guardados en un formato apropiado para su posterior uso en Autogrid4.0 y AutoDock4.0.

5.11.2 Preparación de los ligandos

Todos los ligandos evaluados en los estudios de AM se construyeron en el programa Spartan'02 (www.wavefunction.com). La optimización geométrica se realizó usando Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con un campo de fuerza B3LYP/DGDZVP empleando el programa Gaussian 09, revisión A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, E.U.A.). Posteriormente, los ligandos fueron preparados con la asignación de las cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y la adición de hidrógenos polares mediante el programa AutoDock 4.2 con la interfaz ADT 1.5.4.

5.11.3 Acoplamiento molecular

La predicción de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó con el

programa AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>) empleando un Algoritmo Genético Lamarkiano (LGA) [Morris et al., 1998; Rudnitskaya et al., 2010; Çifci et al., 2012]. Para la predicción de los sitios y conformaciones de unión de menor energía, inicialmente se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego en una región de búsqueda (*grid*) de $126 \times 126 \times 126$ Å centrada en la proteína. Posteriormente, la conformación de menor energía (menor $\Delta G_{\text{unión}}$) resultante se utilizó como la inicial para llevar a cabo una nueva simulación en una región de búsqueda de $40 \times 40 \times 40$ Å centrada en el ligando. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA, un tamaño de población de 150 individuos, 2.5×10^6 evaluaciones energéticas y 100-250 corridas. Los resultados fueron analizados utilizando la interfaz ADT 1.5.4 (análisis por clúster), PyMol (De Lano y Scientific, 2002) o LIG-PLOT+ (www.ebi.ac.uk).

5.12 Cálculos de modelado molecular

La construcción, la minimización energética inicial y el análisis conformacional de las moléculas objeto de estudio se realizó con el programa Spartan'02, utilizando una búsqueda conformacional Monte Carlo, empleando mecánica molecular con un campo de fuerza MMFF94. Cada conformero se optimizó geométricamente utilizando DFT con un campo de fuerza híbrido (B3LYP) a un nivel de teoría DGDZVP en el programa Gaussian 09. Para cada una de las estructuras geométricamente optimizadas se calcularon sus parámetros termodinámicos y vibracionales a 278 K y 1 atm. Posteriormente, se realizó una selección de conformeros considerando la energía relativa respecto al ΔG con una ventana energética de 0 a 3 kcal/mol. Los valores de ΔG se obtuvieron de los cálculos de frecuencia vibracional como la suma de las energías electrónica y térmica (López-Vallejo et al., 2011; Suárez-Ortiz et al., 2013).

Los valores de $^3J_{\text{H-H}}$ se calcularon empleando el método GIAO utilizando el comando *spin-spin* durante los cálculos de RMN. El cálculo de la población conformacional expresada en términos de fracción molar de acuerdo a la distribución de Boltzman se calculó con el programa FracMol. Las constantes de acoplamiento teóricas

se calcularon como la suma del producto de la fracción mol para cada confórmero con su valor teórico individual según la siguiente ecuación:

$$J_{cal} = \sum_{i=1}^M n_i J_i \quad \text{Ecuación 5}$$

donde M es el número total de confórmeros considerados en el cálculo; n_i es la fracción molar del i ; J_i es la constante de acoplamiento del i ésimo confórmero; y J_{cal} es el valor de la constante de acoplamiento vecinal calculada (López-Vallejo et al., 2011; Suárez-Ortiz et al., 2013).

La comparación entre las constantes de acoplamiento teóricas y experimentales se llevó a cabo empleando el estadístico de error medio cuadrático (EMC) según la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^M (J_k^{exp} - J_k^{calc})^2}{M}} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde M es el número total de confórmeros considerados en la molécula, J_{exp} y J_{calc} las constantes de acoplamiento experimental y calculada, respectivamente (López-Vallejo et al., 2011).

Los valores obtenidos para las constantes de acoplamiento se corrigieron utilizando el factor de escalamiento: $f_{(sp^3)-(sp^3)} = 0.910$, de acuerdo con lo reportado por López-Vallejo y colaboradores en 2011 (López-Vallejo et al., 2011).

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se calcularon usando el comando $td = (full, nstates = 15)$ durante los cálculos, utilizando teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TDDFT) con un campo de fuerza híbrido (B3LYP) a un nivel de teoría DGDZVP.

Las constantes de acoplamiento vecinales ($^3J_{H-H}$) y espectros de DC para los conformeros optimizados se calcularon con el programa Gaussian 09, en un sistema operativo Linux a través de la supercomputadora MIZTLI de la UNAM (<http://www.super.unam.mx/>).

5.13 Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor *hCaM M124C-AF₃₅₀*

Los ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM en presencia de los ligantes se realizaron utilizando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-AF₃₅₀* a una concentración de 1 μM en solución amortiguadora de NaOAc 5 mM y 10 mM de CaCl_2 a pH 5.1, siguiendo la metodología descrita por González-Andrade y colaboradores 2009 (González-Andrade et al., 2009).

Los espectros de fluorescencia de cada uno de los compuestos analizados se registraron en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 25 °C. La adquisición de los datos se realizó por medio del software VINCI 1.6.SP4 (Experiment & Instrument Control). La λ_{ex} para el biosensor fue de 340 nm y la λ_{em} se registro en el intervalo de 410-550 nm. Una vez adquiridos los datos, se ajustaron para obtener la k_d del complejo proteína-ligando utilizando la siguiente expresión matemática:

$$v_0 = \frac{[1 + k_d + (L_0/P_0)] - \sqrt{[1 + (k_d/P_0) + (L_0/P_0)] - 4(L_0/P_0)}}{2} \quad \text{Ecuación 7}$$

En donde P_0 y L_0 son la concentración de proteína y ligando respectivamente y k_d es la constante de disociación (González-Andrade, Del Valle, et al., 2013). El análisis de datos se realizó con el programa Origin 8.0.

6. Resultados y discusión

6.1 Estrategia general utilizada en el estudio de las especies fúngicas MEXU 27095 (*Chaetomiaceae*), *Xylaria feejeensis* (*Xylaraceae*) y *Chaetomium globosum* (*Chaetomiaceae*)

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto de mayor alcance que tiene como objetivo primordial descubrir nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas a partir de diversas fuentes naturales (Brindis et al., 2011; Escandón-Rivera et al., 2012, Rivera-Chávez et al., 2013; Mata et al., 2013, Anaya-Eugenio et al., 2014).

El estudio se inició con la obtención del material fúngico a partir granos de maíz y de hojas sanas y maduras de la especie *Hintonia latiflora*, una especie utilizada para el tratamiento de la diabetes en México y Europa. Posteriormente, los microorganismos obtenidos se cultivaron en pequeña escala bajo diferentes condiciones de crecimiento con la finalidad de establecer las mejores para la biosíntesis de metabolitos bioactivos. Una vez concluido el periodo de fermentación se prepararon los extractos orgánicos a partir de la biomasa o medio de cultivo, mediante maceración y procesos de reparto, respectivamente. A continuación se evaluó el efecto de los extractos sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, α GHY) y un crudo enzimático obtenido a partir de intestino de rata (CR); la actividad enzimática se monitoreo mediante un método espectrofotocolorimétrico. Las especies cuyos extractos presentaron los mejores rendimientos y efectos inhibitorios de la actividad enzimática (≤ 250 ppm) fueron seleccionadas para su posterior estudio químico (Cuadro 2, Figura 20). Así, se seleccionaron los aislamientos MEXU 27095, *Xylaria feejeensis* y *Chaetomium globosum*, los dos primeros de *H. latiflora* y el tercero de granos de maíz.

Los endófitos se caracterizaron a partir de estudios morfológicos y genéticos realizados tanto en el Instituto de Biología de la UNAM, como en el Laboratorio de Micotoxinas del Russel Research Center perteneciente al Departamento de Agricultura

de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA por sus siglas en inglés). La especie fitopatógena se caracterizó en el Instituto de Biología de la UNAM.

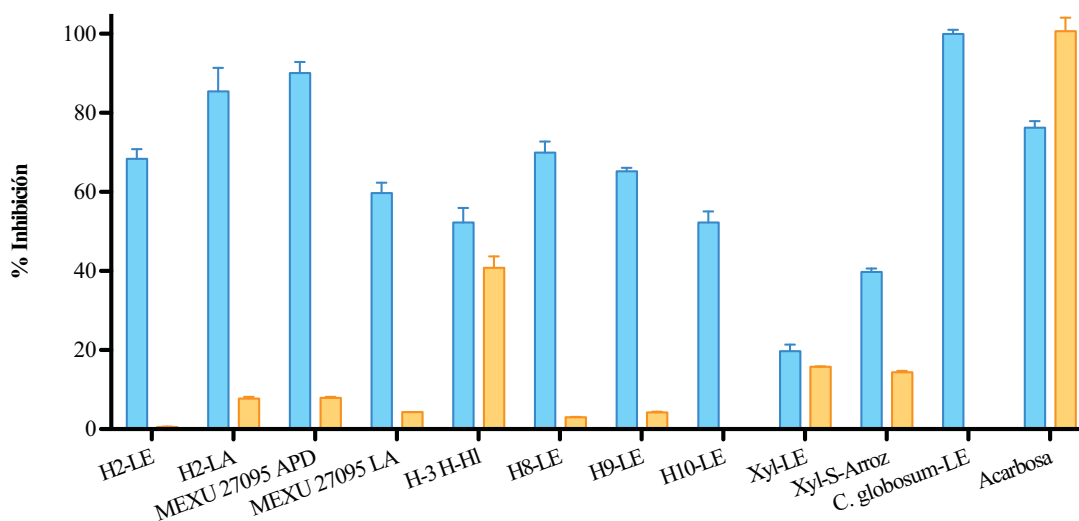


Figura 20. Efecto de los extractos orgánicos (250 ppm) de los hongos endófitos de *Hintonia latiflora* sobre la actividad de las enzimas α GHY (barras azules) y CR (barras naranjas). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos a partir de la fermentación de los hongos endófitos de *H. latiflora* en diferentes condiciones de cultivo.

Microorganismo y tipo	Medio de cultivo	Crecimiento en agitación o estático, tiempo	Rendimiento (mg/L)
H2, Endófito	Líquido CPD	Estático, 45 días	40.3
	Líquido CPD	Agitación, 45 días	77.7
MEXU27095, Endófito	Sólido APD	Estático	2813.3
	Líquido CPD	Estático	144.7
H3, Endófito	Líquido CPD- extracto <i>Hintonia latiflora</i>	Estático	68.2
H8, Endófito	Líquido CPD	Estático	52.8
H9, Endófito	Líquido CPD	Estático	55.2
H10, Endófito	Líquido CPD	Estático	264.6
<i>Xylaria feejeensis</i> , Endófito	Líquido CPD	Estático	-
	Sólido arroz	Estático	5000*
<i>Chaetomium globosum</i> , Fitopatógeno	Líquido CPD	Estático	560

APD= agar papa-dextrosa; CPD= caldo papa-dextrosa; * dato expresado en mg de extracto/kg de arroz.

Una vez seleccionadas las especies fúngicas y las mejores condiciones de cultivo, se repitió el proceso de fermentación en mediana escala con el objetivo de generar una cantidad suficiente de extracto para la obtención de los metabolitos activos. El aislamiento y la purificación de los productos se llevó a cabo a través de un fraccionamiento biodirigido, empleando distintas técnicas cromatográficas. Los productos puros resultantes se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos, espectrométricos y computacionales.

Los compuestos puros aislados se evaluaron para determinar su efecto sobre la enzima α GHY. Para algunos productos se determinaron también el tipo y las constantes de inhibición (k_i) mediante estudios de cinética enzimática. Asimismo, en algunos casos se evaluó el potencial antihiper glucémico e hipoglucemiante *in vivo*. Por último, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (AM) con la finalidad de predecir el sitio de unión de los inhibidores con la enzima α GHY.

La aplicación de la estrategia resumida en los párrafos anteriores permitió generar información novedosa sobre metabolitos fúngicos y su aprovechamiento potencial en la terapia de la diabetes.

6.2 Estudio químico y biológico de la especie fúngica MEXU 27095 (*Chaetomiaceae*)

El extracto orgánico obtenido del cultivo en medio sólido de MEXU 27095, inhibió de manera importante la actividad de la enzima α GHY con una CI_{50} =46.4 μ g/mL. El fraccionamiento biodirigido de este extracto (4.0 g), condujo a la obtención de tres tridépsidos identificados como thielavinas A (171), J (172), K (173) y de la fimetarona (174) [Figura 21]. El producto 174 posee un esqueleto único de tipo espiro[croman-3,7'-isocromen]-4,6'-(8'H)-diona y se obtuvo como una mezcla equimolar de atropoisómeros (*P/M*), tal y como describieron Li y colaboradores en 2012 (Li et al., 2012). La caracterización de los productos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (1 H-RMN, 13 C-RMN, HSQC, HMBC, COSY e IR) y espectrométricos (EM-ESI). La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con

aquellos previamente reportados en la literatura permitió la identificación de los cinco productos (Kitahara et al., 1981; Sakemi et al., 2002; Li et al., 2012) [Figuras A1-A19].

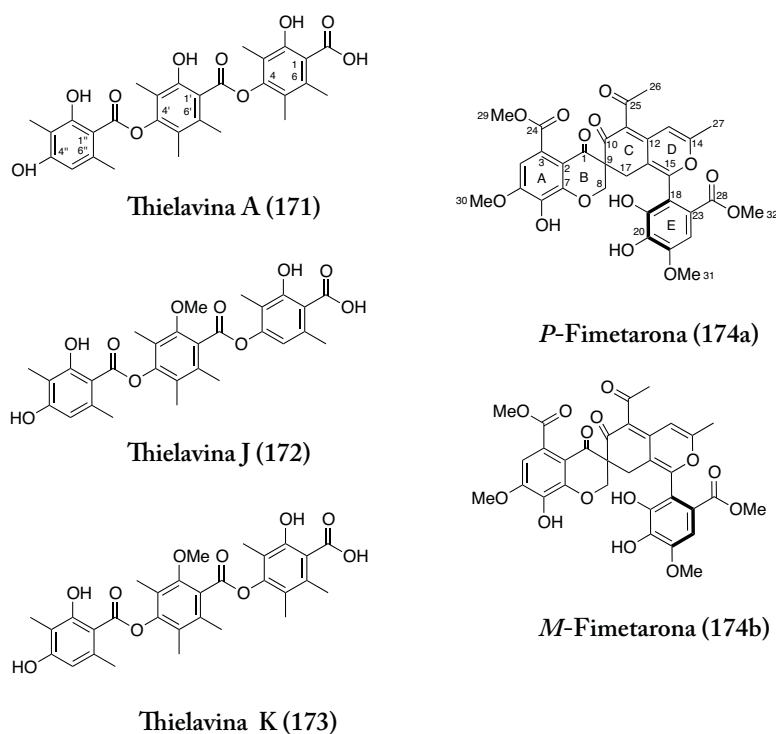
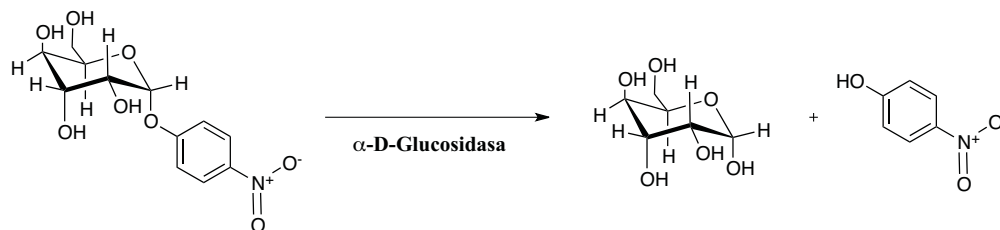


Figura 21. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de MEXU 27095 (*Chaetomiaceae*).

6.2.1 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α GHY de los metabolitos aislados de la especie MEXU 27095 (*Chaetomiaceae*)

La evaluación sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura (α GHY) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 5.8 de la sección experimental. La actividad de la enzima α -glucosidasa correlaciona con la cantidad de sustrato (α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo, *p*NPG) que se hidroliza en presencia del compuesto prueba (inhibidor) [Esquema 1]. Así, la cantidad de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado a partir del sustrato es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (Oki et al., 1999).



Esquema 1. Reacción de hidrólisis del *p*NPG en presencia de una α -glucosidasa.

Los resultados de estos experimentos indicaron que los productos 171-173 inhiben la actividad de la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración (Figura 22), con valores de CI_{50} de 23.8, 15.8 y 22.1 μ M, respectivamente. Es claro que las pequeñas diferencias estructurales entre los productos analizados no impactaron sustancialmente la actividad biológica (Rivera-Chávez et al., 2013). Los tres tridépsidos (171-173) fueron más potentes y eficaces que la acarbosa (control positivo [CI_{50} = 514 μ M]) contra la enzima α GHY, una glucosidasa de tipo I que hidroliza sustratos heterogéneos, tales como la sacarosa o *p*NPG. Sin embargo, la acarbosa (CI_{50} = 0.0015 μ M) fue mejor inhibidor que la thielavina J (172) [CI_{50} = 30.5 μ M] contra la enzima α -glucosidasa de *Bacillus stearothermophilus* (α GHBs), una glucosidasa de tipo IV con actividad maltasa. Las diferencias en el efecto inhibitorio de diferentes compuestos sobre la actividad de las α -glucosidasas de diferentes fuentes está bien documentada y se explica en términos del reconocimiento del sustrato (Oki et al., 1999).

Para obtener una mayor información sobre la naturaleza de la interacción de los productos 171-173 con la enzima α GHY, se construyeron los gráficos de doble recíprocos de Lineweaver-Burk, utilizando diferentes concentraciones de sustrato (*p*NPG) e inhibidor (171-173 y acarbosa). Posteriormente, se determinaron los parámetros cinéticos de la inhibición utilizando un ajuste no lineal (Ecuación 3). Los resultados de esta evaluación (Figura 23) indicaron que los productos 171-173 se comportan como inhibidores reversibles no competitivos que se unen a la enzima α GHY y al complejo α GHY-*p*NPG con una afinidad similar; los gráficos obtenidos consisten en una serie de líneas con diferentes pendientes que se intersectan en el segundo cuadrante, entre los ejes de las ordenadas y las abscisas (Segel, 1993; Copeland, 2000) [Esquema 2].

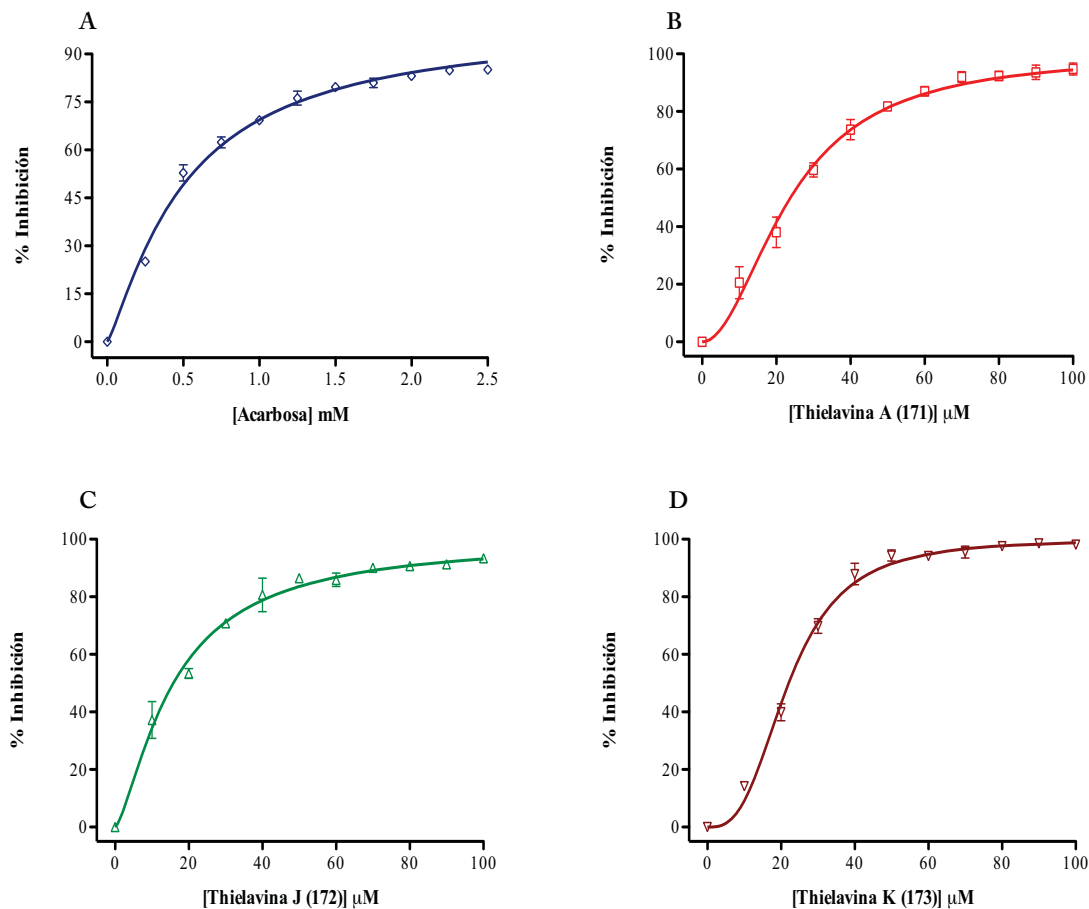


Figura 22. Curvas concentración-respuesta del efecto de los compuestos: (A) acarbosa, (B) thielavina A (171), (C) thielavina J (172) y (D) thielavina K (173) sobre la actividad de la enzima αGHY .

Cabe destacar que con estos experimentos se verificó que la acarbosa se comporta como un inhibidor competitivo; los gráficos del seudotetrasacárido consisten de rectas con diferentes pendientes que se interceptan en el eje de las ordenadas y a medida que aumenta la concentración del inhibidor el intercepto en el eje de las abscisas es más cercano a cero (Figura 22A) [Segel, 1993; Copeland, 2000]. Así, la acarbosa compite con el sustrato por el sitio catalítico de la enzima αGHY , siendo la unión de ambos mutuamente excluyente (Esquema 3).

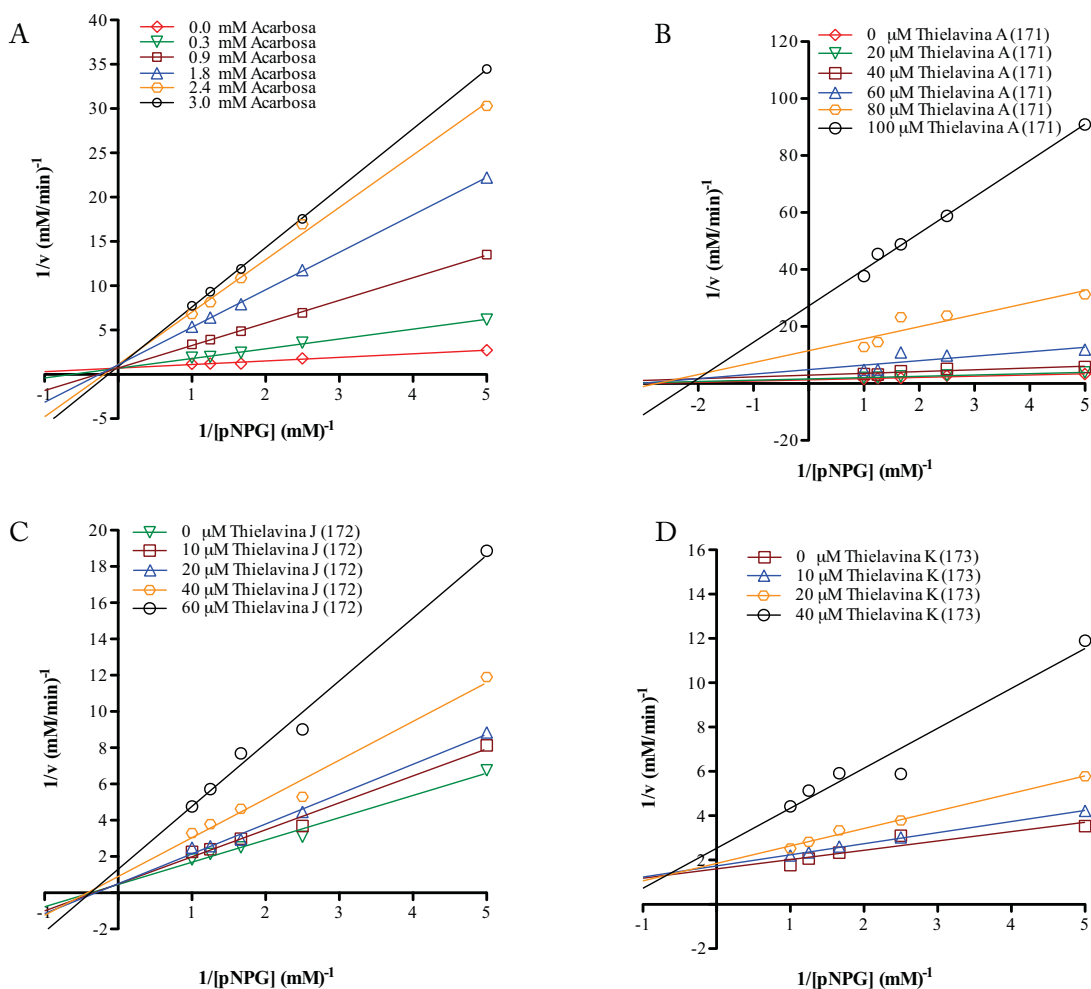
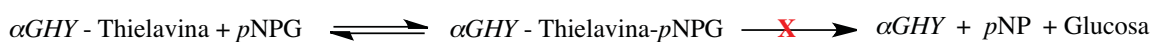
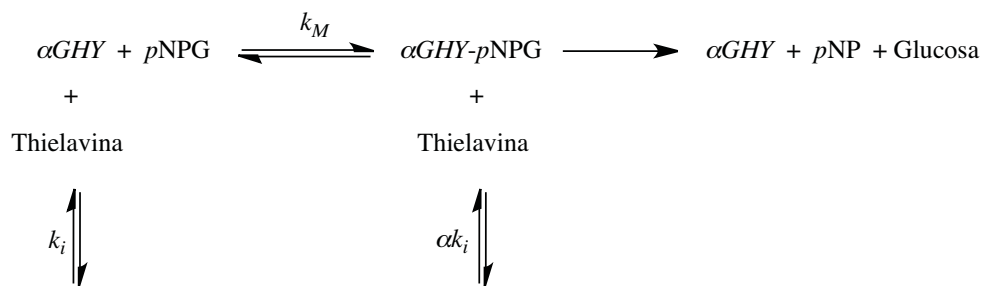
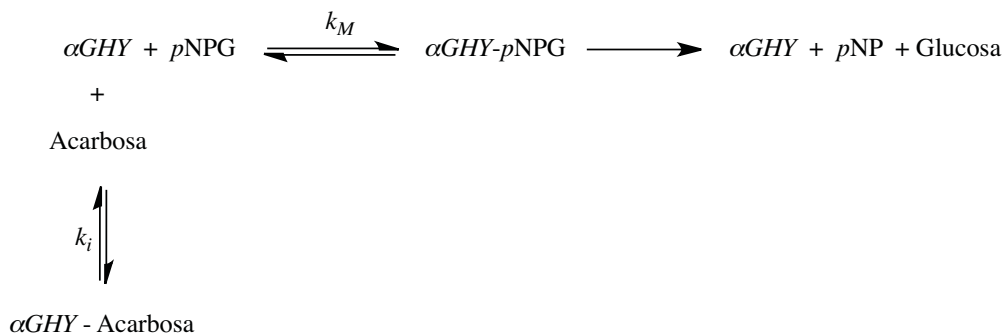


Figura 23. Gráficos de doble recíprocos de Lineweaver-Burk de los compuestos: (A) acarbosa, (B) thielavina A (171), (C) thielavina J (172) y (D) thielavina K (173) sobre la actividad de la enzima αGHY .



Esquema 2. Equilibrio de la enzima αGHY en presencia y ausencia de las thielavinas (inhibidores reversibles no competitivos).



Esquema 3. Equilibrio de la enzima αGHY en presencia y ausencia de acarbosa (inhibidor competitivo).

Por otra parte, los gráficos de Lineweaver-Burk generados para la interacción de la enzima αGHY con la acarbosa y el producto 172 (Figuras 24A y 24B, respectivamente) revelaron que ambos actúan como inhibidores no competitivos frente a esta enzima (Cuadro 3). En síntesis, estos resultados indicaron que los productos 171-173 inhiben a las enzimas α -glucosidasas de tipo maltasa y sacarasa con una afinidad similar (Davies y Henrissat, 1995; Nakai, 2005; Rivera-Chávez et al., 2013).

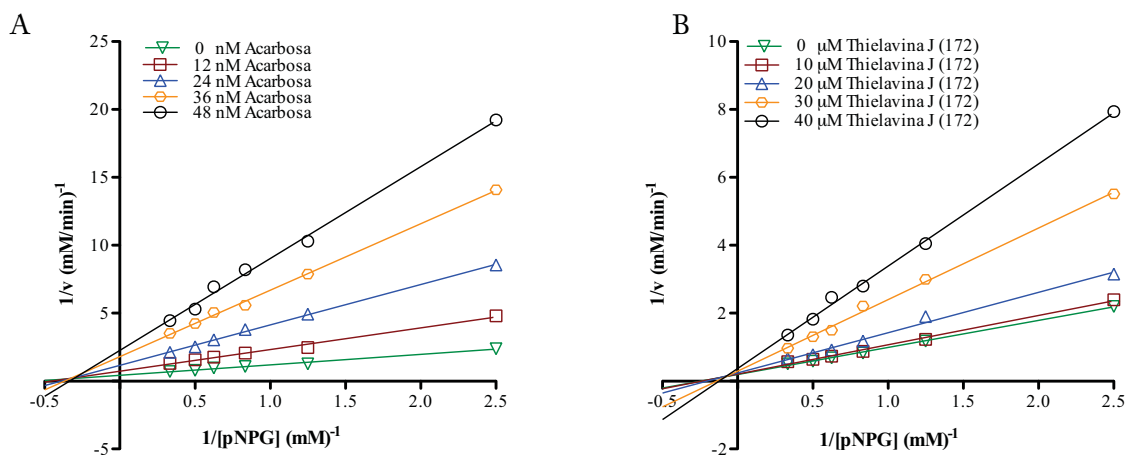


Figura 24. Gráficos de Lineweaver-Burk para: (A) acarbosa y (B) thielavina J (172) ilustrando el tipo de inhibición sobre la actividad de la enzima αGHY .

Cuadro 3. Parámetros de inhibición y cinética enzimática de los productos **171-173** y acarbosa.

Compuesto	% Inhibición	CI ₅₀ (μM)	<i>k_i</i> (μM)	<i>α</i>	Tipo de inhibición
<i>α</i> -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>αGHY</i>)					
Thielavina A (171)	94.8	23.8	27.8	1.0	No competitiva
Thielavina J (172)	93.4	15.8	66.2	1.2	No competitiva
Thielavina K (173)	98.1	22.1	55.4	0.7	No competitiva
Acarbosa	85.1	514.5	156.1	-	Competitiva
<i>α</i> -glucosidasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> (<i>αGHBs</i>)					
Thielavina J (172)	82.6	30.5	20.0	2.9	No competitiva
Acarbosa	85.5	0.015	0.008	1.9	No competitiva

6.2.2 Estudios de acoplamiento molecular de los productos 171-173

Con el objetivo de predecir el modo de interacción de los productos **171-173** con las enzimas *αGHY* y *αGHBs*, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (AM) (Morris et al., 1998; Huey et al., 2007; Rudnitskaya et al., 2010). Estos cálculos permiten estimar teóricamente la naturaleza de la interacción, el sitio probable de unión y la afinidad de unión entre un ligante y un receptor, generalmente de naturaleza proteica. El conocimiento del sitio de interacción entre un ligante y la macromolécula receptora constituye una herramienta poderosa para el diseño racional de fármacos, ya que permiten entender los factores estructurales *in silico* necesarios para la interacción de un fármaco con un blanco terapéutico, además de que pueden ser de utilidad para la elucidación de la función de algunas proteínas involucradas en procesos metabólicos. Las técnicas de AM utilizan una parametrización energética con la cual se obtienen constantes de unión o afinidad (*k_i*), y permiten predecir el sitio y la conformación de unión más probable entre un ligante y un receptor (Morris et al., 1998; Huey et al., 2007; Rudnitskaya et al., 2010).

Los estudios de AM se realizaron con la estructura cristalográfica del complejo isomaltasa-glucosa para la enzima *αGHY*, obtenida del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) [código PDB: 3A4A] y, una estructura protéica modelada por homología en el caso de la enzima *αGHBs* (maltasa) [Cavasotto y Phatak, 2009]. El estudio se inició con el desarrollo y validación de un protocolo de AM para ambas enzimas, usando sus ligantes naturales (isomaltosa y maltosa, respectivamente). Los

resultados de la validación indicaron que sólo la maltosa se une al sitio catalítico de la α GHBs, confirmando que la enzima es específica para la hidrólisis de α -1-4 maltosacáridos (Suzuki et al., 1984; Takii et al., 1996; Tsujimoto et al., 2007). Por otro lado, los resultados obtenidos para la enzima α GHY demostraron que sólo la isomaltosa se une al sitio catalítico, en congruencia con la especificidad de la enzima por sustratos que poseen enlaces α -1-6 (Yamamoto et al., 2004) [Figuras AI-58–AI-60].

Una vez que se estableció y validó el protocolo de cálculo, se procedió con el análisis teórico de la interacción de las enzimas α GHY y α GHBs con las thielavinas y la acarbosa. En todos los casos, se seleccionó la conformación de menor energía de cada ligante y a continuación se realizó un estudio preliminar que contempla la interacción del conformero seleccionado en la superficie total de la proteína (acoplamiento ciego) con la finalidad de establecer el mejor modo de interacción entre la proteína y los ligantes. Este proceso de refinamiento genera la mejor conformación aparente de interacción del complejo-ligante proteína. En el caso de la enzima α GHBs, el estudio de AM predijo que los productos 171-173, se unen en el sitio catalítico de la enzima adoptando una conformación similar a la de la acarbosa. El sitio de unión teórico (Figura 25) está constituido por los residuos de aminoácido Tyr-63, Arg-197, Asp-199, Phe-282, Gly-283, Leu-285, Gly-286 y Arg-300; las interacciones predichas por el análisis de AM para la estabilización de los complejos α GHBs-thielavinas son tanto hidrofóbicas como por enlaces de hidrógeno; estos últimos se observaron entre el hidroxilo en posición C-4" y el residuo Asp-199 (residuo involucrado en el dominio catalítico) y entre los aminoácidos Leu-285 y Arg-300 con el grupo carboxi de los productos 171-173. Las constantes de inhibición (k_i) calculadas para los productos 171-173 fueron 3.0, 4.3 y 3.4 μ M, respectivamente. Por otra parte, los estudios de AM permitieron predecir que la acarbosa se une a la enzima α GHBs en el sitio catalítico, con una constante de inhibición estimada de 28 nM. Estos resultados muestran buena correlación con los datos experimentales (Rivera-Chávez et al., 2013).

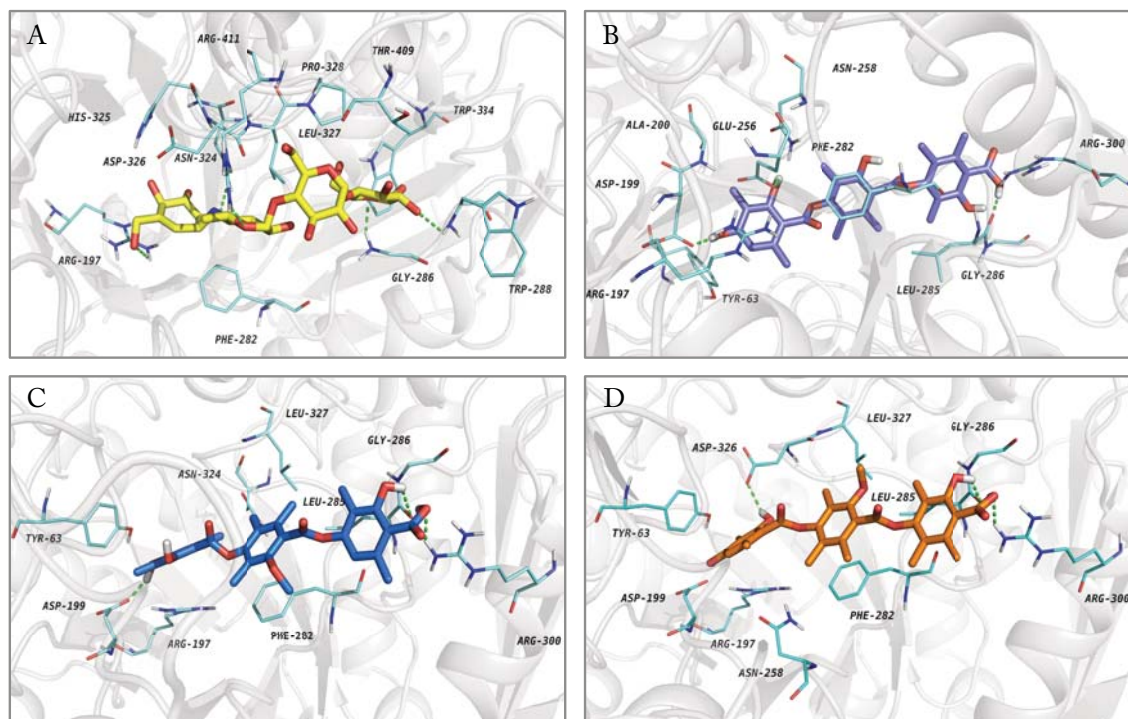


Figura 25. Modelo estructural generado para los complejos: (A) acarbosa (bastones amarillos)- α GHBs, (B) thielavina A (171, bastones morados)- α GHBs, (C) thielavina J (172, bastones azules)- α GHBs y (D) thielavina K (173, bastones naranjas)- α GHBs. En líneas color azul claro se muestran los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de cada uno de los productos. Gráficos generados con PyMol.

Los resultados de los estudios de AM de los productos 171-173 y la acarbosa con la enzima α GHY permiten predecir que los cuatro compuestos se unen a la enzima en un sitio cercano al dominio catalítico (Figura 26). La formación de puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos fueron las interacciones más importantes observadas en los complejos ligante-proteína. En todos los casos, el sitio de unión incluyó los aminoácidos Lys-156, Ser-157, Tyr-158, Ser-240, Ser-241, Asp-242, His-280, Ser-304, Asp-307, Pro-312, Leu-313 y Arg-315. La formación de enlaces de hidrógeno fue observada entre la Ser-240, Ser-241 y Asp-242 y el grupo carboxi de los productos 171-173. De manera adicional, el grupo carbonilo de la subunidad C₆-C₁ intermedia de los productos 171 y 173 forma un enlace de hidrógeno con el residuo Arg-315 del sitio catalítico. Las k_i calculadas para las thielavinas 171-173 fueron de 11.4, 1.1 y 4.9 μ M, respectivamente.

En síntesis, los resultados teóricos y experimentales indicaron que los productos 171-173 se unen a las enzimas α GHY y α GHBs en el mismo sitio que la acarbosa, adoptando una conformación similar a la del pseudotetrasacárido. Así, los estudios de AM sustentan los resultados experimentales de cinética enzimática (Rivera-Chávez et al., 2013).

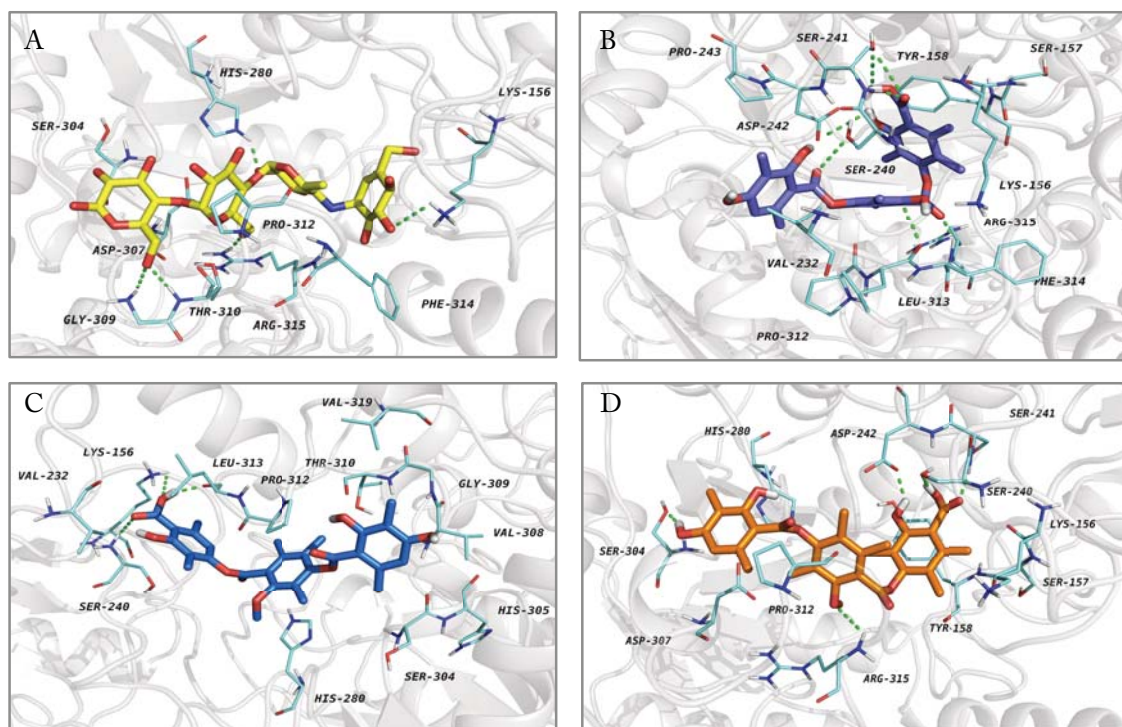


Figura 26. Modelo estructural generado para los complejos: (A) acarbosa (bastones amarillos)- α GHBs, (B) thielavina A (171, bastones morados)- α GHBs, (C) thielavina J (172, bastones azul rey)- α GHBs y (D) thielavina K (173, bastones naranjas)- α GHBs. En líneas azul claro se muestran los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de cada uno de los productos. Gráficos generados con PyMol.

6.2.3 Evaluación del potencial antihiper glucémico e hipoglucemiante *in vivo* de la thielavina K (173)

La thielavina K (173), el tridépsido aislado en mayor cantidad del extracto orgánico de MEXU 27095, se evaluó *in vivo* para determinar su potencial antihiper glucémico e hipoglucemiante. En primer lugar se realizó una prueba de tolerancia oral a la sacarosa (PTOS) utilizando ratones de la cepa ICR. La PTOS se

emplea para comprobar una inhibición de las enzimas α -glucosidasas *in vivo*. La prueba se realizó en dos grupos de animales, normoglucémicos e hiperglucémicos. El estado de hiperglucemia se logró a través de la administración *i.p.* de estreptozotocina (STZ, 120 mg/kg), 15 minutos después de una inyección de nicotinamida (NA, 50 mg/kg). El pretratamiento con NA tiene como objetivo proteger, de forma parcial, a los animales del daño que ocasiona la STZ, la cual genera radicales libres que son parcialmente atrapados por la NA, provocando así un daño menor a las células β -pancreáticas de los ratones. Entonces, el síndrome que se genera en los ratones es similar a un cuadro de diabetes mellitus tipo II (DMTII) [Masiello, 2006].

La thielavina K (173) se evaluó a tres dosis (3.1, 10 y 31.6 mg/kg), mismas que redujeron el pico posprandial significativamente ($p \leq 0.05$) en ratones normoglucémicos, 30 minutos después de una carga oral de sacarosa (3.0 g/kg); el efecto fue dosis-dependiente (**Figura 27**). En los ratones hiperglucémicos sólo la dosis de 31.6 mg/kg provocó una disminución significativa de los niveles de glucosa (**Figura 28**). La inhibición del pico posprandial fue comparable a la de la acarbosa (3.0 mg/kg). El efecto observado en la inhibición del pico postprandial tras la administración de la thielavina K (173) es congruente con una inhibición de las enzimas α -glucosidasas a nivel intestinal. De esta forma se corroboraron los resultados obtenidos *in vitro*.

El efecto hipoglucemiante potencial de la thielavina K (173) también se analizó en ratones (ver sección experimental, inciso 5.10.4). Los resultados obtenidos en animales sanos revelan que el compuesto posee propiedades hipoglucemiantes a las dosis de 10.0 y 31.6 mg/kg (**Figura 29**). En el caso de los animales hiperglucémicos el efecto mayor se apreció a la dosis de 10 mg/kg. En los dos casos el efecto se observó a las cinco horas de iniciado el tratamiento, y se mantuvo a lo largo del experimento (**Figura 30**). El efecto de la thielavina K (173) como agente hipoglucemiante *in vivo* no fue mejor que el de la glibenclamida (Gli, 10.0 mg/kg; usada como control positivo) [Rivera-Chávez et al., 2013].

Los resultados obtenidos de la evaluación *in vivo* sugieren que el compuesto 173 ejerce efectos hipoglucemiantes y antihiperglucémicos al interactuar con diferentes

blancos moleculares que incluyen las enzimas α -glucosidasas a nivel intestinal, y otros por definir. En este contexto cabe señalar que Sakemi y colaboradores (Sakemi et al., 2002) demostraron que **173** inhibe la acción de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa); así, el efecto hipoglucemiante *in vivo* demostrado en este estudio puede estar relacionado con la inhibición de esta enzima, lo que a su vez provocaría una reducción en la liberación de glucosa hepática vía los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis (Sakemi et al., 2002).

En resumen, la especie fúngica MEXU 27095 (Chaetomiaceae), un microorganismo endófito de *Hintonia latiflora* (copalchi), biosintetiza los tridépsidos (**171-173**) de la familia de las thielavinas. Estos compuestos inhiben las enzimas α -glucosidasas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios de acoplamiento molecular de los tres productos con la enzima α GHY permitieron predecir que estos se unen en el mismo sitio que la acarbosa adoptando una conformación similar. La evaluación *in vivo* de la thielavina K (**173**) demostró sus propiedades antihiperoglucémicas e hipoglucemiantes. Así, los productos de tipo thielavina representan una nueva clase de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

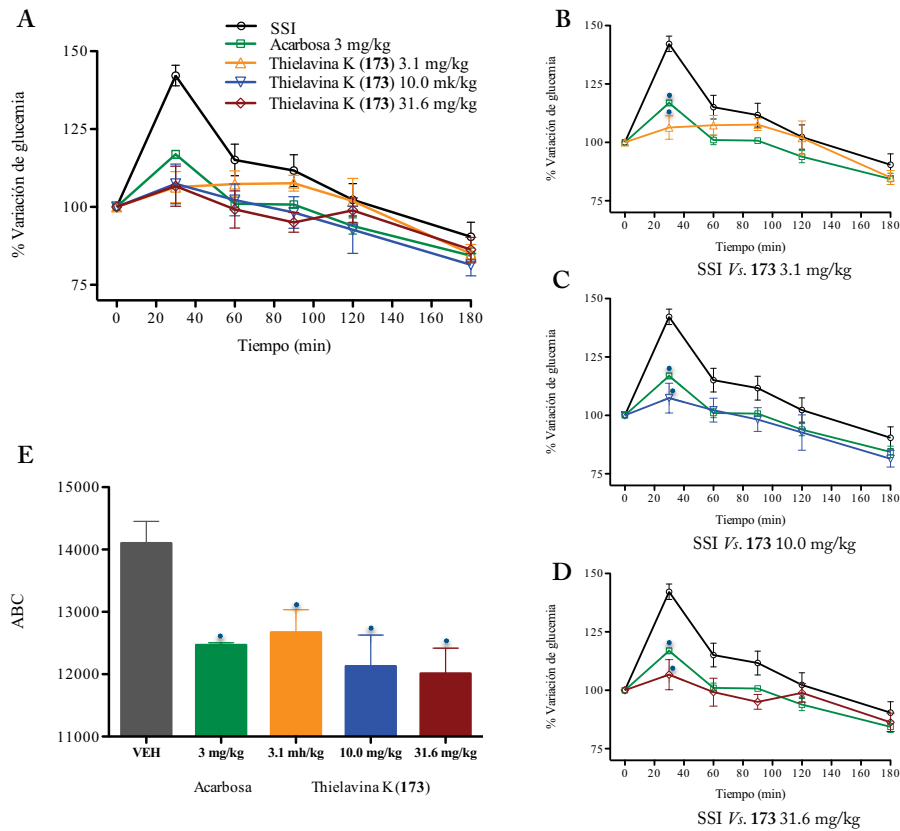


Figura 27. Efecto antihiper glucémico de la thielavina K (173) en ratones sanos. (A) Gráfica general, (B) SSI *vs* thielavina K (173, 3.1 mg/kg), (C) SSI *vs* thielavina K (173, 10.0 mg/kg), (D) SSI *vs* thielavina K (173, 31.6 mg/kg). * $p \leq 0.05$ en comparación a la SSI. (E) Gráfico de área bajo la curva. Cada barra o punto representa el promedio \pm EE para los animales de cada grupo.

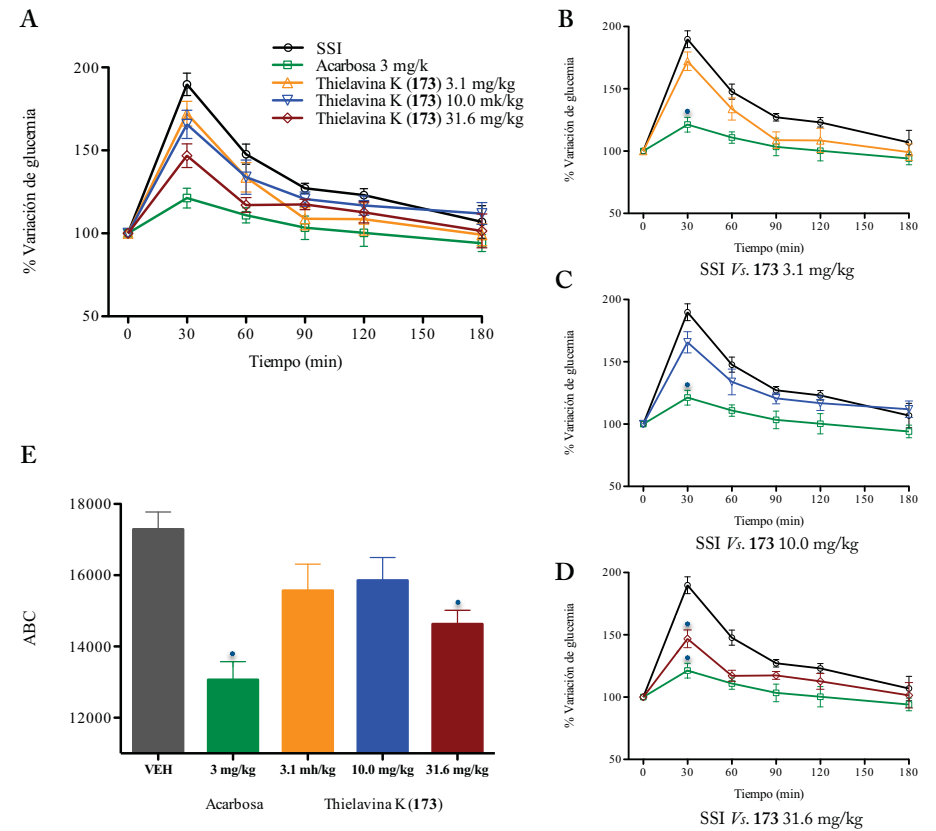
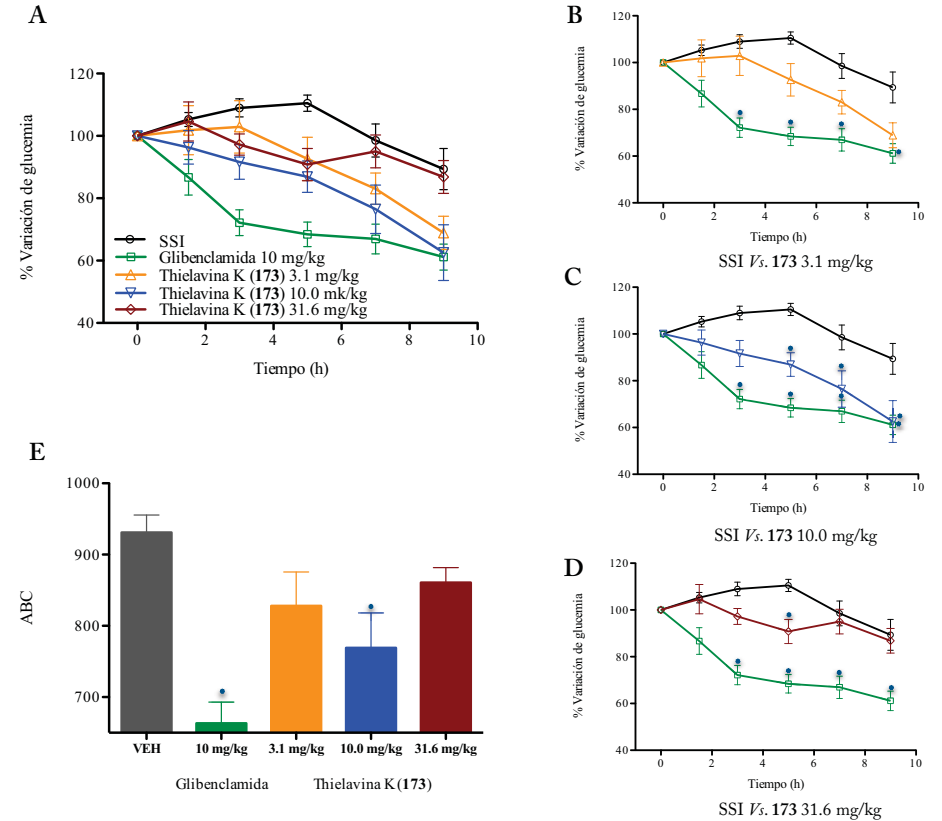
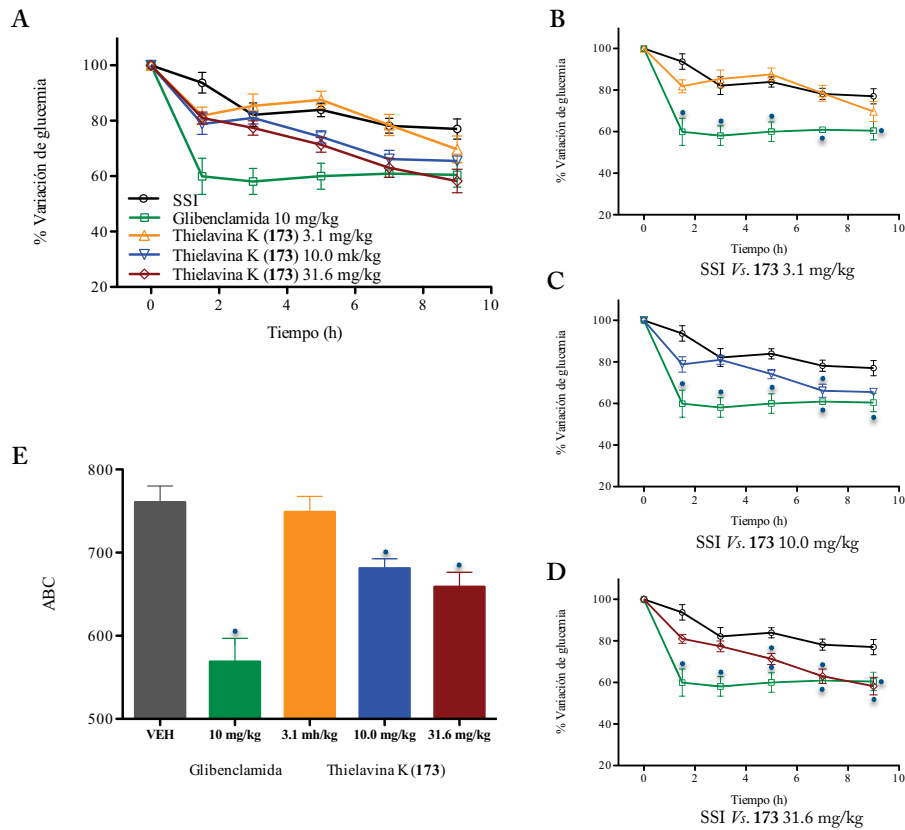


Figura 28. Efecto antihiper glucémico de la thielavina K (173) en ratones hiperglucémicos. (A) Gráfica general, (B) SSI *vs* thielavina K (173, 3.1 mg/kg), (C) SSI *vs* thielavina K (173, 10.0 mg/kg), (D) SSI *vs* thielavina K (173, 31.6 mg/kg). * $p \leq 0.05$ en comparación a la SSI. (E) Gráfico de área bajo la curva. Cada barra o punto representa el promedio \pm EE para los animales de cada grupo.



6.3 Estudio químico biodirigido de la especie fúngica *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae)

Un extracto orgánico obtenido de un cultivo sólido de la especie fúngica *Xylaria feejeensis* inhibió de manera importante (40 % a 250 ppm) la actividad enzimática de la α GHY. El fraccionamiento biodirigido de este extracto, utilizando diferentes técnicas cromatográficas condujo al aislamiento y la purificación de dos metabolitos secundarios descritos por primera vez en la literatura y caracterizados como el 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (**175**) y la 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (**176**). De manera adicional, se aislaron la 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (**177**), la 3*S*-(+)-8-metoximeleina (**178**), la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (**179**), la 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (**180**), y la 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (**181**) [Figura 31] (Devys et al., 1992; He et al., 2004; Tansuwan et al., 2007; 2010).

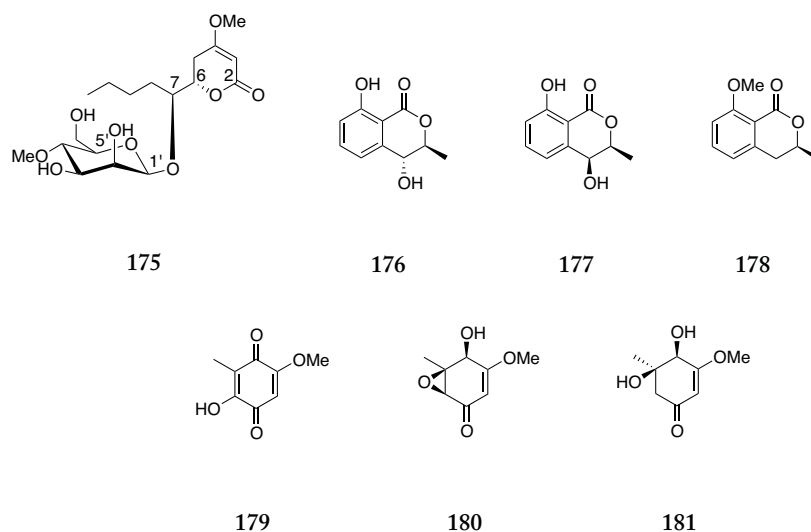


Figura 31. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae).

6.3.1 Caracterización de los metabolitos secundarios de *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae)

La caracterización de los productos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (RMN- ^1H y ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, ROESY e IR) [Figuras

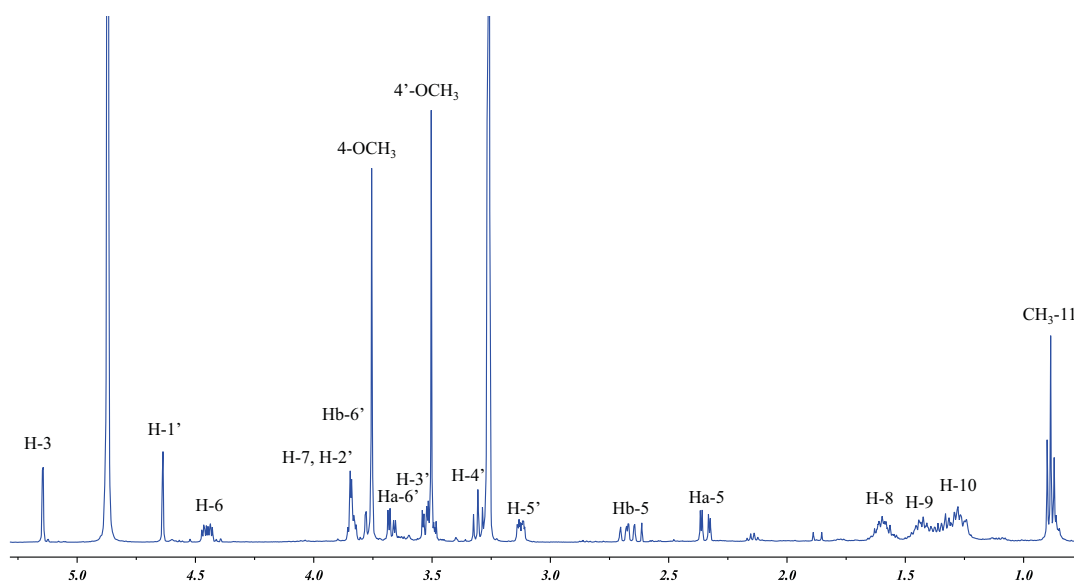
A20-A57], espectrométricos (EM-ESI) y cálculos teóricos. En el caso de los productos 177-181 la caracterización se realizó por comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos previamente descritos en la literatura (Devys et al., 1992; He et al., 2004; Tansuwan et al., 2007; 2010).

6.3.1.1 Elucidación estructural del producto 6S,7S-4'-O-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175)

El compuesto 175 se aisló como un sólido vítreo color café. La fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR-ESI) como $C_{18}H_{30}O_9$, con un índice de deficiencia de hidrógenos de cuatro. El espectro en el IR mostró bandas de absorción en 3399 y 1691 cm^{-1} , indicando la presencia de grupos hidroxilo y de una lactona insaturada. Los datos obtenidos a partir de los espectros de RMN (1H y ^{13}C ; Figuras 32A y 32B) [Cuadro 4] fueron similares a aquellos reportados para análogos de la pestalotina (170) (Kimura and Tamura, 1972; Akay et al., 2014), excepto por la presencia de un conjunto de señales atribuidas a una metil-hexosa (δ_H/δ_C 4.64/102.1 H-1'/C-1'; 3.84/72.9 H-2'/C-2'; 3.53/75.3 H-3'/C-3'; 3.31/78.0 H-4'/C-4'; 3.12/77.2 H-5'/C-5'; y 3.67, 3.78/62.5 H-6a', H6b'/C-6'). Este residuo de azúcar fue caracterizado como 4-O-metil- β -D-manopiranosilo con base en el patrón de acoplamiento observado para H-1' (*d*, $J= 1.0$ Hz), H-2' (*dd*, $J= 1.0, 3.5$ Hz) y H-3' (*dd*, $J= 3.3$ y 9.4 Hz). De manera adicional, el espectro ROESY (Figura 33) mostró una serie de correlaciones (H-1'/H-2', H-3' y H-5', y H-3'/ H-5', H-2', y grupo metilo en C-4') congruentes con la presencia de este azúcar. Por otra parte, el espectro de HMBC (Figura 34) mostró fuertes correlaciones entre el protón H-1' y C-7 (δ_C 80.5), confirmando así la unión entre C-1' y C-7 a través de un enlace O-glicosídico. Finalmente, la pérdida de 176 unidades de masa carga (m/z) a partir del ión cuasimolecular $[M+H]^+$ en el espectro de EM-AR-ESI confirmó la presencia del residuo de 4-O-metil- β -D-manopiranosilo.

Cuadro 4. Datos espectroscópicos del producto 175 en CH₃OH-*d*₄ (¹H 500 MHz, ¹³C 125 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)	HMBC	COSY	ROESY
2	170.0				
3	90.1	5.14 (<i>d</i> , 1.4)	2, 4, 5		
4	176.2				
5	30.0	a 2.35 (<i>dd</i> , 3.8, 17.1) b 2.67 (<i>ddd</i> , 1.0, 12.5, 16.7)	3, 4 4, 6, 7	6	
6	79.3	4.45 (<i>ddd</i> , 3.9, 5.4, 12.7)	7	5, 7	
7	80.5	3.84 <i>m</i>	5a, 1'	6	
8	31.5	1.58 <i>m</i>	7	7	
9	28.1	1.44 (<i>tdd</i> , 6.9, 14.8, 19.4)		8	
10	23.7	1.27 <i>m</i>		9	
11	14.3	0.89 (<i>t</i> , 7.3)	9, 10	10	
4-OMe	57.1	3.75 <i>s</i>	4,		
1'	102.1	4.64 (<i>d</i> , 1.0)	7, 2'		2', 3', 5'
2'	72.9	3.84 (<i>dd</i> , 1.0, 3.5)		3'	
3'	75.3	3.53 (<i>dd</i> , 3.3, 9.4)		2', 4'	
4'	78.0	3.31 (<i>t</i> , 9.5)		3', 5'	
5'	77.2	3.12 (<i>ddd</i> , 2.0, 4.3, 9.6)		4', 6'	
6'	62.5	a 3.67 (<i>dd</i> , 4.4, 11.7) b 3.78 (<i>dd</i> , 2.0, 11.9)			
4'-OMe	61.0	3.50 <i>s</i>			

Figura 32A. Espectros de ¹H-RMN del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175, 500 MHz, MeOH-*d*₄).

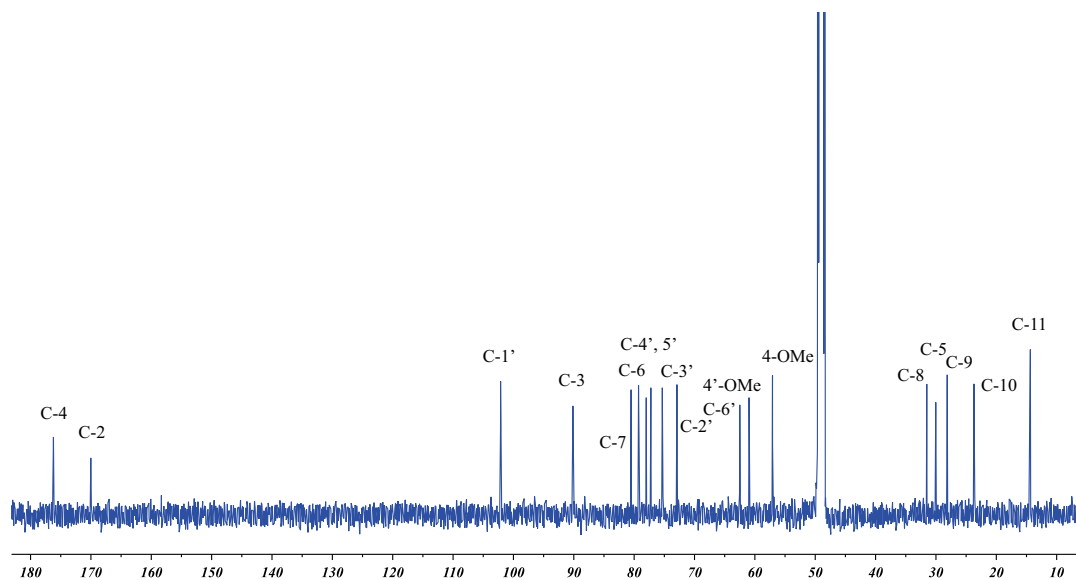


Figura 32B. Espectros de ^{13}C -RMN del 6 S ,7 S -4'- O -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175, 500 MHz, MeOH- d_4).

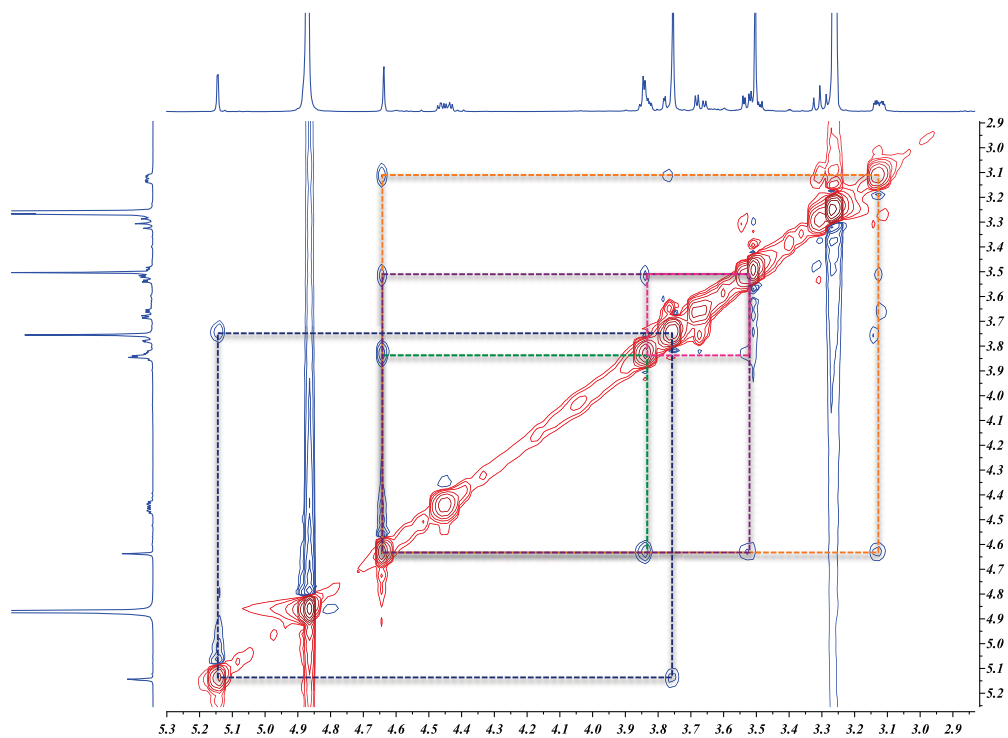


Figura 33. Espectro ROESY del 6 S ,7 S -4'- O -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175).

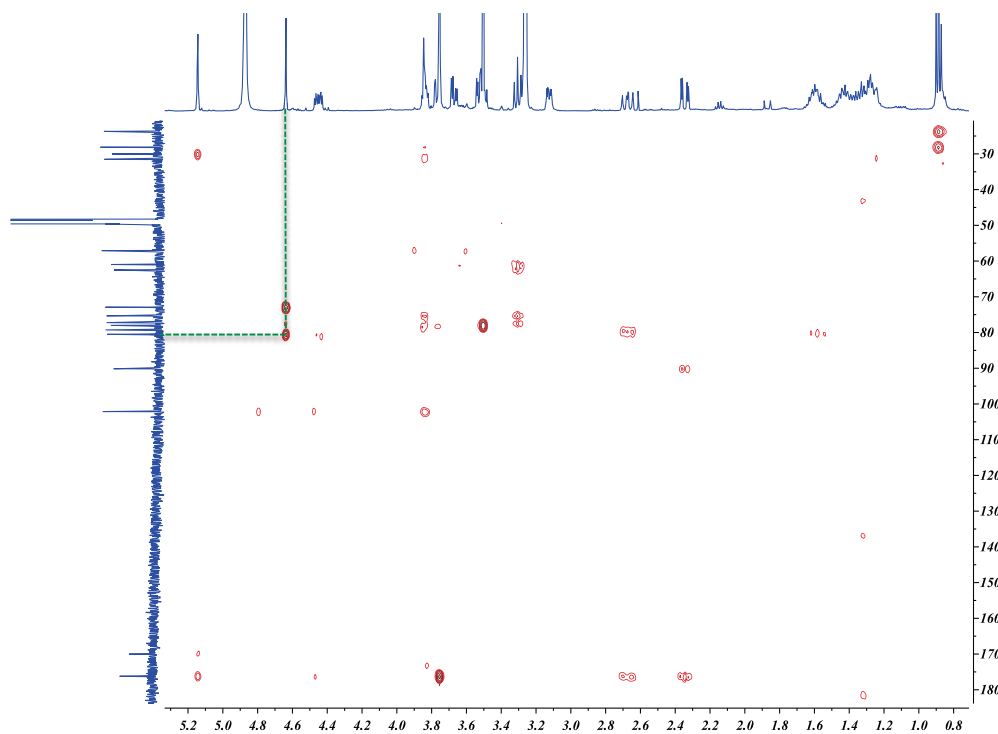


Figura 34. Espectro de HMBC del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (**175**).

El siguiente paso en la elucidación estructural del producto **175** fue determinar la configuración absoluta en el carbono C-6. Para ello se registró el espectro de dicroísmo circular (DC) del producto natural. El producto **175** posee un núcleo de lactona α,β -insaturada, cuyas propiedades quirópticas han sido ampliamente estudiadas por Snatzke y colaboradores (Snatzke, 1968). La regla de Snatzke se fundamenta en la presencia de un cromóforo inherentemente disimétrico ($C=C-C=O$) en la molécula, donde el signo del efecto Cotton debido a la transición $n-\pi^*$ (~ 255 nm) está inversamente relacionado con la quiralidad del sistema $C=C-C=O$, así, un ángulo dihedral (Ψ) positivo se atañe a un efecto Cotton negativo, y por el contrario un Ψ negativo con un efecto Cotton positivo (Snatzke, 1968). El compuesto **175** posee una estructura rígida y un cromóforo inherentemente disimétrico ya que el sistema $C=C-C=O$ no es plano. Su espectro de DC mostró dos efectos Cotton, uno positivo correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ a 208 nm ($\Delta\epsilon = +20.3$), y uno negativo asociado a la transición $n-\pi^*$ a 242 nm ($\Delta\epsilon = -21.2$), sugiriendo una configuración *S* en C-6.

En el presente estudio se decidió confirmar la configuración en este centro estereogénico, comparando el espectro de DC experimental de **175**, con aquellos calculados para los posibles distereoisómeros del producto (*6S,7S*, *6S,7R*, *6R,7S*, y *6R,7R*; **175a-175d**, respectivamente) [Figura 35]. Para ello se realizaron cálculos de modelado molecular utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo (TDDFT, por sus siglas en inglés). Inicialmente, se estableció una configuración relativa *pseudoecuatorial* para la cadena lateral, de acuerdo con los valores observados para las constantes de acoplamiento entre los protones H-5 y H-6 ($J_{5ax-6} = 12.6$ Hz y $J_{5cc-6} = 3.8$ Hz). Posteriormente, la estructura de cada diastereoisómero fue minimizada y sometida a una búsqueda conformacional utilizando un protocolo Monte Carlo; este procedimiento se llevó a cabo en el programa Spartan 02 utilizando un campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94. Todos los conformeros dentro de una ventana de 3.0 kcal/mol fueron seleccionados y reoptimizados utilizando DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP.

Una vez obtenidos los conformeros de mínima energía, se calculó el espectro de DC para cada uno de los distereoisómeros utilizando el mismo nivel de teoría (Mendoza-Espinoza et al., 2009; López-Vallejo et al., 2011). En los cuadros AI-7-AI-10 se muestran los valores de energía libre (ΔG), población (P) y los valores de fuerza de rotación expresados en R_{vel} para cada uno de los conformeros más relevantes de los diastereoisómeros del producto (**175**).

El análisis preliminar de los resultados indicó que el espectro de DC obtenido para el diastereoisómero **175a** presentó una excelente correlación con el espectro experimental, el cual mostró un efecto Cotton positivo y uno negativo en 230 y 260 nm, respectivamente (Figura 36). Los diastereoisómeros **175c** y **175d** (Figura 36) fueron descartados automáticamente ya que presentaron un efecto Cotton positivo asociado a la transición $n-\pi^*$ de la pirona y a una configuración *R* en C-6. Finalmente el diastereoisómero **175b**, se descartó ya que en el conformero de menor energía ($P = 0.71$) la cadena lateral se encontraba orientada de manera axial, y el efecto Cotton asociado a la transición $n-\pi^*$ también fue positivo, tal como lo señalara Snatzke en 1968 y Beecham y

colaboradores en 1972 (Snatzke, 1968, Beecham et al., 1972). De esta manera se confirmó la configuración absoluta *S* en el centro estereogénico C-6 del producto **175**, misma que corresponde a una quiralidad positiva, como se desprende del valor del Ψ (+166.7°) calculado para el cromóforo C=C-C=O en la estructura de mínima energía generada para **175a**.

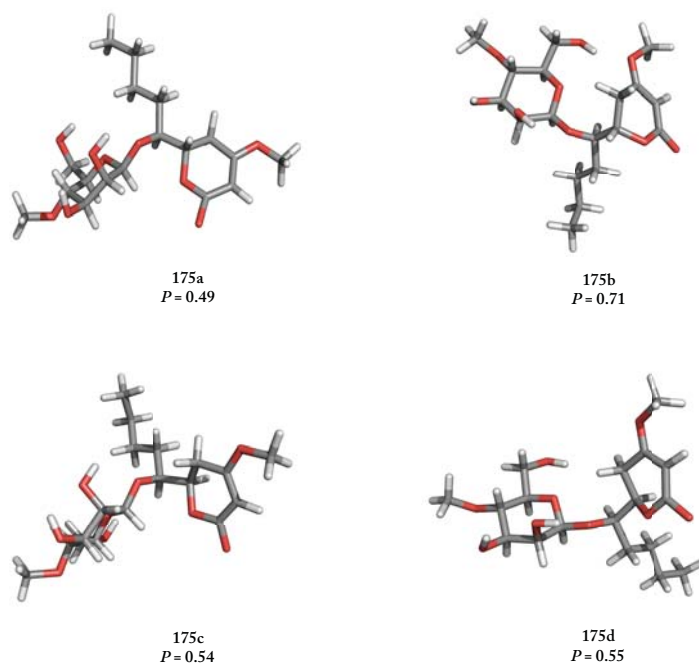


Figura 35. Estructuras de mínima energía de los cuatro posibles diastereoisómeros de **175**.

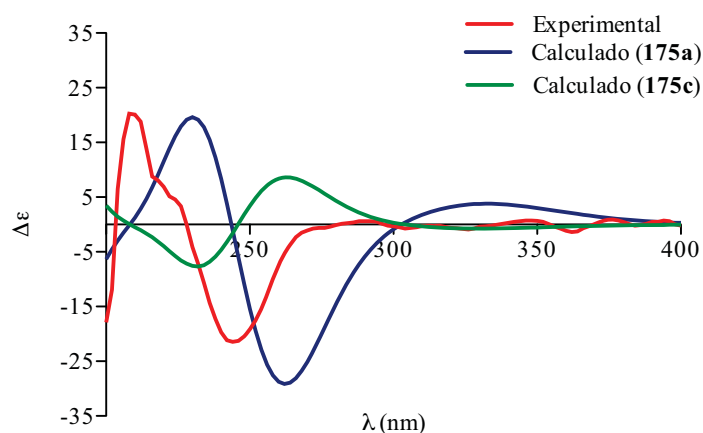


Figura 36: Comparación entre los espectros de DC calculados (línea azul, **175a**; línea verde **175c**) y experimental (línea roja) para el producto 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (**175**).

Para determinar la configuración absoluta en el carbono C-7, se compararon las constantes de acoplamiento calculadas ${}^3J_{6-7}$, ${}^3J_{5_{ec}-6}$ y ${}^3J_{5_{ax}-6}$ (obtenidas a partir de cálculos de modelado molecular usando DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP con las experimentales (obtenidas de los espectros de ${}^1\text{H}$ -RMN mediante experimentos de irradiación selectiva sobre las señales en δ_{H} 2.35 y 2.67 ppm, H-5_{ec} y H-5_{ax}, respectivamente) [Figuras AI-56 y AI-57]. El análisis se realizó sólo para los diastereoisómeros **175a** y **175b**, los cuales presentan una configuración *S* en el carbono C-6. Las constantes de acoplamiento ${}^3J_{6-7}$, ${}^3J_{5_{ec}-6}$ y ${}^3J_{5_{ax}-6}$ (Cuadro 5) calculadas para el diastereoisómero **175a** mostraron una excelente correlación con los valores experimentales; el error medio cuadrático (EMC) fue de 0.64. Para el diastereoisómero **175b** el valor de las constantes de acoplamiento calculadas difirió considerablemente del experimental (EMC = 5.03). Estos datos permiten proponer que la configuración en C-7 del producto natural es *S*. Así, el compuesto **175** fue caracterizado como 6*S*,7*S*-(-)-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (**175**). Si bien, en la conformación de menor energía del diastereoisómero **175a** (**175a**₁, $P = 0.49$) se observa una relación *anticlinal* entre los protones H-6 y H-7, lo cual indicaría un valor grande en la constante de acoplamiento (${}^3J_{6-7} = 8.1$), la presencia del conformero **175a**₂ ($P = 0.27$, ${}^3J_{6-7} = 4.2$), donde la relación es *sinclinal*, disminuyó considerablemente el valor promedio de la constante calculada (${}^3J_{6-7} = 6.5$).

Cabe mencionar que en el caso del diastereoisómero **175b**, se consideraron los conformeros **175b**₁ y **175b**₂ (Cuadro AI-12) para el cálculo de las constantes de acoplamiento y espectros de DC. Sin embargo, al repetir los cálculos tomando en cuenta sólo aquellos conformeros donde la cadena lateral en C-6 esta orientada *pseudoecuatorialmente*, los resultados no mostraron una desviación significativa con respecto a los reportados en este trabajo (Anexo II).

Cuadro 5. Constantes de acoplamiento (^1H - ^1H) experimentales y calculadas para el producto **175**.

$^3J_{\text{H-H}}$	Experimental	Constantes de acoplamiento calculadas ^a	
		175a	175b
J_{6-7}	5.5	6.5 ^b	7.0 ^b
$J_{5\text{eq}-6}$	3.8	3.5	5.9
$J_{5\text{ax}-6}$	12.6	13.0	4.3
EMC		0.64	5.03

Constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz. ^aLos valores de las constantes de acoplamiento fueron calculados con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Las constantes de acoplamiento fueron ponderadas utilizando la ecuación $\sum_i J^i \times P^i$, donde J^i , es el valor de la constantes de acoplamiento calculado para cada conformero y P^i es la población para el i ésimo conformero. ^bEl valor promedio de las constantes de acoplamiento fue escalado con el factor: $f_{\text{H(sp3)}-\text{H(sp3)}} = 0.910$ (López-Vallejo et al., 2011; Suárez-Ortiz et al., 2013).

6.3.1.2 Elucidación estructural del producto **3S,4R-(+)-4-hidroximeleina (176)**

El compuesto **176** se obtuvo como un polvo amarillo ópticamente activo ($[\alpha]_{\text{D}} = +32$). Los espectro de UV y RMN (**Figura 37**, **Cuadro 6**) fueron similares a aquellos reportados para la **3S,4S-(+)-4-hidroximeleina (177)** [Devys *et al.*, 1992]. Las diferencias claves entre los productos **176** y **177** fueron los valores de los desplazamientos químicos y los patrones de acoplamiento de los protones H-3 y H-4. Así, la señal de los metinos oxigenados en $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4.55 (d , $J = 2.10$ Hz, H-4)/67.6 (C-3) y 4.72 (qd , $J = 2.10$, 6.59 Hz, H-3)/79.9 (C-4) en **176** fueron reemplazados por un multiplete centrado en δ_{H} 4.56 (δ_{C} 69.5, C-3 y 81.6, C-4) en **177**. Entonces, los compuestos **176** y **177** difieren en la configuración de los centros estereogénicos en C-3 y/o C-4 (**Figura 37**).

Para determinar la configuración absoluta en los centros estereogénicos (C-3 y C-4) de los productos **176** y **177** se compararon sus espectros de DC con los previamente descritos para productos similares y con aquellos obtenidos por cálculos TDDFT para los diastereoisómeros **176**, **177**, **182** y **183** (**3S,4R**, **3S,4S**, **3R,4S** y **3R,4R**, respectivamente) [**Figura 38**]. Los cálculos teóricos se realizaron mediante el mismo protocolo utilizado para el producto **175**.

Cuadro 6. Datos espectroscópicos de la 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (176) en MeOH-*d*₄ (¹H 400 MHz, ¹³C 100 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)	HMBC	COSY
1	171.0			
3	79.9	4.72 (<i>qd</i> , 2.1, 6.6)		4
4	67.6	4.55 (<i>d</i> , 2.1)	4a, 5, 8a	3
4a	143.1			
5	119.8	6.96 (<i>d</i> , 8.4)	4,6	
6	137.7	7.56 (<i>dd</i> , 7.4, 8.5)	5, 7	
7	118.5	6.99 (<i>d</i> , 7.4)	6,8	
8	162.9			
8a	108.4			
3-CH ₃	16.4	1.52 (<i>d</i> , 6.6)	3, 4	

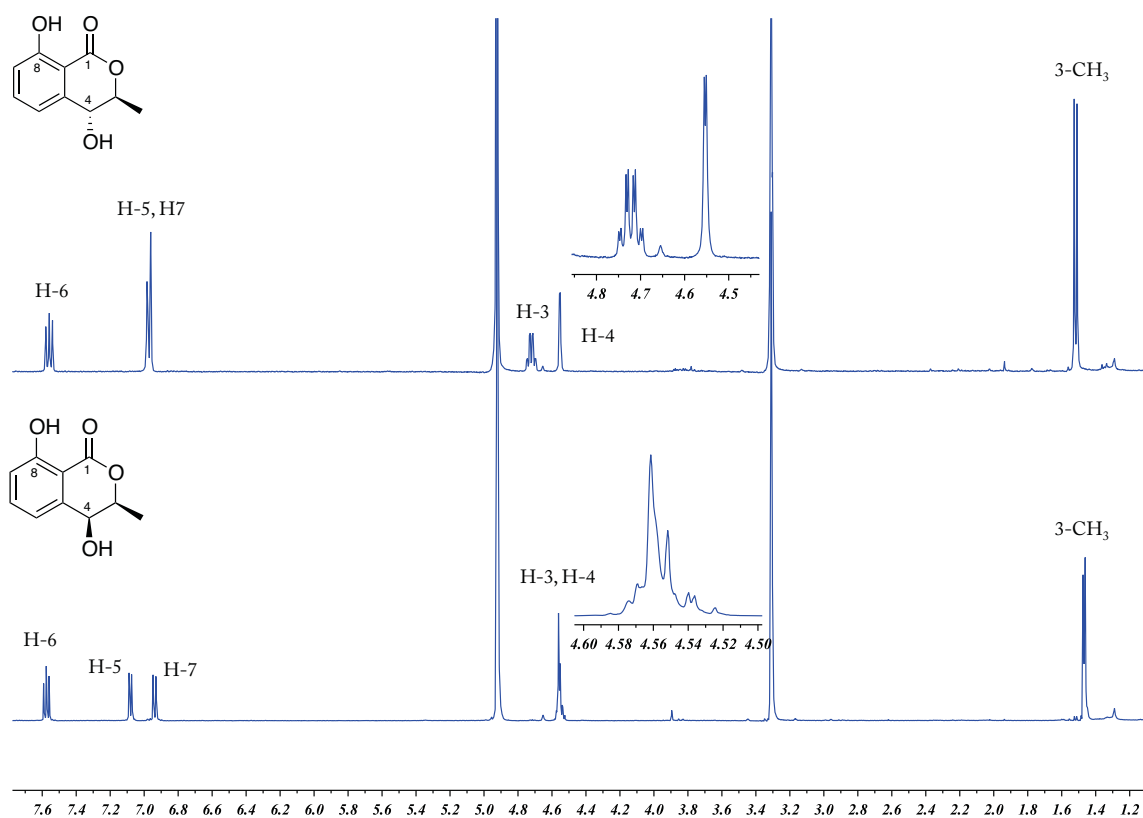


Figura 37. (A) Espectro de ¹H-RMN de la 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (176, 400 MHz, MeOH-*d*₄). (B) Espectro de ¹H-RMN de la 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (177, 500 MHz, MeOH-*d*₄).

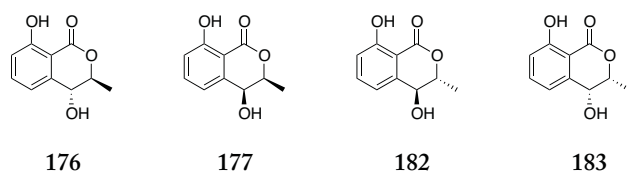
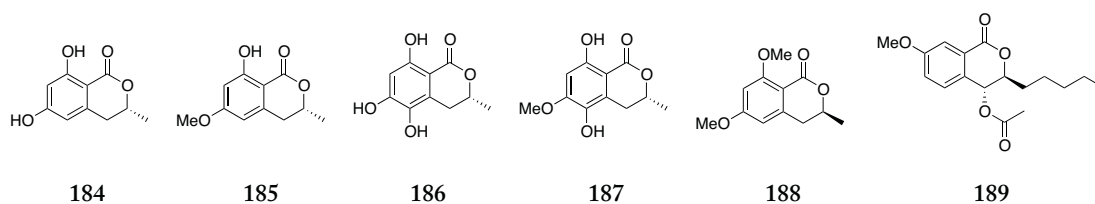


Figura 38. Estructura de los cuatro posibles diastereoisómeros del producto 176.

Las dihidroisocumarinas poseen un cromóforo de éster benzoico, cuyas propiedades quirópticas se encuentran ampliamente descritas; a lo largo de décadas el análisis de los espectros de DC de estos productos se han utilizado para establecer la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en el heterociclo, ello considerando que el patrón de sustitución del anillo aromático no modifica el signo del efecto Cotton de la transición $n \rightarrow \pi^*$ (260 nm) del sistema $C=C-C=O$ (Antus y Snatzke, 1983; Krohn et al., 1997). Básicamente, el análisis de los espectros se ha realizado de acuerdo a la regla de Snatzke para lactonas α,β -insaturadas. Posteriormente, Krohn aplicó la regla empírica de Snatzke para el análisis de ocho dihidroisocumarinas, incluyendo cinco 3-metil-isocoumarinas (184-188). Las cuatro primeras (184-187) presentaron un efecto Cotton negativo debido a la transición $n \rightarrow \pi^*$ (260 nm) y la configuración del centro fue asignada como *R*. En el producto 188 el efecto Cotton debido a la transición $n \rightarrow \pi^*$ presentó un signo positivo, por lo que la configuración en C-3 se asignó como *S*.



Al aplicar la regla de Krohn, la configuración absoluta en el carbono asimétrico C-3 de los productos 176 y 177 se asignó como *S* ya que el efecto Cotton correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ observado en los espectros de CD fue positivo (línea roja, 176; línea verde, 177, respectivamente) [Figura 39].

La configuración absoluta del carbono asimétrico C-4 en los productos 176 se estableció como *R*, considerando el signo del efecto Cotton correspondiente a la

transición π - π^* de las bandas K (200-255 nm), las cuales se ven afectadas por la quiralidad de la molécula en esta posición (Beecham 1972). Así, en el espectro de DC experimental de **176** el efecto Cotton de la banda K a 245 nm fue positivo como en el caso de la 3*R*,4*R*-6-methoxy-3,4-dihidro-3-*n*-pentil-4-acetoxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona (**189**) [Guimarães et al., 2008]. Entonces, la configuración en C-4 se estableció como 4*R*. Cabe mencionar que la banda positiva se traslapa con la correspondiente a la de la transición n - π^* en 260 nm (Figura 39, línea roja).

En el caso del producto **177**, el efecto Cotton atribuible a la banda K presento un signo contrario al de **176** y **189** (Figura 39, línea roja y verde; **176** y **177**, respectivamente). En consecuencia en este producto la configuración en el centro estereogénico C-4 se estableció como *S*.

La diferencia encontrada entre los efectos Cotton para las transiciones π - π^* , de los productos **176** y **177** pone de manifiesto la influencia que ejerce la orientación (axial o ecuatorial) del hidroxilo bencílico (C-4) sobre las transiciones de la banda K (Snatzke et al., 1972; Antus y Snatzke 1983; Beecham 1972).

Los espectros de DC calculados para ambos productos presentaron los mismos efectos Cotton para las transiciones consideradas (Figura 39).

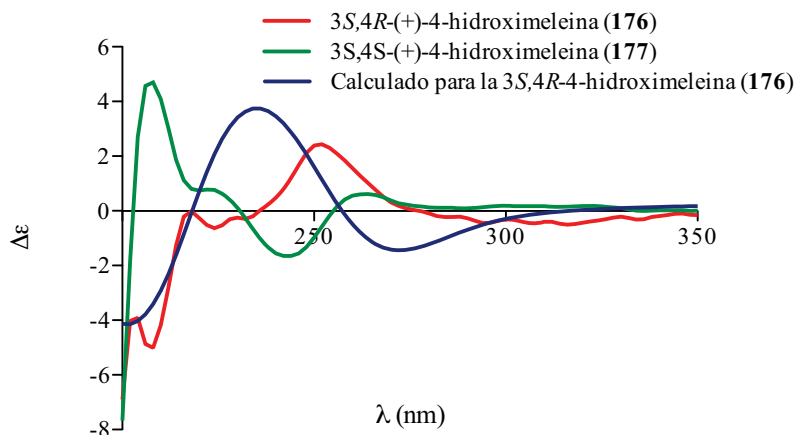


Figura 39. Comparación entre los espectros de DC calculados (línea azul) y experimental para la 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (**176**, línea roja) y la 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (**177**, línea verde).

6.3.2 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α GHY de los metabolitos aislados de *Xylaria feejeensis* (Xylariaceae)

La evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α GHY de los compuestos obtenidos de *X. feejeensis* se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección experimental (5.8). Los resultados de estos experimentos revelaron que sólo los productos 176 y 177 inhiben a la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración (Figura 40), con valores de CI_{50} de 441, y 549 μ M, respectivamente. El efecto de estos productos fue similar al de la acarbosa ($CI_{50} = 514 \mu$ M), empleada como control positivo. Por lo tanto, estas isocumarinas podrían ejercer una acción antihiper glucémica *in vivo*. Estos resultados también indican que la configuración absoluta en C-4 tiene un impacto leve en el efecto inhibitorio sobre la enzima α GHY.

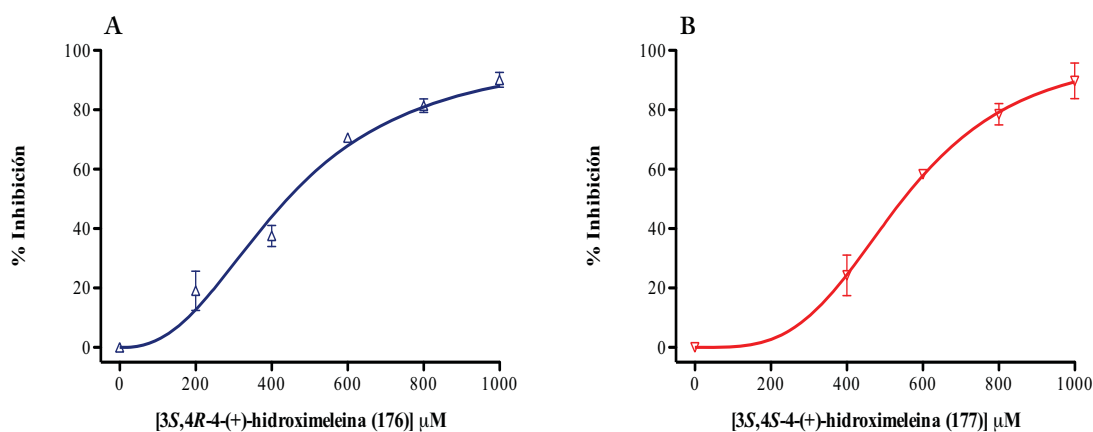


Figura 40. Curvas concentración-respuesta de la inhibición de enzima α GHY por los productos (A) 3S,4R-(+)-4-hidroximeleina (176) y (B) 3S,4S-(+)-4-hidroximeleina (177).

6.3.3 Estudios de acoplamiento molecular de los productos 176 y 177

Para evaluar el posible modo de unión *in silico* de los compuestos 176 y 177 con la enzima α GHY se realizaron estudios de AM; para ello se empleó el protocolo previamente descrito para las thielavinas. Los resultados de estos estudios predijeron que los productos 176 y 177 se unen a la enzima en un sitio distinto al dominio catalítico. El sitio de unión predicho para estos compuestos está constituido por los residuos Leu-561, Glu-562, Phe-

563, Gly-564, Tyr-566, Pro-567, Lys-568, y Val-571. En ambos casos las interacciones que estabilizan la formación de los complejos ligante-proteína incluyen las de tipo hidrofóbica, π -catión y enlaces de hidrógeno; estos últimos se establecen entre los residuos Pro-567 y el hidroxilo en C-4 de ambos productos, y entre la Lys-568 con el grupo hidroxilo en C-8 en **177**, y con el grupo carbonilo (C-1) en **176** (Figura 41).

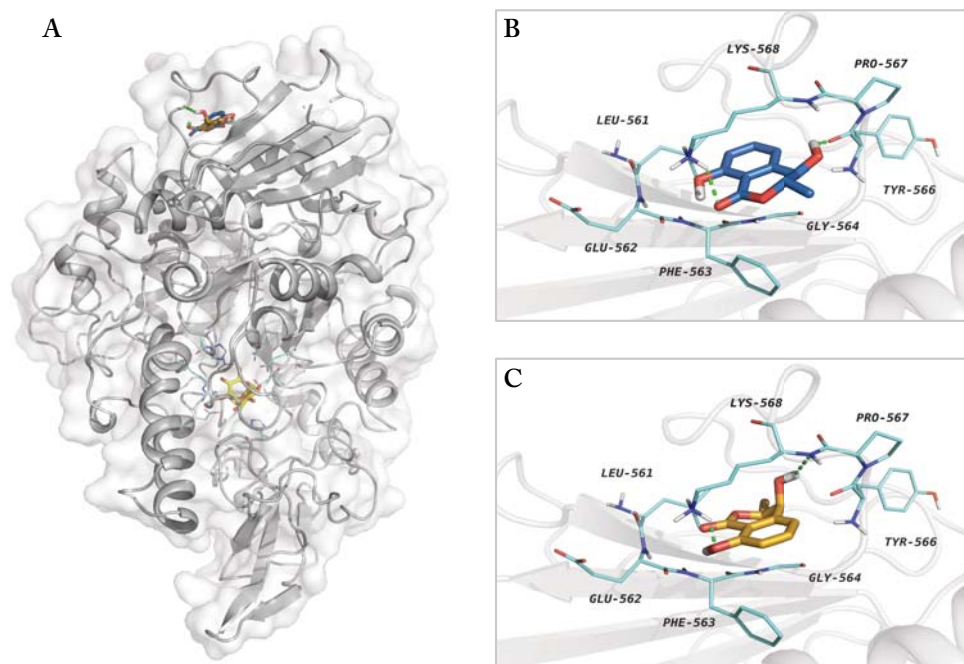


Figura 41. (A) Modelo estructural generado para los complejos isomaltosa (bastones amarillos)- α GHY, **176** (bastones azules)- α GHY y **177** (bastones naranjas)- α GHY. (B) Aminoácidos involucrados en la interacción de **176** (bastones azules) con la enzima α GHY (líneas azul claro). (C) Aminoácidos involucrados en la interacción de **177** (bastones naranjas) con la enzima α GHY (líneas azul claro). Gráficos generados con PyMol.

En resumen, la investigación de la especie fúngica *Xylaria feejeensis*, un hongo endófito del copalchi (*Hintonia latiflora*), condujo al aislamiento de dos nuevos metabolitos secundarios (**175** y **176**) y dos nuevos inhibidores de la enzima α GHY (**176** y **177**), con actividad similar a la de la acarbosa. De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los estudios de AM, los productos **176** y **177** podrían inhibir a la enzima α GHY de manera alostérica ya que no parecen interactuar en el sitio activo de la enzima. Los productos **176** y **177** representan un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de inhibidores alostéricos de las enzimas α -glucosidasas.

6.4 Estudio químico biodirigido de la especie fúngica *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae)

El extracto orgánico obtenido a partir del micelio y medio de cultivo del microorganismo *Chaetomium globosum* inhibió la actividad hidrolasa de la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración, con una CI_{50} de 18.10 μ g/mL (Figura 42). El fraccionamiento biodirigido del extracto permitió el aislamiento del producto mayoritario. Este compuesto fue caracterizado como la epipolítiodioxopiperazina (EPT) chaetomina (128) [Brewer et al., 1978]; este representa el primer de este producto en la especie

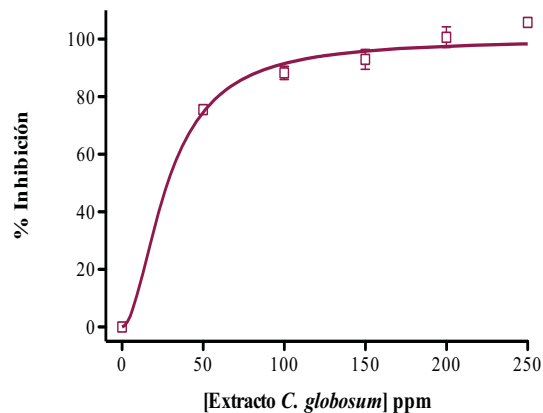
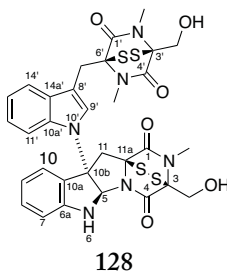


Figura 42. Curvas concentración-respuesta de la inhibición de la enzima α GHY por el extracto orgánico de *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae).



6.4.1 Elucidación estructural de la chaetomina (128)

La caracterización química de la chaetomina (128) se llevó a cabo a través del análisis exhaustivo de los espectros de RMN uni y bidimensionales, así como del análisis de su espectro de masas de alta resolución. El ión cuasi molecular del producto se observó en una relación m/z de 711.1187 $[M + H]^+$ en el espectro de alta resolución obtenido por la técnica de electroespray (ESI); la fórmula molecular se estableció como $C_{31}H_{30}N_6O_6S_4$, con un índice de deficiencia de hidrógenos de 18. Los espectros de RMN mostraron gran similitud con las EPTs diméricas obtenidas de especies relacionadas y del género *Verticillum* (Brewer et al., 1978; Li et al., 2006). En el espectro de RMN de ^{13}C se detectaron las señales características del dímero de indol y de las dos unidades de dicetopiperazina. En el espectro de 1H -NMR se observaron las señales correspondientes a ocho protones aromáticos, un protón de doble ligadura, un metino, dos metilenos base de oxígeno, dos metilenos con protones no equivalentes y tres metilos unidos a nitrógeno. Finalmente, el análisis de los espectros bidimensionales HMBC y COSY permitió establecer de manera inequívoca que la estructura del producto era idéntica a la de la chaetomina (Brewer et al., 1978; Li et al., 2006), un miembro importante de las EPTs. Este grupo de micotoxinas que se caracterizan por la presencia de al menos un puente disulfuro localizado en el anillo de dicetopiperazina, el cual se genera de la ciclización de un dipéptido. La toxicidad de las EPTs se debe justamente a la presencia de ese enlace disulfuro, mismo que se conjuga con las proteínas y que induce la generación de especies reactivas de oxígeno a través de reacciones de óxido-reducción (**Figura 43**) (Müllbacher et al., 1986; Gardiner, 2005).

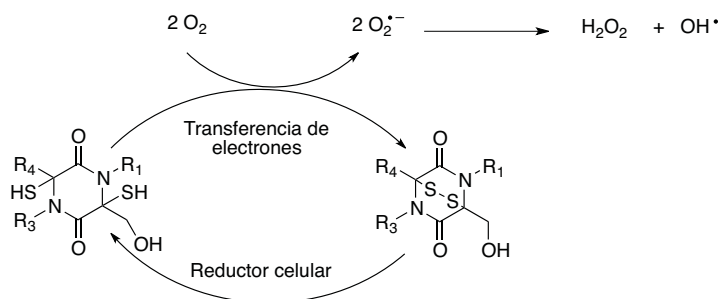


Figura 43. Ciclo redox entre la especie reducida (ditiol) y oxidada (puente disulfuro) de una EPT.

6.4.2 Evaluación del efecto inhibitorio de la chaetomina (128) sobre la actividad de la enzima α GHY

La evaluación de la chaetomina (128) sobre la actividad de la enzima α GHY reveló que este producto tiene un efecto inhibitorio de manera dependiente de la concentración; la CI_{50} fue de $14.30 \pm 0.08 \mu\text{M}$ (Figura 44).

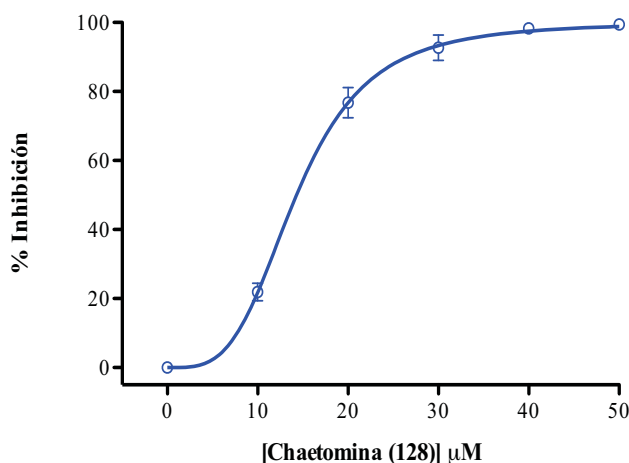


Figura 44. Curva concentración-respuesta de la inhibición de la enzima α GHY por la chaetomina (128).

6.4.3 Estudios de acoplamiento molecular de la chaetomina (128) con la enzima α GHY

El estudio de AM de la chaetomina (128) con la enzima α GHY mostró que este producto se une a la enzima en una zona cercana al dominio catalítico; el sitio está constituido por los siguientes aminoácidos: Lys-156, Val-232, Asp-233, Ser-240, Asp-242, Pro-243, His-280, Asp-307, Thr-310, Pro-312, Leu-313, Phe-314 y Arg-315. Los contactos hidrofóbicos y la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos Asp-307 y Arg-315 con el hidroxilo en C-3 son las interacciones más importantes en el complejo chaetomina (128)- α GHY (Figura 45).

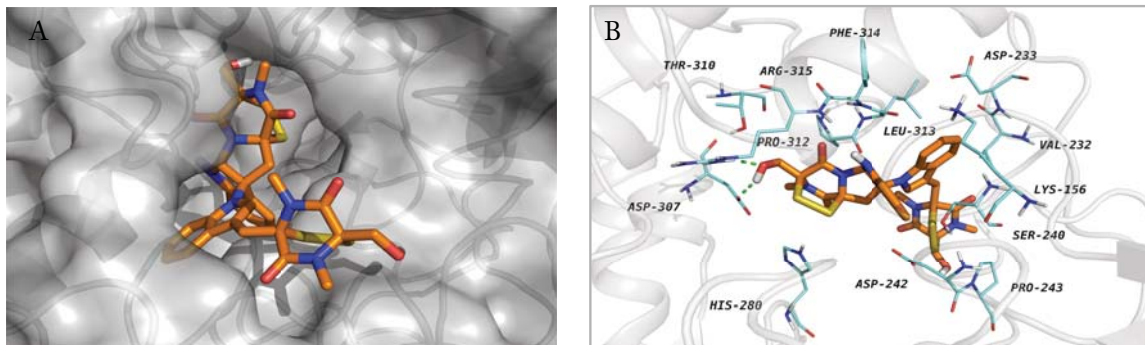


Figura 45. (A) Modelo estructural generado para el complejo chaetomina (128, bastones naranjas)- α GHY en la superficie de la proteína. (B) Aminoácidos involucrados en la interacción de la chaetomina (128, bastones naranjas) con la enzima α GHY (líneas azul claro). Gráficos generados con PyMol.

6.4.4 Evaluación de la interacción chaetomina (128)-calmodulina a través de ensayos de apagamiento de la fluorescencia

La evaluación de la interacción de la chaetomina (128) con la proteína calmodulina (CaM) se realizó tomando en consideración que las EPTs han recibido gran atención por su excelente actividad antitumoral (Li et al., 2006). La CaM [Figura 46] es quizás la proteína de unión a calcio (Ca^{2+}) más importante en organismos eucariotas. Esta proteína regula numerosas funciones fisiológicas y patofisiológicas a nivel celular. Así, la CaM controla procesos relacionados con la movilidad celular, funciones y arquitectura del citoesqueleto, proliferación celular, homeostasis, autofagia, fosforilación/desfosforilación de proteínas, funciones de canales iónicos, procesos reproductivos, contracción muscular y expresión de genes, por tan sólo mencionar algunos (González-Andrade, Rivera-Chávez, et al., 2013). La CaM controla todas estas funciones a través de la modulación de más de 100 proteínas diferentes, incluyendo enzimas tales como: la fosfodiesterasa 1 (PDE1), la óxido nítrico sintetasa (NOS), algunas cinasas, canales iónicos y fosfatasa, entre otras. Asimismo, la CaM se asocia con diversas condiciones patológicas, incluyendo el crecimiento anormal de células y mal funcionamiento del músculo liso (Berchtold y Villalobo, 2014). Por ejemplo, hallazgos recientes han mostrado que muchos tipos de cáncer están asociados a una elevada concentración de Ca^{2+} -CaM, y que muchos de sus ligantes inhiben la invasión de células tumorales *in vitro* y la metástasis *in vivo* (Berchtold

y Villalobo, 2014). En consecuencia, esta proteína representa un blanco importante para el desarrollo de fármacos, y aquellas moléculas que interfieren con su actividad moduladora, pueden ser consideradas antagonistas de la CaM, los cuales también son herramientas importantes en el estudio de los procesos en los cuales esta proteína está involucrada.

Para evaluar la interacción de la chaetomina (128) con la CaM se utilizó la técnica de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *b*CaM M124C-*AF*₃₅₀ (Madariaga-Mazón et al., 2014). Los biosensores son herramientas moleculares específicas, de bajo costo, selectivas que detectan de forma rápida los cambios conformacionales provocados por la unión de un ligante a la proteína, cambios que modifican el microambiente del fluoróforo y con ello, la intensidad de fluorescencia (González-Andrade, Rivera-Chávez et al., 2011).

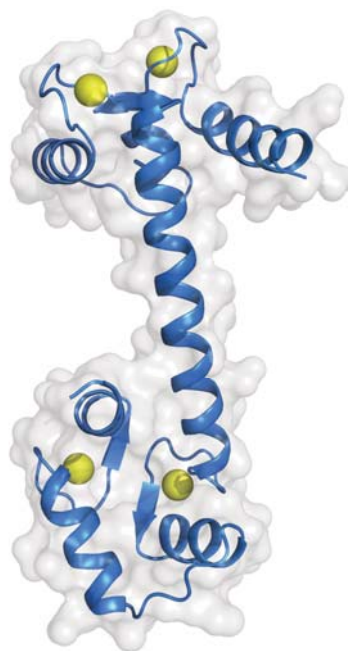
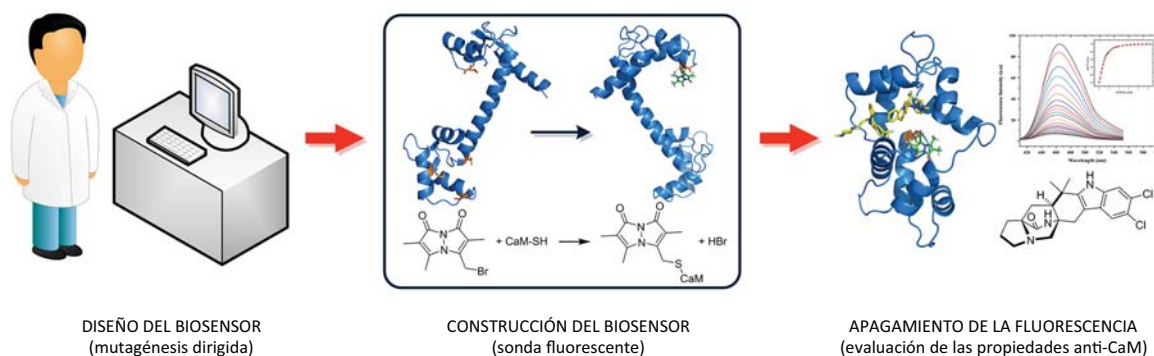


Figura 46. Estructura tridimensional de la calmodulina (CaM), obtenida del Proteín Data Bank; código PDB: 1CLL.

El biosensor *b*CaM M124C-*AF*₃₅₀ fue obtenido a través de un proceso de mutagénesis dirigida por medio del cual el aminoácido Met-124 de la CaM fue reemplazado por un residuo de cisteína (Cys), al que posteriormente se le unió de manera

covalente el fluoróforo Alexa-350 (AF_{350}), que es el componente transductor (Madariaga-Mazón et al., 2014). En el **Esquema 4** se ilustra el procedimiento general seguido para la construcción de biosensores.

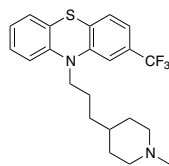
La titulación del biosensor con chaetomina (**128**) provocó un cambio importante en la fluorescencia, fenómeno atribuido a la formación del complejo Ca^{2+} -bCaM M124C- AF_{350} -chaetomina. En la **Figura 47** se muestran los resultados de las titulaciones del biosensor con la chaetomina (**128**) y el control positivo trifluoroperazina (TFP, **190**). La constante de afinidad (k_d) calculada para **128** fue de 57 nM, 11 veces menor que la de la trifluoroperazina (TFP, $k_d = 627$ nM).



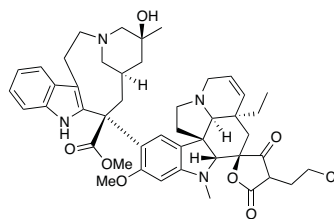
Esquema 4. Diseño racional de biosensores de CaM.

6.4.5 Estudios teóricos de acoplamiento molecular de la chaetomina (**128**) con la calmodulina

Los estudios de AM entre la chaetomina (**128**) y la CaM se realizaron utilizando la CaM cocrystalizada con el producto KAR-2 (Código PDB: 1AX5) como modelo. Los resultados del análisis indicaron que este compuesto se une a la CaM de manera no clásica, en un sitio similar al del producto KAR-2 (**191**), un antitumoral derivado de la vinblastina (**Figura 48**).



190



191

En resumen, el estudio químico de la especie fúngica *Chaetomium globosum* condujo al aislamiento de la chaetomina (**128**), un alcaloide inhibidor de la α GHY y de la CaM. El efecto inhibitorio contra la α GHY fue 37 veces mayor que la del control positivo acarbosa. Asimismo, el producto fue 11 veces más afín a la CaM que la TFP; la magnitud de su k_d se encuentra en el rango nM, lo cual es poco usual ya que la mayoría de los antagonistas de la CaM poseen valores de k_d en el orden μ M. Así, los alcaloides vinblastina y KAR-2 tienen valores de k_d de 3.0 y 5.2 μ M, respectivamente, y sólo los péptidos M13 (100 nM), el compuesto AAA (18 nM) y los análogos de tajixantona han mostrado valores de k_d en el orden nM (Orosz, Kovács, et al., 1997; Orosz, Vértessy, et al., 1997; Harmat et al., 2000; Horvath, 2004; González-Andrade, Rivera-Chávez, et al., 2013).

La gran afinidad de la chaetomina (**128**) por la CaM podría estar relacionada con la actividad antitumoral potencial del alcaloide ya que Kung y colaboradores (Kung et al., 2004), demostraron que **128** inhibe la activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1, por sus siglas en inglés) atenuando su transcripción. Este factor desempeña un papel central en la progresión de tumores, invasión y metástasis. Asimismo, en otro estudio reciente se comprobó que la activación del HIF-1 es dependiente de Ca^{2+} -CaM (Mottet et al., 2002), y que los antagonistas de CaM como el W-7 y calmidazolium inhiben la activación de HIF-1, conduciendo a la muerte celular. Con estos resultados se demuestra que los inhibidores de CaM pueden interferir con los procesos tumorales a través de la inactivación de HIF-1.

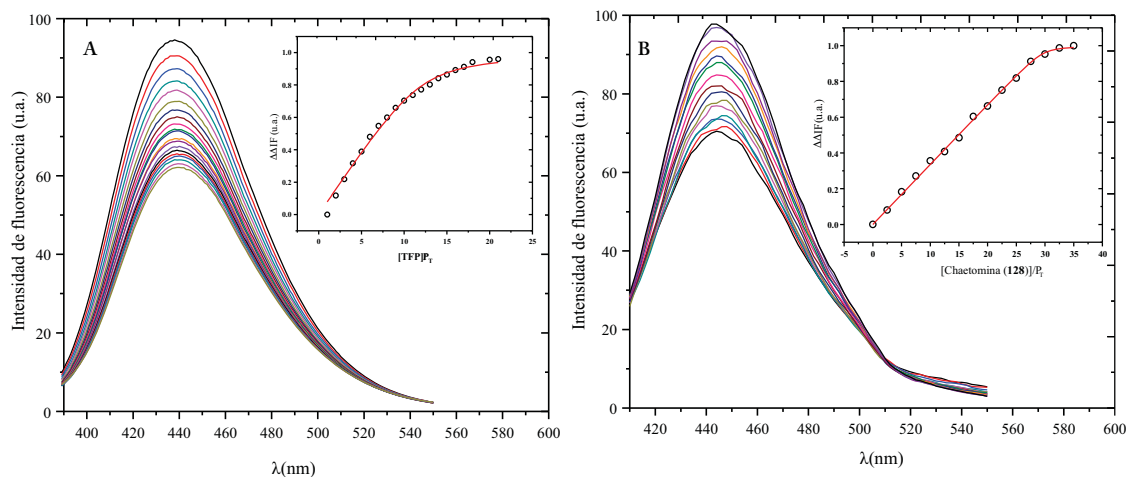


Figura 47. Espectros de fluorescencia y curvas de titulación del biosensor *bCaM M124C-AF₃₅₀* con (A) TFP y (B) chaetomina (128).

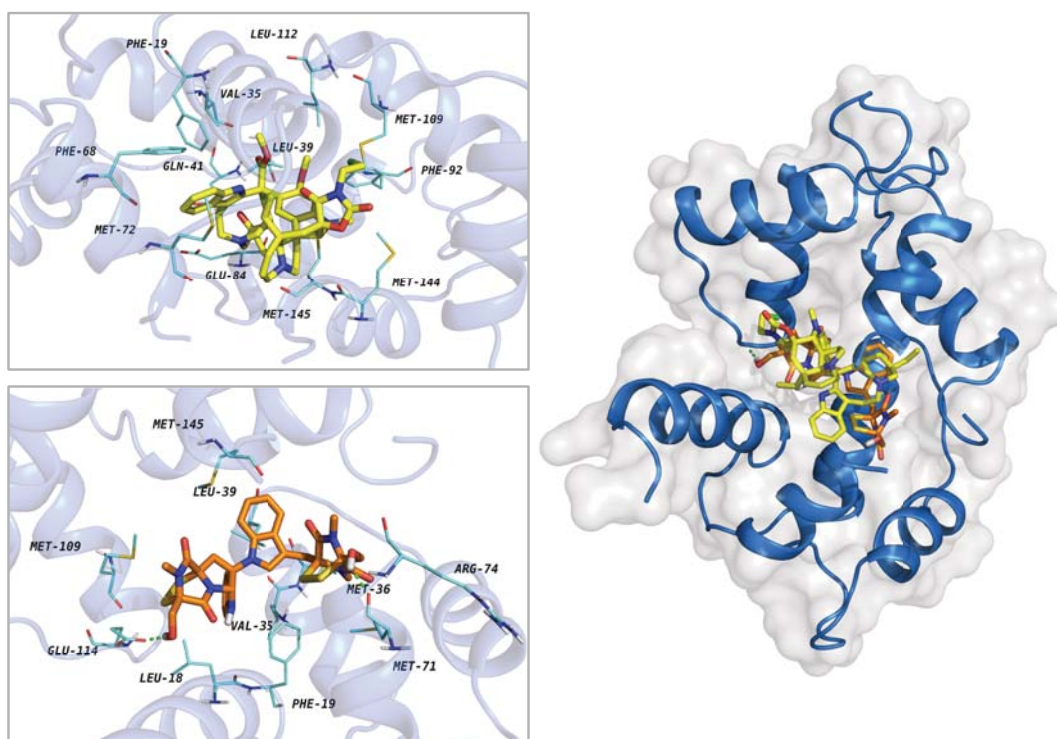


Figura 48. La figura a la derecha muestra los sitios de unión del producto KAR-2 (bastones amarillos) y chaetomina (128, bastones naranjas) con la CaM. La figura superior a la izquierda muestra el sitio de unión modelado para el producto KAR-2. La figura inferior izquierda muestra el sitio de unión modelado para la chaetomina (128). Las líneas azul claro representan los aminoácidos involucrados en la interacción de cada uno de los productos con la CaM. Gráficos generados con PyMol.

7. Conclusiones

- i. El estudio químico la especie MEXU 27095 condujo al aislamiento de la fimetarona (**174**), un producto con el esqueleto novedoso espiro[croman-3,7'-isocromen]-4,6'-(8'*H*)-diona. Este es el primer reporte de este metabolito en una especie de la familia Chaetomiaceae. De manera adicional, se obtuvieron tres tridépsidos, las thielavinas A (**171**), J (**172**) y K (**173**), que se comportan como inhibidores no competitivos de la enzima α -glucosidasa de levadura (α *GHY*) y fueron más activos que el fármaco de uso comercial, la acarbosa. La thielavina J (**172**) inhibió también de manera no competitiva la enzima α -glucosidasa de *Bacillus stearothermophilus* (α *GHBs*). Los estudios de AM permitieron establecer que los tridépsidos interactúan con las dos α -glucosidasas en un sitio cercano al dominio catalítico, adoptando una conformación similar a la de la acarbosa. Los estudios *in vivo* con el producto **173** empleando una prueba de tolerancia a la sacarosa, comprobaron su efecto inhibitorio sobre las α -glucosidasas. Los resultados globales permitieron descubrir a los tridépsidos como un nuevo tipo de inhibidores naturales de las α -glucosidasas, tanto de microorganismos como de animales.
- ii. El estudio químico de la especie *Xylaria feejeensis* (MEXU 27555), permitió el aislamiento de dos nuevos metabolitos secundarios caracterizados como 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (**175**) y 3*S*,4*R*-(+)-4-hidroximeleina (**176**). También se aislaron y caracterizaron la 3*S*,4*S*-(+)-4-hidroximeleina (**177**), la 3*S*-(+)-8-metoximeleina (**178**), la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (**179**), la 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (**180**), y la 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (**181**). La configuración absoluta de los centros C-6 y C-7 en el producto **175**, y la de C-3 y C-4 en **176** se determinó inequívocamente mediante métodos espectroscópicos convencionales y computacionales. Los productos **176** y **177**, inhibieron la enzima α *GHY* de manera comparable a la acarbosa. Los estudios de AM sugieren que estos

productos se unen a la enzima en un sitio diferente al dominio catalítico, implicando un tipo de inhibición alostérica.

- iii. La investigación química del microorganismo *Chaetomium globosum* condujo al aislamiento de la chaetomina (128). Cabe destacar que este es el primer reporte de este metabolito en la especie. La chaetomina (128) inhibió la actividad de la enzima α GHY de manera dependiente de la concentración y de acuerdo a los estudios teóricos se podría unir a la enzima en el sitio catalítico. El alcaloide 128 también presenta una alta afinidad por la calmodulina. De acuerdo con el estudio de “docking” el dominio de unión del alcaloide es similar al del KAR-2, un potente agente antimetabólico derivado de la vinblastina. Este hallazgo bien podría estar relacionado con las propiedades citotóxicas previamente demostradas para 128.
- iv. Los resultados obtenidos en la presente investigación constituyen una aportación original al conocimiento químico de las especies MEXU 27095, *Xylaria feejeensis* y *Chaetomium globosum* y, en general, de los organismos fúngicos de México. Además, estos confirman que los microorganismos endófitos obtenidos a partir de plantas medicinales representan un excelente punto de partida para la obtención de metabolitos bioactivos útiles para el desarrollo de nuevos fármacos, en este caso de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y antagonistas de la CaM.

8. Bibliografía

- Acuña, U.M., Figueroa, M., Kavalier, A., Jancovski, N., Basile, M.J., Kennelly, E.J., 2010. Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*. J. Nat. Prod. 73, 1775–1779.
- Aguirre, F., Brown, A., Cho, N.H., Dahlquist, G., Dodd, S., 2013. IDF Diabetes Atlas.
- Ainsworth, G.C., 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CABI.
- Akay, Ş., Ekiz, G., Kocabaş, F., Hameş-Kocabaş, E.E., Korkmaz, K.S., Bedir, E., 2014. A new 5,6-dihydro-2-pyrone derivative from *Phomopsis amygdali*, an endophytic fungus isolated from hazelnut (*Corylus avellana*). Phytochemistry Letters 7, 93–96.
- Anaya-Eugenio, G.D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J., Mata, R., 2014. Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. Journal of Ethnopharmacology 155, 416–425.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology 99, 325–348.
- Antus, S., Snatzke, G., Steinke, I., 1983. Circular dichroismus, LXXXI. Synthese und Circular dichroismus von Steroiden mit Isochromanon-Chromophor. Liebigs Ann. Chem. 1983, 2247–2261.
- Antus, S., Baitz-Gács, E., Snatzke, G., Tóth, T.S., 1991. Synthesis and circular dichroism of steroids with a 1,4-benzodioxane chromophore: On the absolute configuration of (–)-silandrin. Liebigs Ann. Chem. 1991, 633–641.
- Bayman, P., Angulo-Sandoval, P., 1998. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. Mycological Research 102, 944–948.
- Beecham, A.F., 1968. Circular dichroism in lactones. Tetrahedron Letters 9, 2355–2360.
- Beecham, A.F., 1972. The CD of $\alpha\beta$ -unsaturated lactones. Tetrahedron. 28, 5543–5554.
- Benalla, W., Bellahcen, S., Bnouham, M., 2010. Antidiabetic medicinal plants as a source of α -glucosidase inhibitors. Curr. Diabetes. Rev. 6, 247–254.
- Berchtold, M.W., Villalobo, A., 2014. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. Biochim. Biophys. Acta 1843, 398–435.
- Bilous, R., Donnelly, R., 2010. Handbook of Diabetes, 4th ed. Wiley-Blackwell.
- Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., Carvalho, I., 2006. α and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedron 62, 10277–10302.
- Brady, S.F., Wagenaar, M.M., Singh, M.P., Janso, J.E., Clardy, J., 2000. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. Org. Lett. 2, 4043–4046.
- Brewer, D., McInnes, A.G., Smith, D.G., Taylor, A., 1978. Sporidesmins. Part 16. The structure of chetomin, a toxic metabolite of *Chaetomium cochliodes*, by nitrogen-15 and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1248–1251.
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., Mata, R., 2011. (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. J. Nat. Prod. 74, 314–320.
- Butler, M.S., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., 2014. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. Nat. Prod. Rep. 31, 1612–1661.
- Cavasotto, C.N., Phatak, S.S., 2009. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. Drug Discovery Today 14, 676–683.
- Cheng, A., 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. Canadian

- Medical Association Journal 172, 213–226.
- Cheng, T., Li, Q., Zhou, Z., Wang, Y., Bryant, S.H., 2012. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *AAPS J* 14, 133–141.
 - Christiansen, E. H., Jensen, L. O., Thayssen, P., Tilsted, H.-H., Krusell, L. R., Hansen, K. N., Kalsoft, A., (2013). Biolimus-eluting biodegradable polymer-coated stent versus durable polymer-coated sirolimus-eluting stent in unselected patients receiving percutaneous coronary intervention (SORT OUT V): a randomised non-inferiority trial. *The Lancet*. 381 (9867), 661–669.
 - Copeland, R.A., 2000. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, 2nd ed. Wiley-VCH.
 - Çifci, G., Aviyente, V., Akten, E.D., 2012. Molecular docking study based on pharmacophore modeling for novel phosphodiesterase IV inhibitors. *Mol. Inf.* 31, 459–471.
 - Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859.
 - De Lano, W., Scientific, L.D., 2002. De Lano: PyMOL version 0.99. DeLano Scientific.
 - Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The J. of Antibiot.*, 62(1), 5–16.
 - Devys, M., Barbier, M., Bousquet, J.F., Kollmann, A., 1992. Isolation of the New (-)-(3*R*,4*S*)-4-Hydroxymellein from the fungus *Septoria nodorum* Berk. *Z Naturforsch.* 779–781.
 - Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R., 2012. α -glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *J. Nat. Prod.* 75, 968–974.
 - Eyberger, A.L., Dondapati, R., Porter, J.R., 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* 69, 1121–1124.
 - Farnet, C.M., Zazopoulos, E., 2005. Improving drug discovery from microorganisms. *Natural Products*. 95–106.
 - Fernandez, J., Hilliard, J.J., Abbanat, D., Zhang, W., Melton, J. L., Santoro, C.M., Flamm, R.K., (2010). In vivo activity of ceftobiprole in murine skin infections due to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54, 116–125.
 - Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*. 10, 226–236.
 - Fu, J., Zhou, Y., Li, H.F., Ye, Y.H., 2011. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. *African Journal of Microbiology Research* 5, 1231–1236.
 - Gallo, M.B., Guimarães, D.O., Momesso, L.D.S., Pupo, M.T., 2008. Natural products from endophytic fungi. *Microbial biotechnology*. New India Publishing Agency, New Delhi 139–168.
 - Gardiner, D.M., 2005. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* 151, 1021–1032.
 - Ge, H.-L., Zhang, D.-W., Li, L., Xie, D., Zou, J.-H., Si, Y.-K., Dai, J., 2011. Two new terpenoids from endophytic fungus *Periconia* sp. F-31. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 59, 1541–1544.
 - González-Andrade, M., Del Valle, P., Macías-Rubalcava, M.L., Sosa-Peinado, A., del Carmen González, M., Mata, R., 2013. Calmodulin inhibitors from *aspergillus*

- stromatoides. *Chem. Biodivers.* 10, 328–337.
- González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A., 2009. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry* 387, 64–70.
 - González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Sosa-Peinado, A., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., 2013. Development of the Fluorescent biosensor *h*Calmodulin (hCaM)L39C-monobromobimane(*mBBR*)/V91C-*mBBR*, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium. *J. Med. Chem.* 54, 3875–3884.
 - Gu, W., Ge, H.M., Song, Y.C., Ding, H., Zhu, H.L., Zhao, X.A., Tan, R.X., 2007. Cytotoxic benzo[*j*]fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an endophyte of *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 70, 114–117.
 - Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J.E., 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice* 103, 137–149.
 - Guimarães, K.G., de Souza Filho, J.D., Mares-Guia, Dos, T.R., Braga, F.C., 2008. Dihydroisocoumarin from *Xyris pterygoblephara* active against dermatophyte fungi. *Phytochemistry* 69, 439–444.
 - Gunatilaka, A., 2006. natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* 69, 509–526.
 - Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., Oku, T., 2009. Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Curr. Top Med. Chem* 9, 3–12.
 - Hakamata, W., Muroi, M., Kadokura, K., Nishio, T., Oku, T., Kimura, A., Chiba, S., Takatsuki, A., 2005. Aglycon specificity profiling of α -glucosidases using synthetic probes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 1489–1492.
 - Hanefeld, M., Cagatay, M., Petrowitsch, T., Neuser, D., Petzinna, D., Rupp, M., 2004. Acarbose reduces the risk for myocardial infarction in type 2 diabetic patients: meta-analysis of seven long-term studies. *Eur. Heart. J.* 25, 10–16.
 - Harmat, V., Böcskei, Z., Náráy-Szabó, G., Bata, I., Csutor, A.S., Hermeicz, I., Arányi, P., Szabó, B., Liliom, K., Vértessy, B.G., Ovádi, J., 2000. A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *J. Mol. Biol.* 297, 747–755.
 - He, J., Wijeratne, E., Bashyal, B.P., Zhan, J., Seliga, C., Liu, M.X., Pierson, E.E., Pierson, L.S., VanEtten, H., Gunatilaka, A., 2004. Cytotoxic and other metabolites of *Aspergillus* inhabiting the rhizosphere of sonoran desert plants. *J. Nat. Prod.* 67, 1985–1991.
 - Hensens, O.D., Ondeyka, J.G., Dombrowski, A.W., Ostlind, D.A., Zink, D.L., 1999. Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from a *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Letters* 40, 5455–5458.
 - Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J.P., Reynoso-Noverón, N., 2013. Salud pública de México diabetes mellitus in Mexico: El estatus de la epidemia. *Salud Pública* 55, S129–S136.
 - Horvath, I., 2004. The Structure of the Complex of Calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 8266–8274.
 - Huey, R., Morris, G.M., Olson, A.J., Goodsell, D.S., 2007. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* 28, 1145–1152.

- Irons, B.K., Minze, M.G., 2014. Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 7, 15–24.
- Israili, Z.H., 2011. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* 18, 117–152.
- Ito, T., Otake, T., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, M., 2011. High-throughput profiling of microbial extracts. *J. Nat. Prod.* 74, 983–988.
- Joseph, B., Priya, R.M., 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. *Am. J. Biochem. Mol. Biol.* 1, 291–309.
- Kahan, J.S., Kahan, F.M., Goegelman, R., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., (1979). Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The J. of Antib.* 32, 1–12.
- Kato, K., Shirasaka, Y., Kuraoka, E., Kikuchi, A., Iguchi, M., Suzuki, H., Shibasaki, S., (2010). Intestinal absorption mechanism of tebipenem pivoxil, a novel oral carbapenem: involvement of human OATP family in apical membrane transport. *Molecular Pharmaceutics*, 7, 1747–1756.
- Kaul, S., Ahmed, M., Zargar, K., Sharma, P., Dhar, M.K., 2013. Prospecting endophytic fungal assemblage of *Digitalis lanata* Ehrh.(foxtail) as a novel source of digoxin: a cardiac glycoside. *Biotech.* 3, 335–340.
- Keller, M., Snatzke, G., 1973. Circular dichroism—LXIII. *Tetrahedron* 29, 4013–4016.
- Kimmel, B., Inzucchi, S.E., 2005. Oral agents for type 2 diabetes: an update. *Clinical Diabetes* 23, 64–76.
- Kimura, Y., Tamura, S., 1972. Isolation and structure of pestalotin, a gibberellin synergist from *Pestalotia cryptomeriaeicola*. *Agricultural and Biological Chemistry.* 36. 1925–1930.
- Kitahara, N.N., Endo, A.A., Furuya, K.K., Takahashi, S.S., 1981. Thielavin A and B, new inhibitors of prostaglandin biosynthesis produced by *Thielavia terricola*. *J. Antibiot.*, 34, 1562–1568.
- Krohn, K., Bahramsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., 1997. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry* 45, 313–320.
- Kumar, A., Patil, D., Rajamohanam, P.R., Ahmad, A., 2013. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *PLoS ONE* 8, e71805–e71805.
- Kung, A.L., Zabudoff, S.D., France, D.S., Freedman, S.J., Tanner, E.A., Vieira, A., Cornell-Kennon, S., Lee, J., Wang, B., Wang, J., Memmert, K., Naegeli, H.-U., Petersen, F., Eck, M.J., Bair, K.W., Wood, A.W., Livingston, D.M., 2004. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 6, 33–43.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Spiteller, M., 2009. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1019–1030.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod.* 71, 159–162.
- Kusari, S., Verma, V.C., Lamshoeft, M., Spiteller, M., 2012. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1287–1294.
- Kusari, S., Zühlke, S., Spiteller, M., 2009. An endophytic fungus from *Camptotheca*

- acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* 72, 2–7.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
 - Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., Thornton, J.M., 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* 8, 477–486.
 - Lee, J.C., Strobel, G.A., Lobkovsky, E., 1996. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *The Journal of Organic Chemistry* 61, 3232–3233.
 - Lguariguata, 2012. IDF Diabetes Atlas 5th Edition 2012 Update_1.
 - Li, E., Zhang, F., Niu, S., Liu, X., Liu, G., Che, Y., 2012. A Spiro[chroman-3,7'-isochromene]-4,6'(8' H)-dione from the Cordyceps-colonizing fungus *Fimetariella* sp. *Org. Lett.* 14, 3320–3323.
 - Li, G.Y., Li, B.-G., Yang, T., Yan, J.-F., Liu, G.-Y., Zhang, G.-L., 2006. Chaetocochins A-C, epipolythiodioxopiperazines from *Chaetomium cochliodes*. *J. Nat. Prod.* 69, 1374–1376.
 - Li, H., Qing, C., Zhang, Y., Zhao, Z., 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1515–1519.
 - Li, H., Xiao, J., Gao, Y.-Q., Tang, J.J., Zhang, A.-L., Gao, J.-M., 2014. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*, and their phytotoxic and cytotoxic activities. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3734–3741.
 - Li, J.Y., Harper, J.K., Grant, D.M., Tombe, B.O., Bashyal, B., Hess, W.M., Strobel, G.A., 2001. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry* 56, 463–468.
 - Li, J.Y., Strobel, G., Harper, J., Lobkovsky, E., Clardy, J., 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org. Lett.* 2, 767–770.
 - Liu, L., Tian, R., Liu, S., Chen, X., Guo, L., Che, Y., 2008. Pestaloficiols A–E, bioactive cyclopropane derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 6021–6026.
 - López-Vallejo, F., Frago-Serrano, M., Suárez-Ortiz, G.A., Hernández-Rojas, A.C., Cerda-García-Rojas, C.M., Pereda-Miranda, R., 2011. Vicinal 1H-1H NMR coupling constants from density functional theory as reliable tools for stereochemical analysis of highly flexible multichiral center molecules. *J. Org. Chem.* 76, 6057–6066.
 - Macías-Rubalcava, M.L., Ruiz-Velasco Sobrino, M.E., Meléndez-González, C., Hernández-Ortega, S., 2014. Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potential herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3553–3562.
 - Madariaga-Mazon, A., Gonzalez-Andrade, M., Toriello, C., Navarro-Barranco, H., Mata, R., 2014. Potent anti-calmodulin activity of cyclotetradepsipeptides isolated from *Isaria fumosorosea* using a newly designed biosensor. *Nat. Prod. Comm.* 10, 113–116.
 - Masiello, P., 2006. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 873–893.
 - Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J. Nat. Prod.* 76, 468–483.
 - Matsui, T., Ogunwande, I.A., Abesundara, K.J.M., Matsumoto, K., 2006. Anti-

- hyperglycemic potential of natural products. *Mini Rev. Med. Chem.* 6, 349–356.
- Mendoza-Espinoza, J.A., López-Vallejo, F., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R., Cerda-García-Rojas, C.M., 2009. Structural reassignment, absolute configuration, and conformation of hypurticin, a highly flexible polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one. *J. Nat. Prod.* 72, 700–708.
 - Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.
 - Moorthy, N., J Ramos, M., A Fernandes, P., 2012. Studies on α -glucosidase inhibitors development: magic molecules for the treatment of carbohydrate mediated diseases. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 713–720.
 - Mottet, D., Michel, G., Renard, P., Ninane, N., 2002. ERK and calcium in activation of HIF-1. *Annals of the New York Academic Science* 973, 448–453.
 - Müllbacher, A., Waring, P., Tiwari-Palni, U., Eichner, R.D., 1986. Structural relationship of epipolythiodioxopiperazines and their immunomodulating activity. *Mol. Immunol.* 23, 231–235.
 - Nakai, H., 2005. Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia Bratislava* 60, 131–135.
 - Nakajima, H., Kim, Y.B., Terano, H., Yoshida, M., Horinouchi, S. (1998). FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Experimental Cell Research*, 241, 126–133.
 - Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 550–553.
 - Olokoba, A.B., Obateru, O.A., Olokoba, L.B., 2012. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman. Med. J.* 27, 269–273.
 - Orosz, F., Kovács, J., Löw, P., Vértessy, B.G., Urbányi, Z., Acs, T., Keve, T., Ovádi, J., 1997. Interaction of a new bis-indol derivative, KAR-2 with tubulin and its antimetabolic activity. *Br. J. Pharmacol.* 121, 947–954.
 - Orosz, F., Vértessy, B.G., Salerno, C., Crifo, C., Capuozzo, E., Ovádi, J., 1997. The interaction of a new anti-tumour drug, KAR-2 with calmodulin. *Br. J. Pharmacol.* 121, 955–962.
 - Park, H., Hwang, K.Y., Kim, Y.H., Oh, K.H., Lee, J.Y., Kim, K., 2008. Discovery and biological evaluation of novel α -glucosidase inhibitors with in vivo antidiabetic effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 3711–3715.
 - Pearce, C., 2011. Where are the new medicines? The case for terrestrial microorganisms. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 136–137.
 - Peláez, F., Cabello, A., Platas, G., Díez, M.T., del Val, A.G., Basilio, A., Martán, I., Vicente, F., Bills, G.F., Giacobbe, R.A., Schwartz, R.E., Onishi, J.C., Meinz, M.S., Abruzzo, G.K., Flattery, A.M., Kong, L., Kurtz, M.B., 2000. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 333–343.
 - Pittayakhajonwut, P., Suvannakad, R., Thienhirun, S., Prabpai, S., Kongsaree, P., Tanticharoen, M., 2005. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). *Tetrahedron Letters* 46, 1341–1344.
 - Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Riyaz-ul-Hasan, S., Amna, T., Ahmed, B., Verma, V., Singh, S., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Sharma, R.K., Qazi, G.N., 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsutaas* a novel alternative source of

- podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotechnol.* 122, 494–510.
- Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., Spiteller, M., 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.* 68, 1717–1719.
 - Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2011. Rang & Dale's Pharmacology. Elsevier Health Sciences.
 - Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., González, M.D.C., Glenn, A.E., Mata, R., 2013. Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 94, 198–205.
 - Rodriguez, R.J., White, J.F., Jr, Arnold, A.E., Redman, R.S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182, 314–330.
 - Ross, S.A., Gulve, E.A., Wang, M., 2004. Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. *Chem. Rev.* 104, 1255–1282.
 - Rudnitskaya, A., Török, B., Török, M., 2010. Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 38, 261–265.
 - Sakemi, S.S., Hirai, H.H., Ichiba, T.T., Inagaki, T.T., Kato, Y.Y., Kojima, N.N., Nishida, H.H., Parker, J.C.J., Saito, T.T., Tonai-Kachi, H.H., VanVolkenburg, M.A.M., Yoshikawa, N.N., Kojima, Y.Y., 2002. Thielavins as glucose-6-phosphatase (G6Pase) inhibitors: producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot.* 55, 941–951.
 - Saleem, M., Tousif, M.I., Riaz, N., Ahmed, I., Schulz, B., Ashraf, M., Nasar, R., Pescitelli, G., Hussain, H., Jabbar, A., Shafiq, N., Krohn, K., 2013. Cryptosporioidin: a bioactive polyketide produced by an endophytic fungus *Cryptosporiopsis* sp. *Phytochemistry* 93, 199–202.
 - Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y.K.M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C., Macías-Rubalcava, M.L., 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 16, 132–146.
 - Sanchez, T., Estrada-Hernandez, T., Paik, J.H., Wu, M.-T., Venkataraman, K., Brinkmann, V., Claffey, K. (2003). Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *The Journal of Biological Chemistry.* 278, 47281–47290.
 - Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109, 661–686.
 - Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K., Krohn, K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106, 996–1004.
 - Segel, I.H., 1993. Enzyme kinetics. Wiley-Interscience.
 - Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B.T., Priti, V., Kumar, P.M., Ravikanth, G., Spiteller, M., Vasudeva, R., Shaanker, R.U. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry* 71, 117–122.
 - Sznatzke, G., 1965. Circular dichroism—IX. *Tetrahedron* 21, 421–438.
 - Sznatzke, G., 1968. Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion— Principles and Application to the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products. *Angew. Chem. Int. Ed.* 7, 14–25.
 - Sznatzke, G., Lábler, L., Tamm, C., 1972. Circular dichroism of A-nor-steroids and

- related derivatives. *Helv. Chim. Acta.* 55, 886–892.
- Snatzke, G.N., 1979. Circular Dichroism and Absolute Conformation: Application of Qualitative MO Theory to Chiroptical Phenomena. *Angew. Chem. Int. Ed.* 18, 363–377.
 - Song, F., Wu, S.-H., Zhai, Y.-Z., Xuan, Q.-C., Wang, T., 2014. Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. *Chem. Biodivers.* 11, 673–694.
 - Song, Y.C., Lunde, C.S., Benton, B.M., & Wilkinson, B.J. (2013). Studies on the mechanism of telavancin decreased susceptibility in a laboratory-derived mutant. *Microbial drug resistance*, 19, 247–255.
 - Song, Y.C., Li, H., Ye, Y.H., Shan, C.Y., Yang, Y.M., Tan, R.X., 2004. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters* 241, 67–72.
 - Spiteller, S.K.C.H.M., Hertweck, C., Spiteller, M., 2012. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology* 19, 792–798.
 - Sprimont, P., Pierard, S., Vanoverschelde, J.-L., Debbas, N. (2014). Efficacy and safety of biodegradable polymer biolimus A9-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent in diabetic patients: a prospective non-randomized single-centre long-term comparison. *Acta Cardiologica*, 69, 523–531.
 - Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260, 214–216.
 - Stierle, D.B., Stierle, A.A., Bugni, T., 2003. Sequoiamonascins AD: novel anticancer metabolites isolated from a redwood endophyte. *J. Org. Chem.*
 - Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J., 2004a. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67, 257–268.
 - Strobel, G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* 5, 535–544.
 - Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67, 491–502.
 - Suárez-Ortiz, G.A., Cerda-García-Rojas, C.M., Hernández-Rojas, A., Pereda-Miranda, R., 2013. Absolute Configuration and conformational analysis of brevipolides, bioactive 5,6-dihydro- α -pyrones from *Hyptis brevipes*. *J. Nat. Prod.* 76, 72–78.
 - Suzuki, Y., Shinji, M., Eto, N., 1984. Assignment of a *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranosidase of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12016 to a novel exo- α -1,4-glucosidase active for oligomaltosaccharides and α -glucans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 787, 281–289.
 - Takii, Y., Takahashi, K., Yamamoto, K., Sogabe, Y., Suzuki, Y., 1996. *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 α -glucosidase specific for α -1,4 bonds of maltosaccharides and α -glucans shows high amino acid sequence similarities to seven α -D-glucohydrolases with different substrate specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 629–634.
 - Tan, R.X., Zou, W.X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18, 448–459.
 - Tansuwan, S., Chanaprat, P., Teerawatananond, T., Muangsin, N., Pornpakakul, S., 2010. (4*S*,5*S*,6*S*)-4-Hydroxy-3-methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one. *Acta Cryst* (2010). E66, 2263, 1–8.
 - Tansuwan, S., Pornpakakul, S., Roengsumran, S., Petsom, A., Muangsin, N., Sihanonta, P., Chaichit, N., 2007. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria*

- sp. J. Nat. Prod. 70, 1620–1623.
- Tsujimoto, Y., Tanaka, H., Takemura, R., Yokogawa, T., Shimonaka, A., Matsui, H., Kashiwabara, S.I., Watanabe, K., Suzuki, Y., 2007. Molecular determinants of substrate recognition in thermostable α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 13. *Journal of Biochemistry* 142, 87–93.
 - Verma, V.C., Gond, S.K., Kumar, A., Mishra, A., Kharwar, R.N., Gange, A.C., 2008. Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microb. Ecol.* 57, 749–756.
 - Wardrop, D.J., Waidyarachchi, S.L., 2010. Synthesis and biological activity of naturally occurring α -glucosidase inhibitors. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1431.
 - Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczancy, S., Martino, V., Acevedo, C., 2004. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibiot.* 57, 559–563.
 - Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., Tabata, S., 2004. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 271, 3414–3420.
 - Zhang, B., 1999. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* 284, 974–977.
 - Zhang, Q., Li, H.Q., Zong, S.C., Gao, J.-M., Zhang, A.L., 2012. Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 127–148.
 - Zúñiga-Guajardo, S., 2010. El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 48, 509–520.

ANEXO I

	Página
Cuadro AI-1. Datos espectroscópicos de los productos 171-173 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz).	114
Cuadro AI-2. Datos espectroscópicos de los productos 174 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz).	115
Cuadro AI-3. Datos espectroscópicos del producto 175 en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz).	116
Cuadro AI-4. Datos espectroscópicos de los productos 176-178 en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	117
Cuadro AI-5. Datos espectroscópicos de los productos 179-181 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz).	118
Cuadro AI-6. Datos espectroscópicos del producto 128 en CDCl_3 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz).	119
Cuadro AI-7. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 175a .	120
Cuadro AI-8. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 175b .	121
Cuadro AI-9. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 175c .	122
Cuadro AI-10. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 177d .	123
Cuadro AI-11. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, valores de $^3J_{H-H}$ en Hz para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 175a .	124
Cuadro AI-12. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, valores de $^3J_{H-H}$ en Hz para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 175b .	125
Cuadro AI-13. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 176a .	126
Cuadro AI-14. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 176b .	127
Cuadro AI-15. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 176c .	128

	Página
Cuadro AI-16. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 177.	129
Figura AI-1. Espectro de ^1H -RMN de la thielavina A (171) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	130
Figura AI-2. Espectro de ^{13}C -RMN de la thielavina A (171) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	130
Figura AI-3. Espectro de HMBC de la thielavina A (171) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	131
Figura AI-4. Espectro de ^1H -RMN de la thielavina J (172) en CDCl_3 .	132
Figura AI-5. Espectro de ^{13}C -RMN de la thielavina J (172) en CDCl_3 .	132
Figura AI-6. Espectro de HSQC de la thielavina J (172) en CDCl_3 .	133
Figura AI-7. Espectro de HMBC de la thielavina J (172) en CDCl_3 .	133
Figura AI-8. Espectro de ^1H -RMN de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).	134
Figura AI-9. Espectro de ^{13}C -RMN de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).	134
Figura AI-10. Espectro de HSQC de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).	135
Figura AI-11. Espectro de HMC de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).	135
Figura AI-12. Espectro de ^1H -RMN de la fimetarona (174) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 1:1).	136
Figura AI-13. Espectro de ^{13}C -RMN de la fimetarona (174) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 1:1).	136
Figura AI-14. Espectro de ^1H -RMN de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 7:3).	137
Figura AI-15. Espectro de ^{13}C -RMN de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 7:3).	137
Figura AI-16. Espectro de HSQC de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 7:3).	138
Figura AI-17. Espectro de HMBC de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 7:3).	138
Figura AI-18. Espectro COSY de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 7:3).	139
Figura AI-19. Espectro NOESY de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros <i>P/M</i> , 7:3).	139
Figura AI-20. Espectro de ^1H -RMN del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	140
Figura AI-21. Espectro de ^{13}C -RMN del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	140

	Página
Figura AI-22. Espectro de HSQC del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	141
Figura AI-23. Espectro de HMBC del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	141
Figura AI-24. Espectro ROESY del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	142
Figura AI-25. Espectro COSY del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	142
Figura AI-26. Espectro de ¹ H-RMN de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -4-hidroximeleina (176) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	143
Figura AI-27. Espectro de ¹³ C-RMN de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -4-hidroximeleina (176) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	143
Figura AI-28. Espectro de HSQC de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -4-hidroximeleina (176) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	144
Figura AI-29. Espectro de HMBC de la 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -4-hidroximeleina (176) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	144
Figura AI-30. Espectro de ¹ H-RMN de la 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -4-hidroximeleina (177) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	145
Figura AI-31. Espectro de ¹³ C-RMN de la 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -4-hidroximeleina (177) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	145
Figura AI-32. Espectro de HSQC de la 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -4-hidroximeleina (177) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	146
Figura AI-33. Espectro de HMBC de la 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> -4-hidroximeleina (177) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	146
Figura AI-34. Espectro de ¹ H-RMN de la 3 <i>S</i> -8-metoximeleina (178) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	147
Figura AI-35. Espectro de ¹³ C-RMN de la 3 <i>S</i> -8-metoximeleina (178) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	147
Figura AI-36. Espectro de HSQC de la 3 <i>S</i> -8-metoximeleina (178) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	148
Figura AI-37. Espectro de HMBC de la 3 <i>S</i> -8-metoximeleina (178) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	148
Figura AI-38. Espectro de ¹ H-RMN de la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179) en CDCl ₃ .	149
Figura AI-39. Espectro de ¹³ C-RMN de la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179) en CDCl ₃ .	149
Figura AI-40. Espectro de ¹ H-RMN de la 4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> -4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	150
Figura AI-41. Espectro de ¹³ C-RMN de la 4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> -4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	150
Figura AI-42. Espectro de HSQC de la 4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> -4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	151
Figura AI-43. Espectro de HMBC de la 4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> -4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ .	151

	Página
Figura AI-44. Espectro de ^1H -RMN de la 4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	152
Figura AI-45. Espectro de ^{13}C -RMN de la 4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	152
Figura AI-46. Espectro de HSQC de la 4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	153
Figura AI-47. Espectro de HMBC de la 4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.	153
Figura AI-48. Espectro de ^1H -RMN de la chaetomina (128) en CDCl_3 .	154
Figura AI-49. Espectro de ^{13}C -RMN de la chaetomina (128) en CDCl_3 .	154
Figura AI-50. Espectro de HSQC de la chaetomina (128) en CDCl_3 .	155
Figura AI-51. Espectro de HMBC de la chaetomina (128) en CDCl_3 .	155
Figura AI-52. Espectro COSY de la chaetomina (128) en CDCl_3 .	156
Figura AI-53. Espectro de ^1H -RMN del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Ampliación de la señal entre 3.85-3.90 ppm.	157
Figura AI-54. Espectro NOE del 4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Irradiación selectiva a 1.58 ppm.	157
Figura AI-55. Espectro de ^1H -RMN del 6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Ampliación de la señal entre 4.46-4.51 ppm.	157
Figura AI-56. Espectro NOE de la 4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Irradiación selectiva a 2.35 ppm.	158
Figura AI-57. Espectro NOE de la 4'- <i>O</i> -metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Irradiación selectiva a 2.67 ppm.	158
Figura AI-58. Validación del protocolo de acoplamiento molecular. A) Modelo estructural generado para el complejo αGHY -isomaltosa. B) Representación 3D de la interacción de la isomaltosa (bastones amarillos) en el dominio catalítico de la enzima (líneas grises). C) Representación 2D de la interacción entre la enzima αGHY y la isomaltosa.	159
Figura AI-59. Validación del protocolo de acoplamiento molecular. A) Modelo estructural generado para el complejo αGHY -glucosa. B) Representación 3D de la interacción de la glucosa (bastones verdes) en el dominio catalítico de la enzima (líneas grises); glucosa cocrystalizada con la enzima αGHY (bastones naranjas). C) Representación 2D de la interacción entre la enzima αGHY y glucosa.	159
Figura AI-60. Validación del protocolo de acoplamiento molecular. A) Modelo estructural generado para el complejo αGHBs -maltosa. B) Representación 3D de la interacción de la maltosa (bastones verdes) en el dominio catalítico de la enzima (líneas grises). C) Representación 2D de la interacción entre la enzima αGHBs y la maltosa.	160

Cuadro AI-1. Datos espectroscópicos de los productos 171-173 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz).

Posición	Thielavina A (171) ^a			Thielavina J (172) ^b			Thielavina K (173) ^c		
	δ_{C}	δ_{H}	HMBC _H → _C	δ_{C}	δ_{H}	HMBC _H → _C	δ_{C}	δ_{H}	HMBC _H → _C
C1	113.5			109.7			115.2		
C2	157.1			163.2			157.8		
C3	116.4			116.7			115.3		
C4	151.5			152.9			150.6		
C5	121.3			115.9	6.61	1, 4	120.1		
C6	136.3			140.4			137.8		
C1'	114.9			126.7			126.3		
C2'	157.8			154.0			154.3		
C3'	114.8			122.0			122.0		
C4'	150.4			149.4			149.5		
C5'	119.5			125.7			125.7		
C6'	137.0			132.9			133.6		
C1''	102.1			102.9			102.7		
C2''	164.0			164.1			164.0		
C3''	109.0			109.4			109.4		
C4''	161.3			160.4			160.7		
C5''	110.9	6.36	1'', 4''	111.2	6.34	1'', 4''	111.2	6.36	1'', 4''
C6''	140.1			140.3			140.2		
1-carbonilo	168.9			173.9			170.1		
3-Me	8.6	2.08	2, 3, 4	8.9	2.19	2, 3, 4	9.6	2.23	2, 3, 4
5-Me	11.9	2.12	4, 5, 6				12.9	2.22	
6-Me	17.5	2.61	4, 5, 6	23.9	2.61	4, 5, 6	18.0	2.58	4, 5, 6
1'-carbonilo	169.5			166.3			166.2		
2'-OMe				62.3	3.87	2'	62.0	3.86	
3'-Me	8.7	2.09	2', 3', 4'	10.1	2.16	2', 3', 4'	10.1	2.18	2', 3', 4'
5'-Me	11.8	2.11	4', 5', 6'	12.9	2.12	4', 5', 6'	12.9	2.13	4', 5', 6'
6'-Me	17.1	2.55	1', 5', 6'	16.8	2.39	1', 5', 6'	17.0	2.41	1', 5', 6'
1''-carbonilo	169.9			169.9			169.9		
3''-Me	6.5	2.05	2'', 3'', 4''	7.7	2.13	2'', 3'', 4''	7.5	2.12	2'', 3'', 4''
6''-Me	23.5	2.64	1'', 5'', 6''	24.7	2.65	1'', 5'', 6''	24.6	2.65	1'', 5'', 6''

^a Colectado en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$; ^b colectado en mezcla $\text{CDCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}-d_4$ (7:3); ^c colectado en CDCl_3 .

Cuadro AI-2. Datos espectroscópicos de los productos 174 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz).

Posición	Isómero (174a)		Isómero (174b)	
	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)
1	189.7		190.7	
2	112.7		112.7	
3	126.4		126.2	
4	105.2	6.62, <i>s</i>	105.4	6.58, <i>s</i>
5	150.9		149.6	
6	134.5		134.6	
7	148.7		148.7	
8a	74.2	4.18, <i>d</i> (11.8)	74.4	4.23, <i>d</i> (11.7)
8b		4.83, <i>d</i> (11.8)		4.56, <i>d</i> (11.7)
9	53.8		54.2	
10	191.2		192.3	
11	114.6		115.2	
12	151.0		149.9	
13	107.4	7.64, <i>s</i>	107.1	7.69, <i>s</i>
14	163.1		163.0	
15	155.2		155.4	
16	114.6		115.2	
17a	28.9	2.43, <i>d</i> (16.0)	29.5	2.47, <i>d</i> (16.1)
17b		3.10, <i>d</i> (16.0)		3.25, <i>d</i> (16.1)
18	114.2		114.1	
19	142.8		142.2	
20	136.9		136.8	
21	147.6		147.7	
22	106.4	7.24, <i>s</i>	106.7	7.27, <i>s</i>
23	121.1		121.7	
24	170.8		170.3	
25	201.3		201.9	
26	32.8	2.46, <i>s</i>	33.0	2.44, <i>s</i>
27	20.4	2.27, <i>s</i>	22.8	2.30, <i>s</i>
28	165.5		165.3	
29	53.4	3.90, <i>s</i>	53.1	3.86, <i>s</i>
30	56.7	3.93, <i>s</i>	56.9	3.89, <i>s</i>
31	56.6	3.94, <i>s</i>	56.8	3.90, <i>s</i>
32	52.6	3.77, <i>s</i>	52.6	3.73, <i>s</i>

Cuadro AI-3. Datos espectroscópicos del producto 175 en CH₃OH-*d*₄ (¹H 500 MHz, ¹³C 125 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)	HMBC	COSY	ROESY
2	170.0				
3	90.1	5.14 (<i>d</i> , 1.4)	2, 4, 5		
4	176.2				
5	30.0	a 2.35 (<i>dd</i> , 3.8, 17.1) b 2.67 (<i>ddd</i> , 1.0, 12.5, 16.7)	3, 4 4, 6, 7	6	
6	79.3	4.45 (<i>ddd</i> , 3.9, 5.4, 12.7)	7	5, 7	
7	80.5	3.84 <i>m</i>	5a, 1'	6	
8	31.5	1.58 <i>m</i>	7	7	
9	28.1	1.44 (<i>tdd</i> , 6.9, 14.8, 19.4)		8	
10	23.7	1.27 <i>m</i>		9	
11	14.3	0.89 (<i>t</i> , 7.3)	9, 10	10	
4-OMe	57.1	3.75 <i>s</i>	4,		
1'	102.1	4.64 (<i>d</i> , 1.0)	7, 2'		2', 3', 5'
2'	72.9	3.84 (<i>dd</i> , 1.0, 3.5)		3'	
3'	75.3	3.53 (<i>dd</i> , 3.3, 9.4)		2', 4'	
4'	78.0	3.31 (<i>t</i> , 9.5)		3', 5'	
5'	77.2	3.12 (<i>ddd</i> , 2.0, 4.3, 9.6)		4', 6'	
6'	62.5	a 3.67 (<i>dd</i> , 4.4, 11.7) b 3.78 (<i>dd</i> , 2.0, 11.9)			
4'-OMe	61.0	3.50 <i>s</i>			

Cuadro AI-4. Datos espectroscópicos de los productos 176-178 en CH₃OH-*d*₄.

Posición	176 ^a			177 ^b		178 ^b	
	δ_C	δ_H (J en Hz)	HMBC	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)
1	171.0			170.3		165.5	
3	79.9	4.72 (<i>qd</i> , 2.1, 6.6 Hz)		81.6	4.56, <i>m</i>	76.1	4.57, <i>m</i>
4	67.6	4.55 (<i>d</i> , 2.1 Hz)	4a, 5, 8a	69.5	4.56, <i>m</i>	36.6	a. 2.88 (<i>dd</i> , 11.2, 16.2 Hz) b. 2.97 (<i>dd</i> , 3.0, 16.2 Hz)
4a	143.1			141.8		143.8	
5	119.8	6.96 (<i>d</i> , 8.4 Hz)	4,6	117.7	7.08 (<i>d</i> , 7.5 Hz)	120.6	6.90 (<i>d</i> , 7.5 Hz)
6	137.7	7.56 (<i>dd</i> , 7.4, 8.5 Hz)	5, 7	137.8	7.58 (<i>dd</i> , 7.5, 8.5 Hz)	136.3	7.54 (<i>dd</i> , 7.8, 8.2 Hz)
7	118.5	6.99 (<i>d</i> , 7.4 Hz)	6,8	117.7	6.94 (<i>d</i> , 8.0 Hz)	112.1	7.06 (<i>d</i> , 8.3 Hz)
8	162.9			162.6		162.5	
8a	108.4			108.5		117.7	
3-CH ₃	16.4	1.52 (<i>d</i> , 6.6 Hz)	3, 4	18.2	1.47 (<i>d</i> , 6.0 Hz)	20.7	1.45 (<i>d</i> , 6.3 Hz)
8-OCH ₃	-	-	-	-	-	56.4	3.89, <i>s</i>

^a ¹H-RMN (400 MHz), ¹³C (100 MHz); ^b ¹H-RMN (500 MHz), ¹³C-RMN (125 MHz).

Cuadro AI-5. Datos espectroscópicos de los productos 179-181 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz).

Posición	179 ^a		180 ^b		181 ^b	
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	182.5		196.3		202.2	
2	151.6		98.5	5.26 (<i>d</i> , 1.9 Hz)	101.9	5.37, <i>s</i>
3	114.8		175.8		178.9	
4	182.0		69.5	3.22 (<i>d</i> , 2.0 Hz)	74.3	4.15, <i>s</i>
5	161.2		60.8		73.2	
6	102.2	5.84, <i>s</i>	61.2	4.51, <i>s</i>	48.8	a. 2.44 (<i>d</i> , 16.4 Hz) b. 2.65 (<i>d</i> , 16.4 Hz)
3-CH ₃	7.8	1.95, <i>s</i>	-	-	-	-
5-CH ₃	-	-	19.5	1.57, <i>s</i>	25.7	1.31, <i>s</i>
3-OCH ₃	-	-	57.5	3.76, <i>s</i>	57.5	3.79, <i>s</i>
5-OCH ₃	56.8	3.87, <i>s</i>	-	-	-	-

^a Colectado en CDCl₃; ^b colectado en CH₃OH- *d*₄.

Cuadro AI-6. Datos espectroscópicos del producto 128 en CDCl₃ (¹H 400 MHz, ¹³C 100 MHz).

Posición	δ_c	δ_H (<i>J</i> en Hz)	COSY	HMBC
1	165.7			
2				
3	73.3			
3a	60.8	4.31, <i>m</i>		3, 4
4	163.4			
5	80.3	6.21, <i>s</i>	6-NH	10b, 10a, 6a
6				
6a	148.5			
7	125.2	7.34, <i>d</i>	8	6a, 8
8	120.6	6.95 <i>td</i>	7, 9	7, 9
9	131.6	7.29 <i>m</i>	8, 10	8, 10
10	111.3	6.80, <i>d</i>	9	9, 10a
10a	126.7			
10b	73.7			
11	42.8	*3.08, <i>d</i> **4.41, <i>d</i>	** *	1, 10b, 11a 1, 10b, 11a
11a	80.3			
1'	165.7			
2'				
3'	75.0			
3a'	61.4	4.28, <i>m</i>		3'
4'	167.0			
5'				
6'	76.72			
7'	27.3	+3.70, <i>d</i> ++3.87, <i>d</i>	++ +	1', 6', 8', 14a' 1', 6', 8', 14a'
8'	107.9			
9'	127.4	7.19, <i>brs</i>		7', 8', 10a', 14a'
10a'	134.2			
11'	119.3	7.65, <i>m</i>	12'	10a', 12'
12'	123.0	7.23, <i>m</i>	11', 13'	11', 13'
13'	120.8	7.22, <i>m</i>	12', 14'	12', 14', 13', 14a'
14'	111.5	7.29 <i>m</i>	13'	
14a'	130.6			
2-NCH ₃	27.7	3.20, <i>s</i>		3
2'-NCH ₃	27.5	3.17, <i>s</i>		1', 3'
5'-NCH ₃	28.4	2.96, <i>s</i>		3', 4', 6'
6-NH		5.32, <i>s</i>	5	6a, 5

Cuadro AI-7. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los confórmeros más relevantes del diastereoisómero **175a**.

confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.485	8.15	0.08	-48.11	2.77	-9.81	36.66	1.98	-0.69	-0.41	-1.43	-2.40	-0.64	4.07	-7.75	-1.13
2	0.339	0.274	-0.04	0.01	-27.93	3.77	9.80	13.19	0.52	-0.36	-0.23	6.14	-0.27	0.48	-6.31	-8.62	-32.41
3	0.564	0.187	8.07	0.02	-52.49	4.32	5.95	21.05	4.03	-0.63	-0.49	-0.78	-2.32	-1.64	1.60	-6.18	-1.10
4	1.668	0.029	8.55	0.03	-54.58	3.94	8.03	21.06	2.59	-0.51	-0.30	0.45	-1.68	-1.26	-8.12	-0.24	-4.19
5	1.769	0.024	9.75	0.05	-52.46	-1.00	-6.58	38.93	-1.06	-0.24	-0.23	-1.50	-3.28	2.29	-1.60	-6.21	-4.34
Valor ponderado ^d			16.73	0.09	-114.3	6.70	3.59	63.53	3.91	-1.18	-0.80	1.39	-4.83	-0.37	-5.03	-14.07	-20.95
Promedio λ (nm) ^e			331.8	279.5	259.0	243.8	237.9	233.4	228.4	219.4	207.5	198.3	194.7	191.4	189.1	188.0	185.6

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-870120.1837 kcal/mol). ^b Valor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^c Valores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^d Valor calculado con la ecuación $\sum^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo confórmero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo confórmero. ^e Valor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-8. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los confórmeros más relevantes del diastereoisómero **175b**.

confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.710	4.58	-0.22	66.45	-31.38	0.24	-0.37	-7.67	-16.22	0.51	-3.69	17.15	0.73	0.41	0.99	-8.93
2	0.530	0.290	4.21	-0.12	-39.27	-0.59	21.32	16.06	-0.44	0.12	-1.39	-1.64	0.94	-8.69	-9.41	-8.64	-1.45
Valor ponderado ^d			4.47	-0.19	35.77	-22.44	6.36	4.40	-5.57	-11.47	-0.04	-3.10	12.45	-2.01	-2.44	-1.80	-6.76
Promedio λ (nm) ^e			330.0	279.9	259.4	245.5	242.6	237.2	225.2	217.7	207.4	204.0	197.1	193.0	190.3	188.6	187.6

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-870119.8268 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\Sigma^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo confórmero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo confórmero. ^eValor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-9. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero **176c**.

conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.536	-2.17	0.18	32.46	-4.98	8.79	-31.02	1.00	-0.14	0.12	-0.19	-0.65	1.37	-3.82	8.47	36.08
2	0.358	0.293	-3.26	0.11	29.64	-0.64	-18.36	-11.23	1.86	0.23	0.34	6.19	-3.05	6.12	0.47	0.54	26.52
3	1.197	0.071	-3.16	0.12	29.11	-1.59	-18.13	-10.40	1.96	0.23	0.30	8.48	-3.91	-1.62	4.48	2.46	23.38
4	1.252	0.065	-3.22	0.10	30.55	-0.46	-28.77	-2.53	2.64	0.16	0.61	7.67	-4.45	2.01	6.39	0.07	14.62
5	1.621	0.035	-1.65	0.32	28.69	-5.59	-22.57	-10.77	5.20	0.79	1.02	-1.77	12.68	18.89	6.18	2.79	-17.88
Valor ponderado ^d			-2.61	0.16	31.14	-3.19	-4.60	-21.20	1.57	0.05	0.26	2.75	-1.37	3.20	-0.96	4.97	29.11
Promedio λ (nm) ^e			329.2	275.7	258.7	239.5	235.4	232.7	227.9	217.1	205.3	198.7	193.9	190.4	187.9	186.7	184.6

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-870120.7017 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\Sigma^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo conformero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo conformero. ^eValor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-10. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los confórmers más relevantes del diastereoisómero **177d**.

confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.547	-4.94	0.19	39.40	-6.68	-30.24	4.86	1.72	-0.47	-0.03	-1.52	8.60	6.32	0.76	2.56	4.34
2	0.451	0.257	-1.44	0.31	32.93	-4.03	-0.34	-23.90	-2.78	1.34	0.54	-7.51	3.18	7.92	3.60	-0.45	32.01
3	0.766	0.151	-0.78	-0.06	32.99	-8.62	-23.56	-0.95	1.77	-0.91	-1.01	-2.22	2.06	4.88	8.53	-1.21	20.37
4	1.517	0.042	-0.72	-0.07	30.46	-8.00	-23.66	-1.13	2.35	-0.96	-1.11	-2.19	1.22	2.01	8.08	2.90	15.13
Valor ponderado ^d			-3.22	0.17	36.27	-6.33	-21.18	-3.67	0.59	-0.09	-0.08	-3.19	5.88	6.31	2.97	1.23	14.31
Promedio λ (nm) ^e			328.4	274.3	258.3	240.2	235.0	233.3	226.9	215.1	204.6	198.5	193.7	190.2	187.4	185.9	184.6

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-870120.7017 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo confórmero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo confórmero. ^eValor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-11. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, valores de ${}^3J_{H-H}$ en Hz para los conformeros más relevantes del diastereoisómero 175a.

conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	${}^3J_{6-7}^c$	${}^3J_{5proR-6}^c$	${}^3J_{5proS-6}^c$
1	0.000	0.485	8.09	3.62	12.96
2	0.339	0.274	4.23	3.42	13.13
3	0.564	0.187	8.65	3.45	12.96
4	1.668	0.029	8.6	3.49	12.96
5	1.769	0.024	8.18	3.68	12.91
Valor ponderado ^d			7.16	3.53	13.01

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-870120.1837 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de 3J expresados en Hz (DFT B3LYP/DGDZVP). ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es el valor teórico calculado para el *i*ésimo conformero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del *i*ésimo conformero.

Cuadro AI-12. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, valores de ${}^3J_{H-H}$ en Hz para los conformeros más relevantes del diastereoisómero **175b**.

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	${}^3J_{6-7}^c$	${}^3J_{5proR-6}^c$	${}^3J_{5proS-6}^c$
1	0.000	0.710	9.64	6.94	0.97
2	0.530	0.290	3.02	3.4	12.35
Valor ponderado ^d			7.72	5.91	4.27

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-870120.1837 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de 3J expresados en Hz (DFT B3LYP/DGDZVP). ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i J^i \times P^i$, donde J^i es el valor teórico calculado para el *i*ésimo conformero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del *i*ésimo conformero.

Cuadro AI-13. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los confórmeros más relevantes del diastereoisómero **176a**.

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.383	7.12	9.60	-11.06	-13.37	-5.71	37.69	21.87	-24.17	-29.75	-2.87	-30.89	30.90	16.36	11.80	7.12
2	0.116	0.314	7.10	9.60	-11.08	-13.37	-5.73	37.74	21.83	-24.02	-29.86	-2.89	-30.80	30.79	16.42	11.79	7.10
3	0.444	0.181	7.11	9.60	-11.06	-13.39	-5.74	37.73	21.81	-23.86	-29.99	-2.84	-30.79	30.82	16.40	11.80	7.11
4	0.924	0.080	7.12	9.55	-10.97	-13.44	-5.73	37.68	21.80	-23.84	-29.98	-2.78	-30.83	30.85	16.43	11.78	7.12
5	1.505	0.030	7.09	9.60	-11.13	-13.34	-5.76	37.80	21.76	-23.76	-30.12	-2.85	-30.71	30.77	16.43	11.80	7.09
6	2.132	0.010	7.13	9.55	-11.25	-13.18	-5.70	37.79	21.79	-24.01	-29.97	-2.83	-30.82	30.98	16.40	11.76	7.13
Valor ponderado ^d			7.11	9.60	-11.06	-13.38	-5.73	37.71	21.83	-24.03	-29.86	-2.87	-30.84	30.85	16.39	11.79	16.50
Promedio λ (nm) ^e			359.4	270.4	257.7	252.9	230.1	213.4	207.4	196.2	194.2	192.4	189.1	184.4	183.2	174.9	171.3

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-431786.0152 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo confórmero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo confórmero. ^eValor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-14. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los confórmers más relevantes del diastereoisómero **176b**.

confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.325	-0.61	7.55	21.80	-33.95	-29.63	-3.10	23.91	13.52	32.94	-9.31	32.77	-28.01	-30.34	29.31	6.05
2	0.074	0.287	-0.60	7.59	21.82	-33.99	-29.69	-3.08	23.99	13.53	33.05	-9.33	32.75	-28.12	-30.27	29.25	6.03
3	0.286	0.201	-0.61	7.59	21.83	-34.00	-29.71	-3.06	24.01	13.54	33.07	-9.36	32.75	-28.16	-30.25	29.23	6.02
4	0.619	0.115	-0.62	7.60	21.85	-34.01	-29.72	-3.04	24.02	13.53	33.10	-9.40	32.74	-28.19	-30.22	29.22	6.02
5	1.046	0.056	-0.60	7.61	21.84	-34.04	-29.74	-3.04	24.01	13.55	33.19	-9.40	32.69	-28.23	-30.18	29.21	6.01
6	1.776	0.016	-0.60	7.61	21.83	-34.03	-29.73	-3.04	24.00	13.55	33.21	-9.39	32.67	-28.21	-30.18	29.23	6.01
Valor ponderado ^d			-0.61	7.58	21.82	-33.99	-29.68	-3.08	23.97	13.53	33.04	-9.34	32.75	-28.11	-30.28	29.26	6.03
Promedio λ (nm) ^e			357.0	277.5	263.2	241.7	230.6	208.3	205.4	199.7	194.3	189.6	186.0	182.5	180.0	171.9	170.4

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-431786.4058 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo confórmero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo confórmero. ^eValor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-15. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los confórmeros más relevantes del diastereoisómero **176c**.

confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.424	1.75	-5.77	-23.32	35.39	30.29	3.33	-24.50	-14.74	-31.41	10.14	-35.44	29.06	27.87	-31.23	-6.45
2	0.015	0.413	1.75	-2.93	-33.03	42.21	44.14	-52.28	-4.06	-0.77	-22.84	20.98	-27.98	10.32	18.18	-10.05	-18.50
3	0.951	0.085	7.78	4.91	-64.92	26.42	5.04	30.48	-12.91	22.83	-23.23	0.04	10.99	-10.30	7.62	7.34	14.25
4	1.007	0.078	9.42	-1.00	13.52	-20.13	-3.07	5.82	4.52	7.45	1.50	15.26	-32.33	-10.47	10.82	-7.48	12.46
Valor ponderado ^d			2.86	-3.32	-28.02	33.14	31.28	-17.15	-12.81	-4.05	-24.62	14.16	-28.16	14.90	20.82	-17.35	-8.20
Promedio λ (nm) ^e			356.1	272.7	261.6	246.2	227.0	212.6	206.4	199.6	194.6	190.6	187.3	184.5	181.2	173.4	170.4

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-431611.2223 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el *i*ésimo confórmero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del *i*ésimo confórmero. ^eValor promedio del estado de excitación.

Cuadro AI-16. Energía libre de Gibbs calculada (DFT B3LYP/DGDZVP), población, y valores de fuerza de rotación teóricos expresados en $R_{(vel)}$ para los conformeros más relevantes del diastereoisómero **177**.

conformero	ΔG^a	$P(\%)^b$	estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.791	-5.92	-10.10	10.93	13.95	4.83	-38.42	-22.95	23.83	31.86	1.98	30.97	-31.86	-16.41	-11.88	-17.43
2	0.787	0.209	-6.88	0.82	-20.99	18.07	-8.04	7.99	-0.20	1.70	-3.57	-11.56	52.08	7.16	-30.21	3.89	-19.27
Valor ponderado ^d			-6.12	-7.81	4.24	14.82	2.14	-28.70	-18.18	19.20	24.44	-0.86	35.39	-23.69	-19.30	-8.58	-17.82
Promedio λ (nm) ^e			357.9	272.8	260.5	248.2	228.4	213.2	207.6	195.3	194.0	191.2	187.6	184.6	181.5	173.5	171.2

^aEnergía libre de Gibbs relativa (DFT B3LYP/DGDZVP, kcal/mol) calculada a partir del valor de energía libre de Gibbs absoluta (-431687.0787 kcal/mol). ^bValor expresado en porcentaje a partir del valor de ΔG a 298 K y 1 atm. ^cValores de fuerza de rotación calculados (DFT B3LYP/DGDZVP) expresados en $R_{(vel)}$. ^dValor calculado con la ecuación $\sum^i R_{(vel)}^i \times P^i$, donde $R_{(vel)}^i$ es el valor teórico calculado para el i ésimo conformero en los estados de excitación $n = 1 \rightarrow 15$ y P^i es la población del i ésimo conformero. ^eValor promedio del estado de excitación.

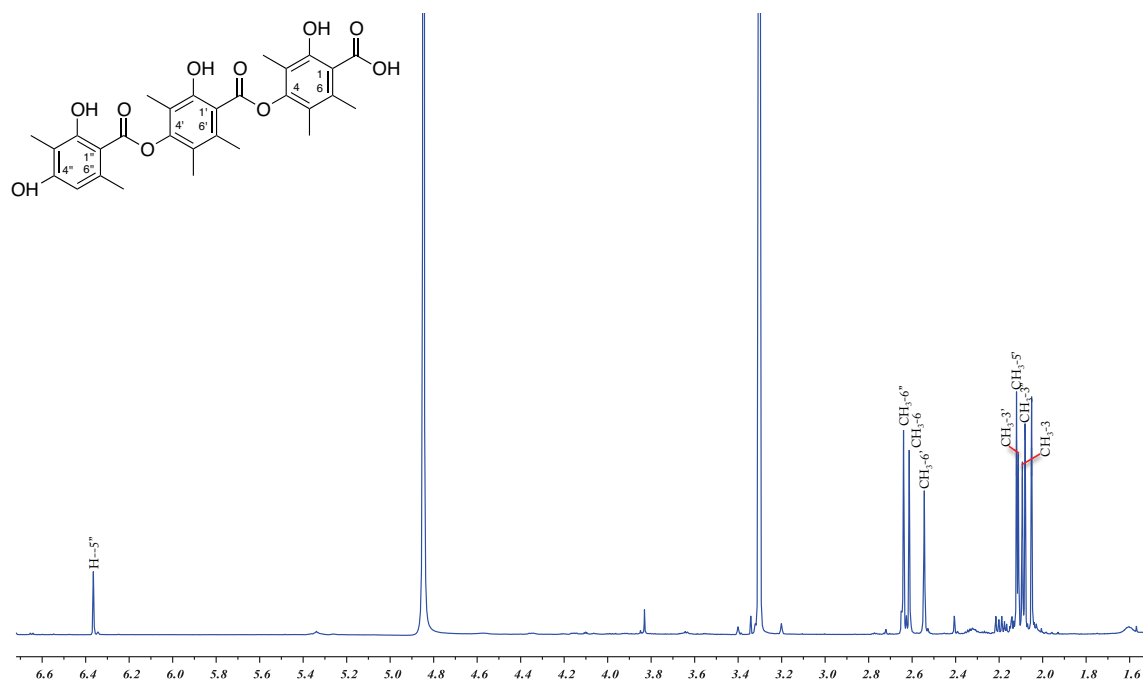


Figura AI-1. Espectro de ^1H -RMN de la thielavina A (171) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

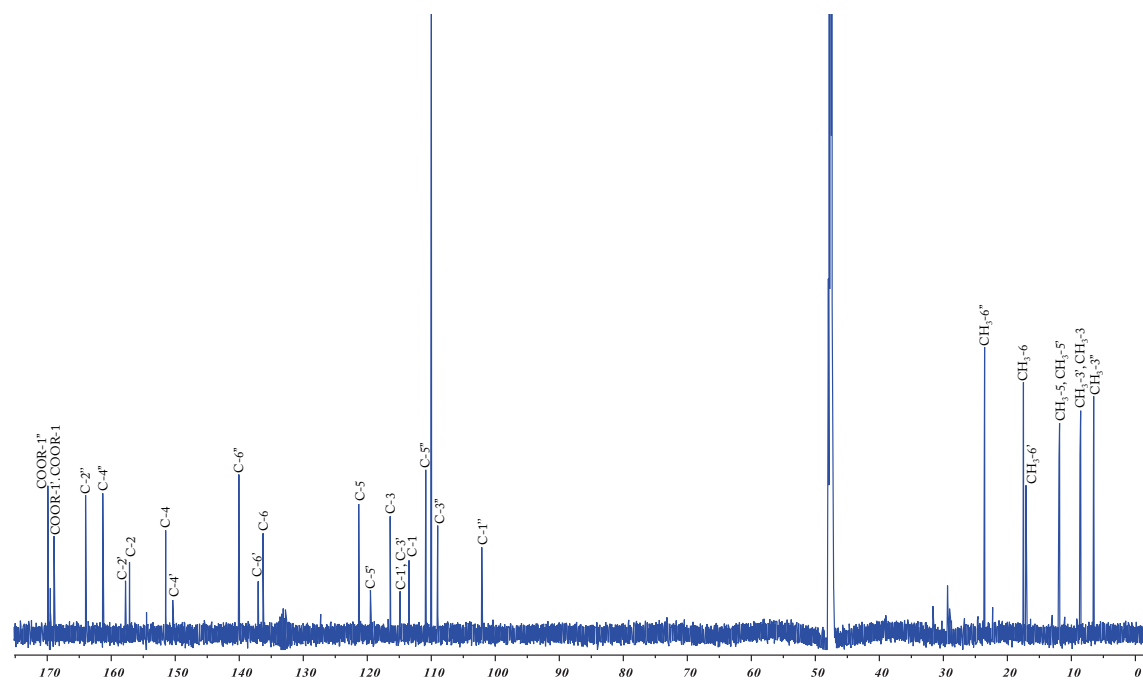


Figura AI-2. Espectro de ^{13}C -RMN de la thielavina A (171) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

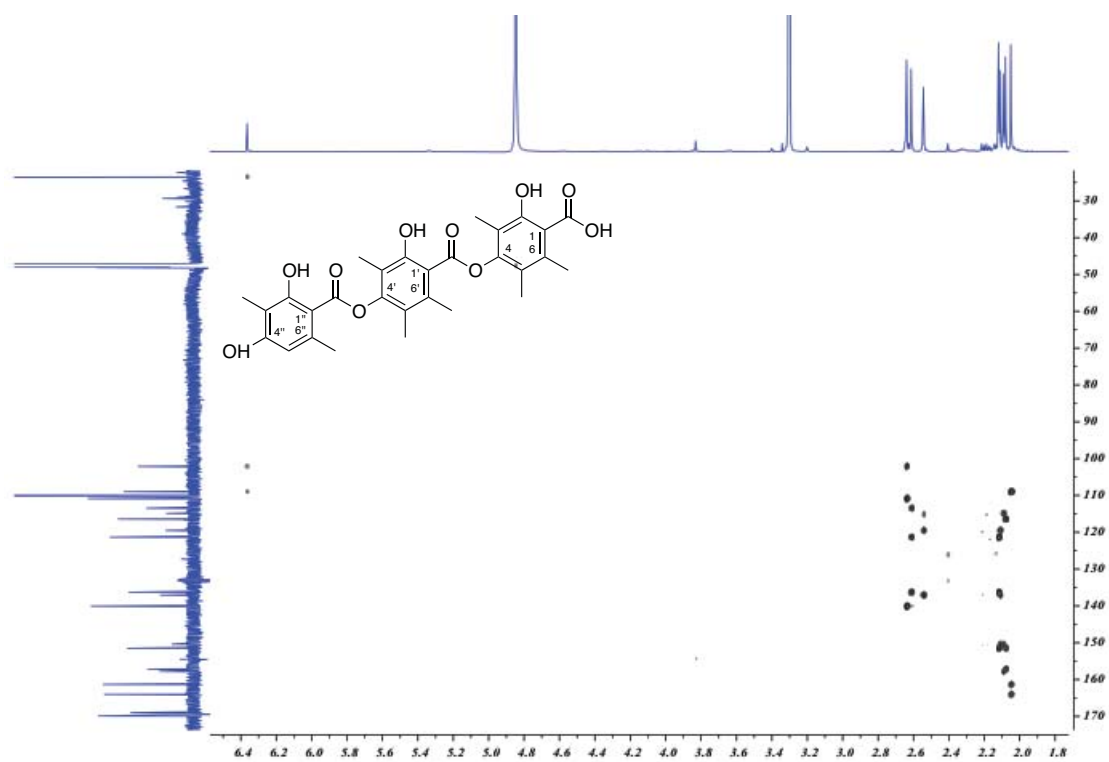


Figura AI-3. Espectro de HMBC de la thielavina A (171) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

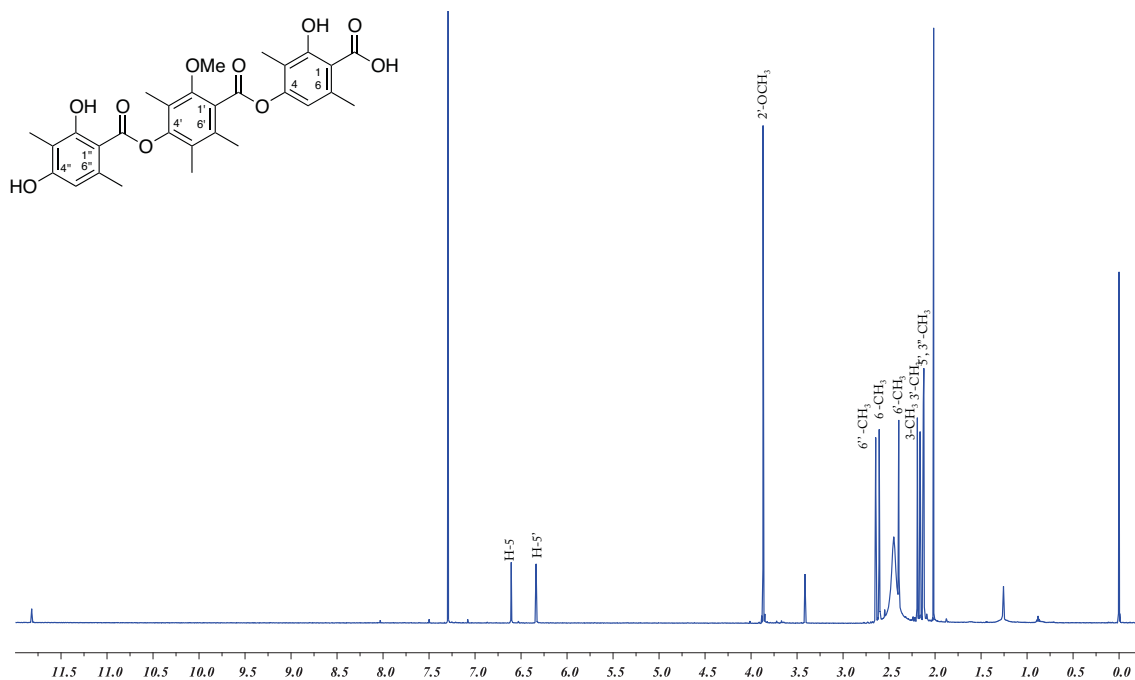


Figura AI-4. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la thielavina J (172) en CDCl_3 .

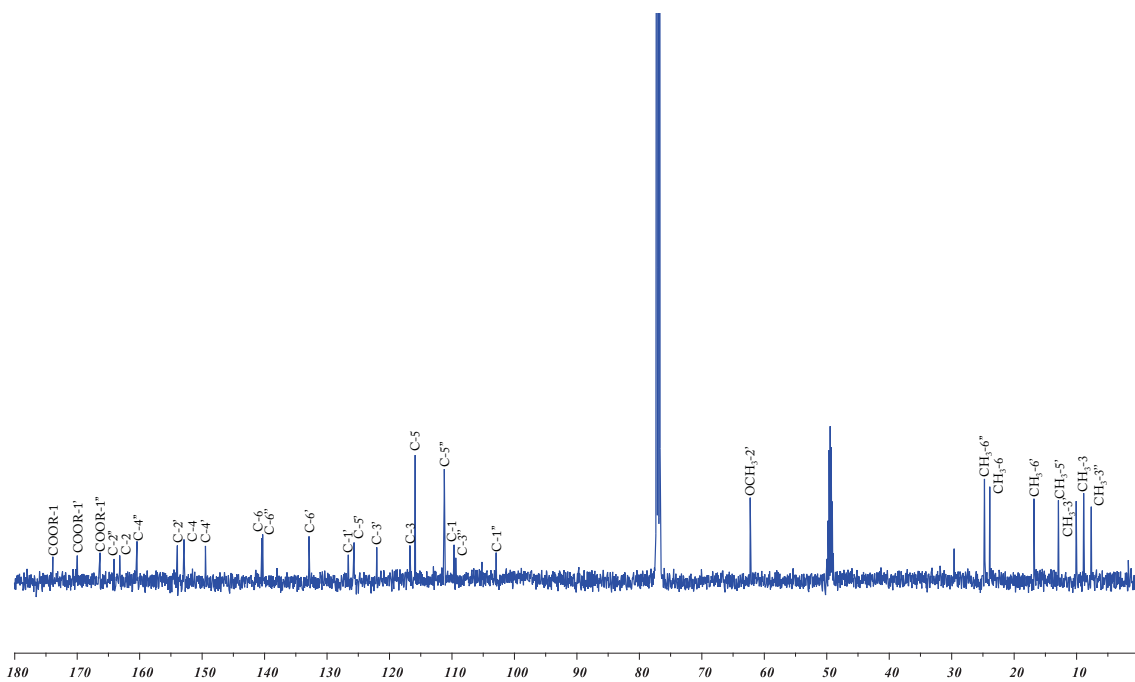
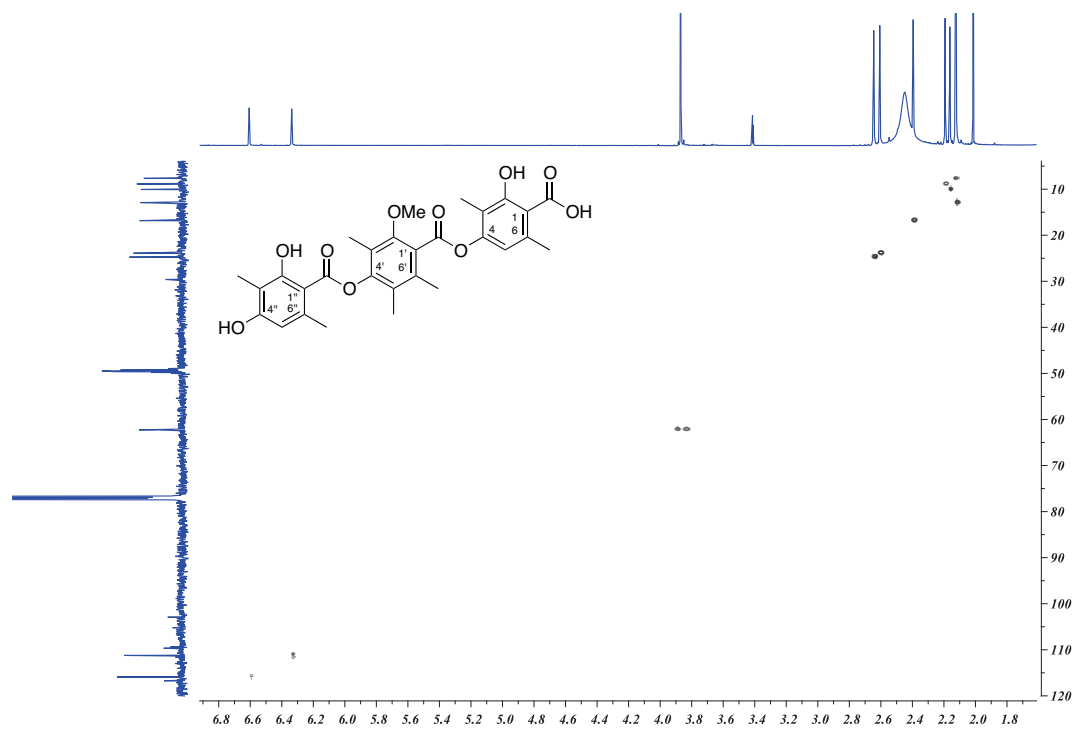
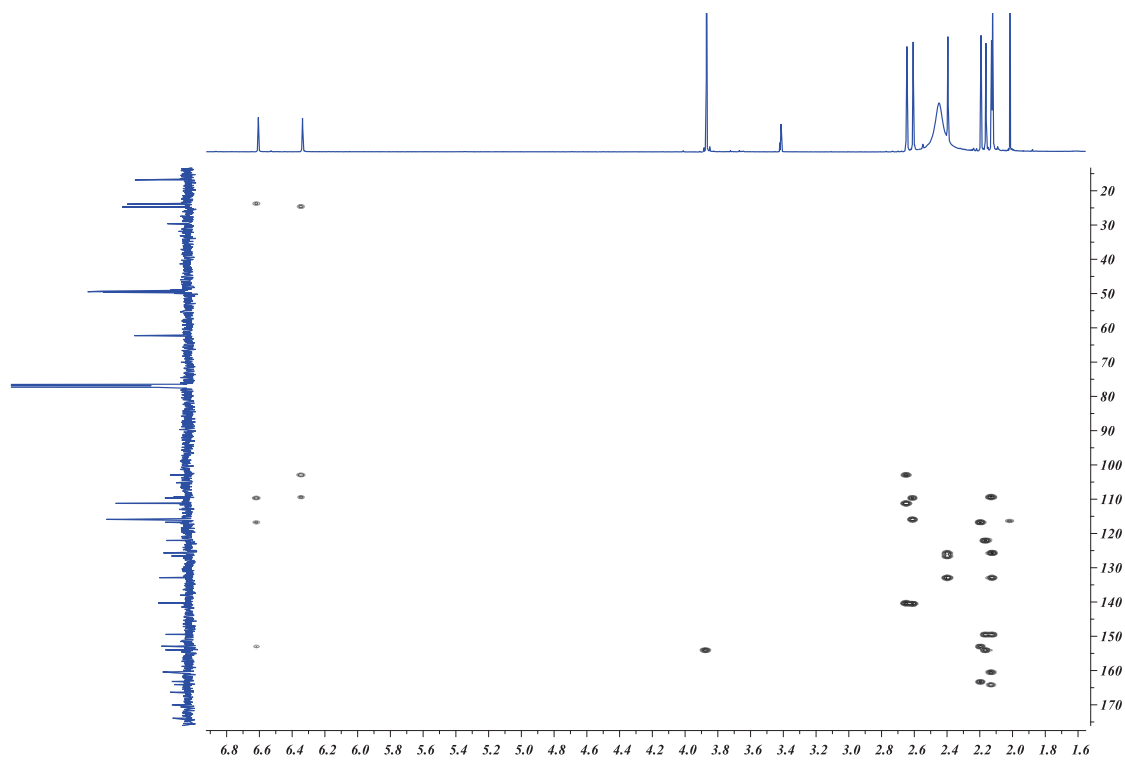


Figura AI-5. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ de la thielavina J (172) en CDCl_3 .

Figura AI-6. Espectro de HSQC de la thielavina J (172) en CDCl₃.Figura AI-7. Espectro de HMBC de la thielavina J (172) en CDCl₃.

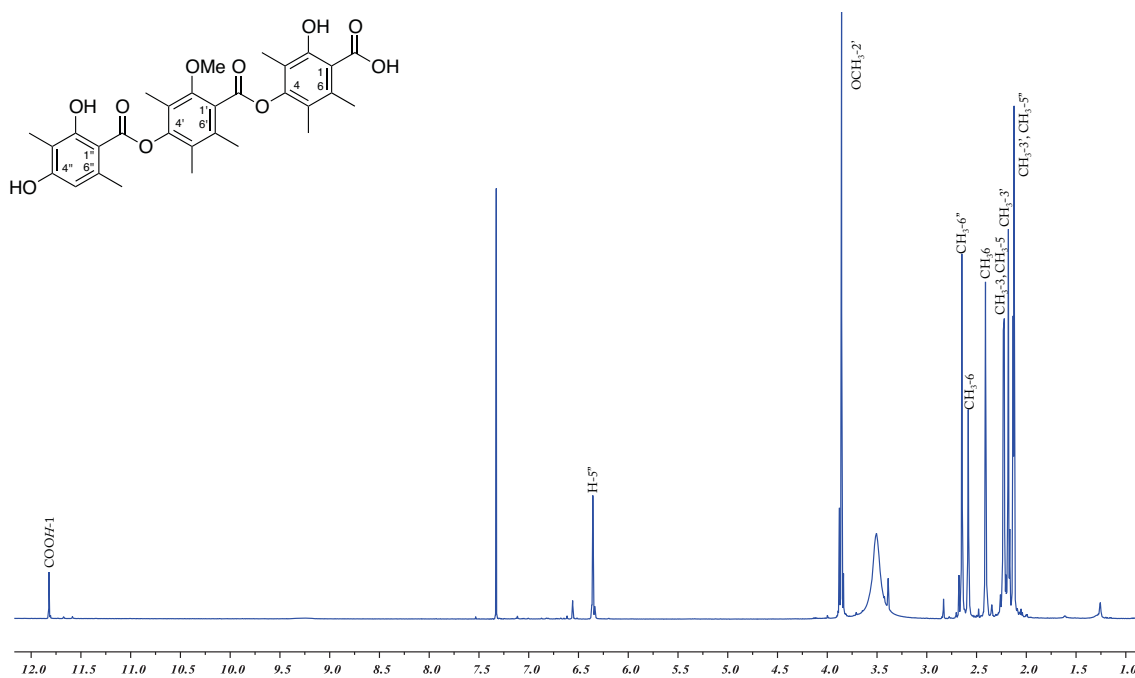


Figura AI-8. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH-}d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).

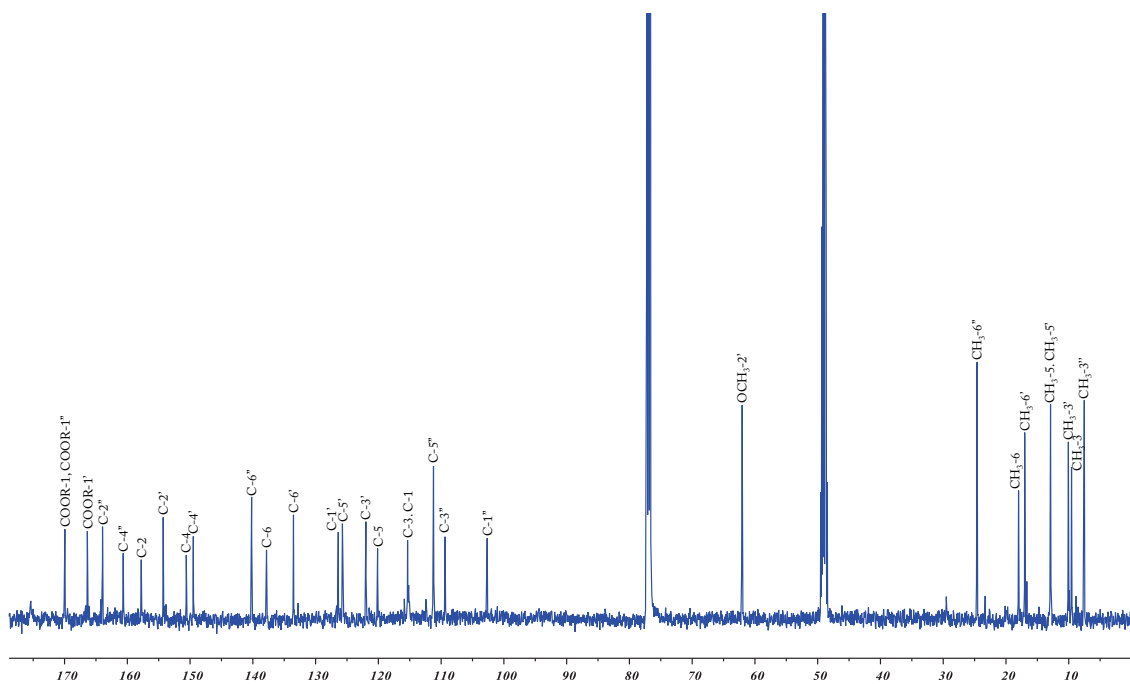


Figura AI-9. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH-}d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).

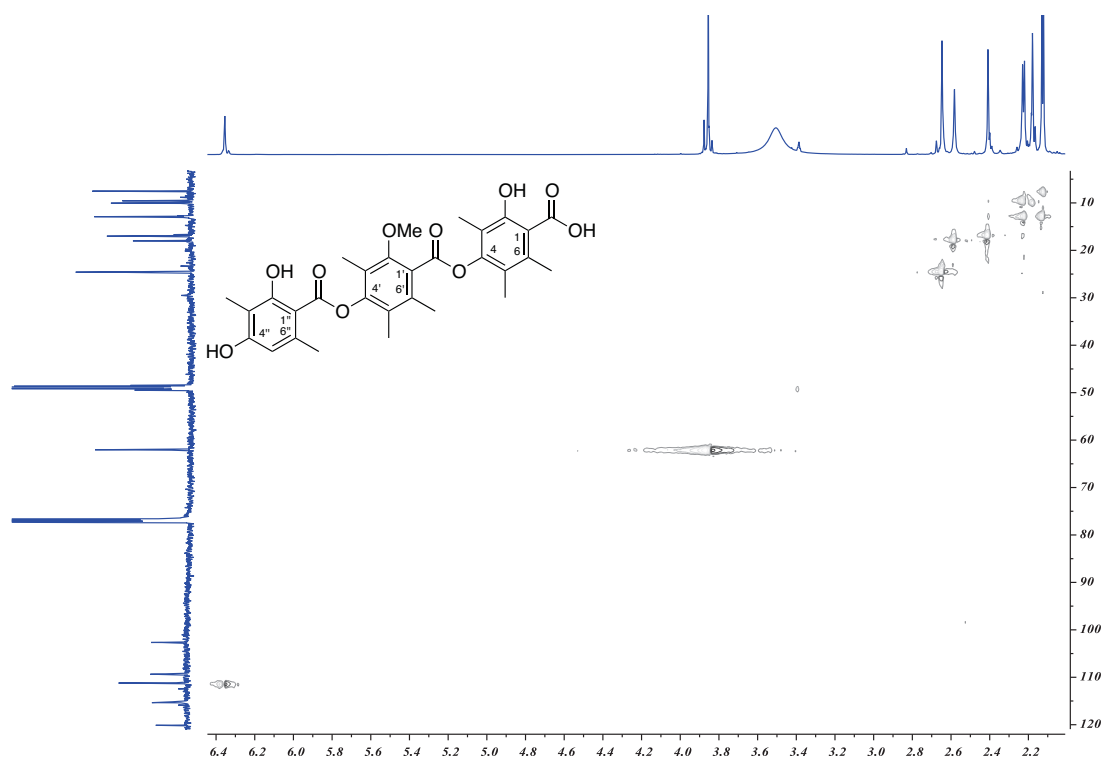


Figura AI-10. Espectro de HSQC de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).

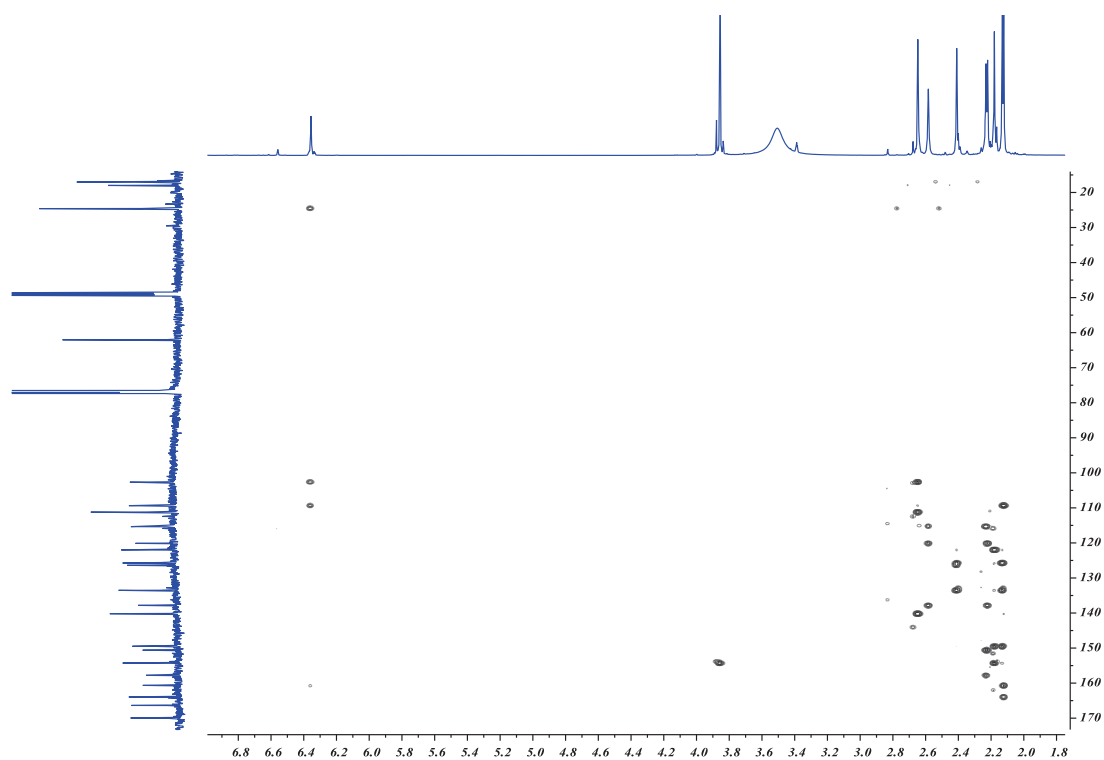


Figura AI-11. Espectro de HMC de la thielavina K (173) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4\text{-CDCl}_3$ (7:3).

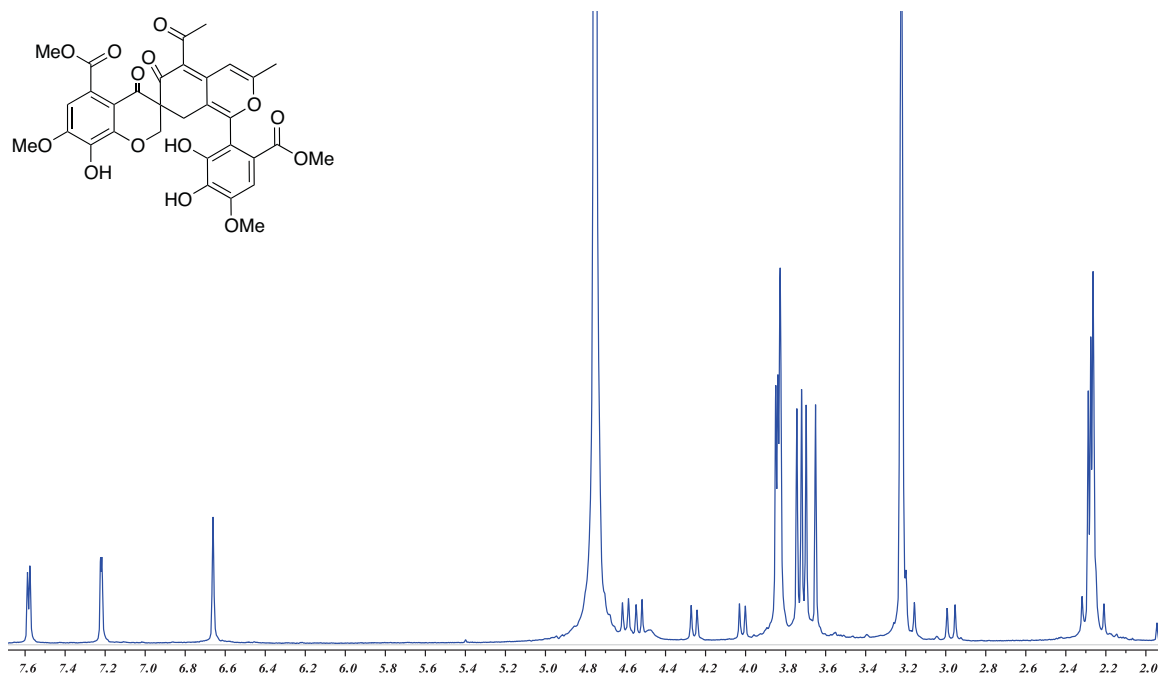


Figura AI-12. Espectro de ^1H -RMN de la fimetarona (174) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (mezcla de atropoisómeros *P/M*, 1:1).

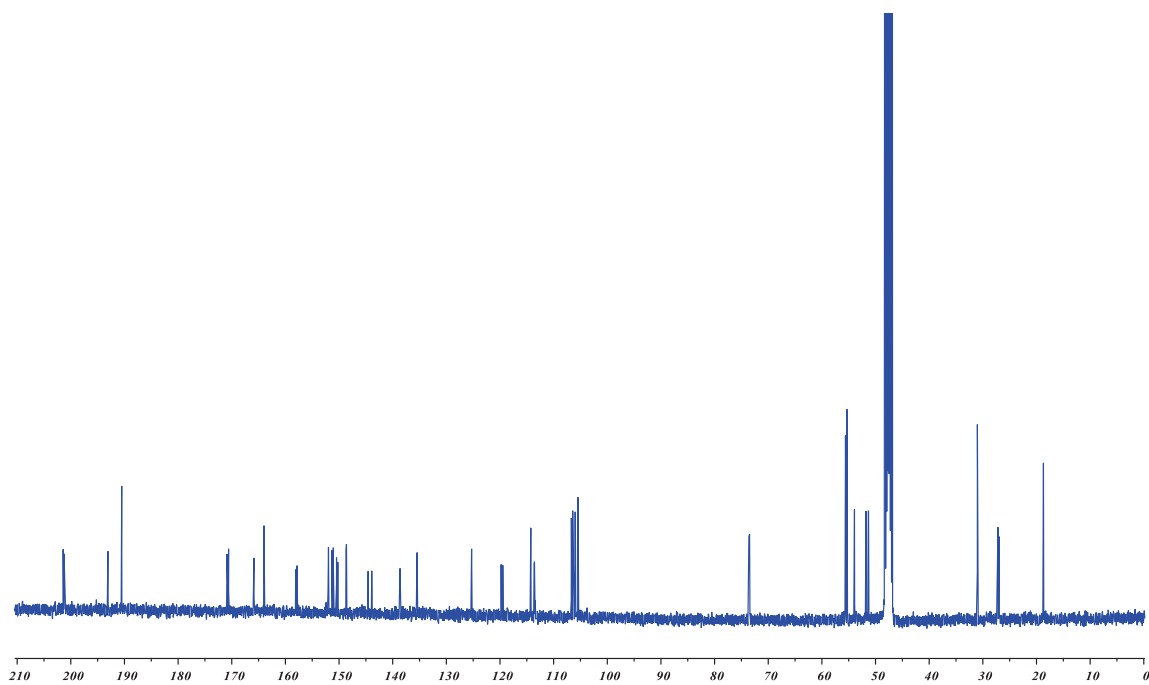


Figura AI-13. Espectro de ^{13}C -RMN de la fimetarona (174) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (mezcla de atropoisómeros *P/M*, 1:1).

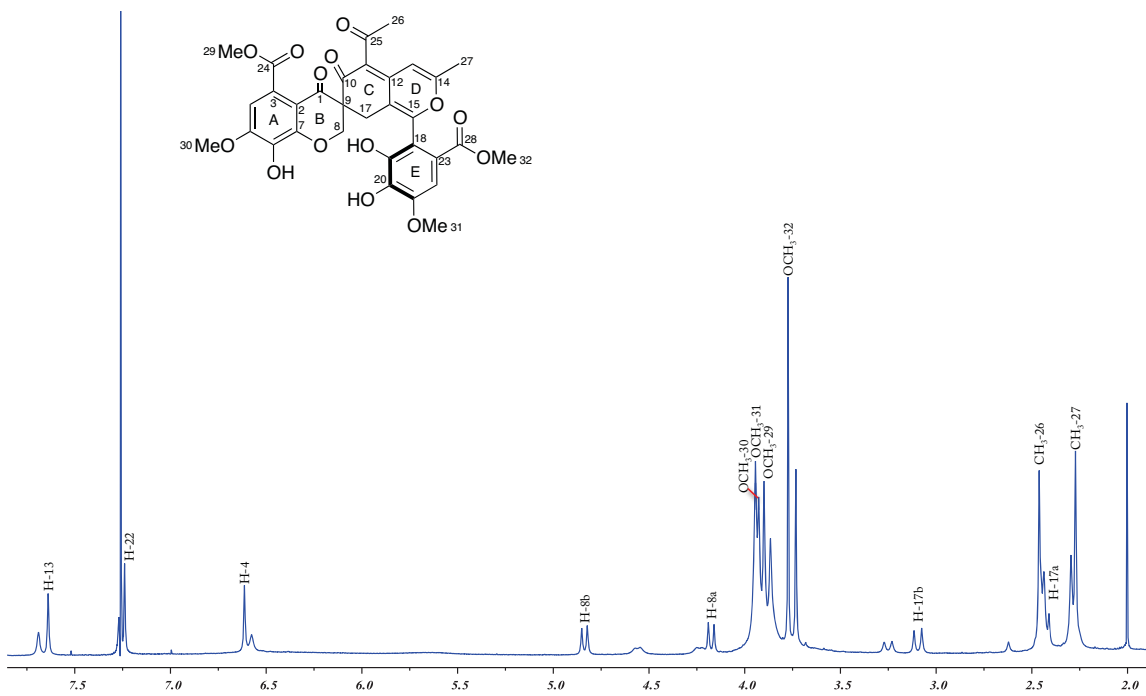


Figura AI-14. Espectro de ^1H -RMN de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros *P/M*, 7:3).

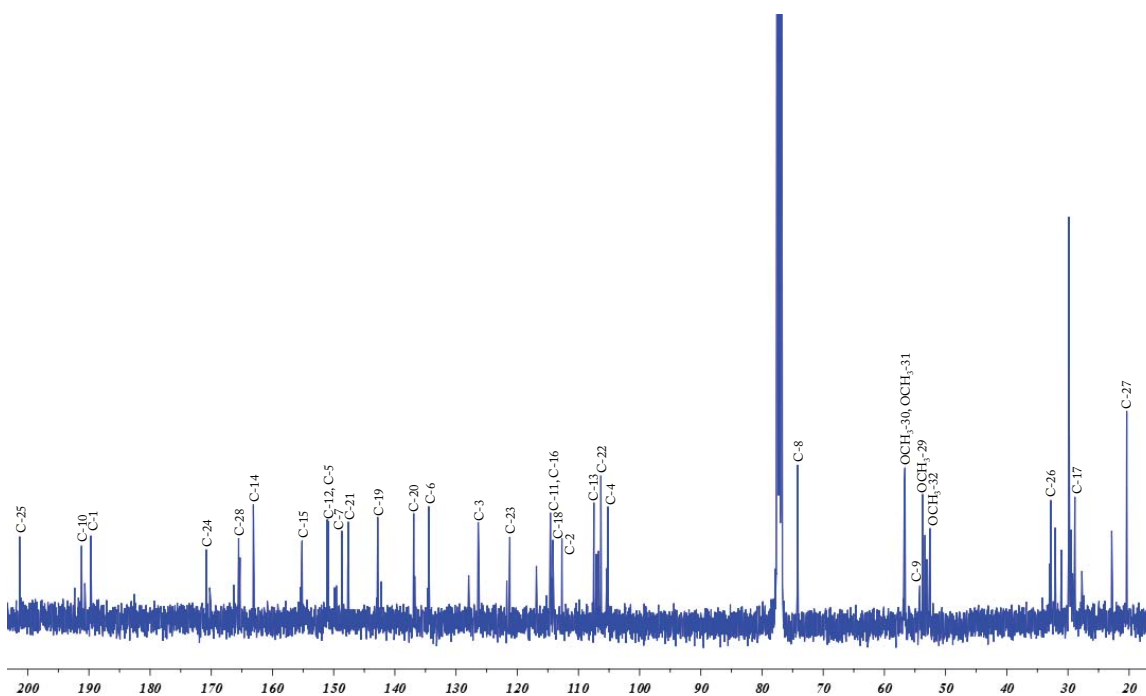


Figura AI-15. Espectro de ^{13}C -RMN de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros *P/M*, 7:3).

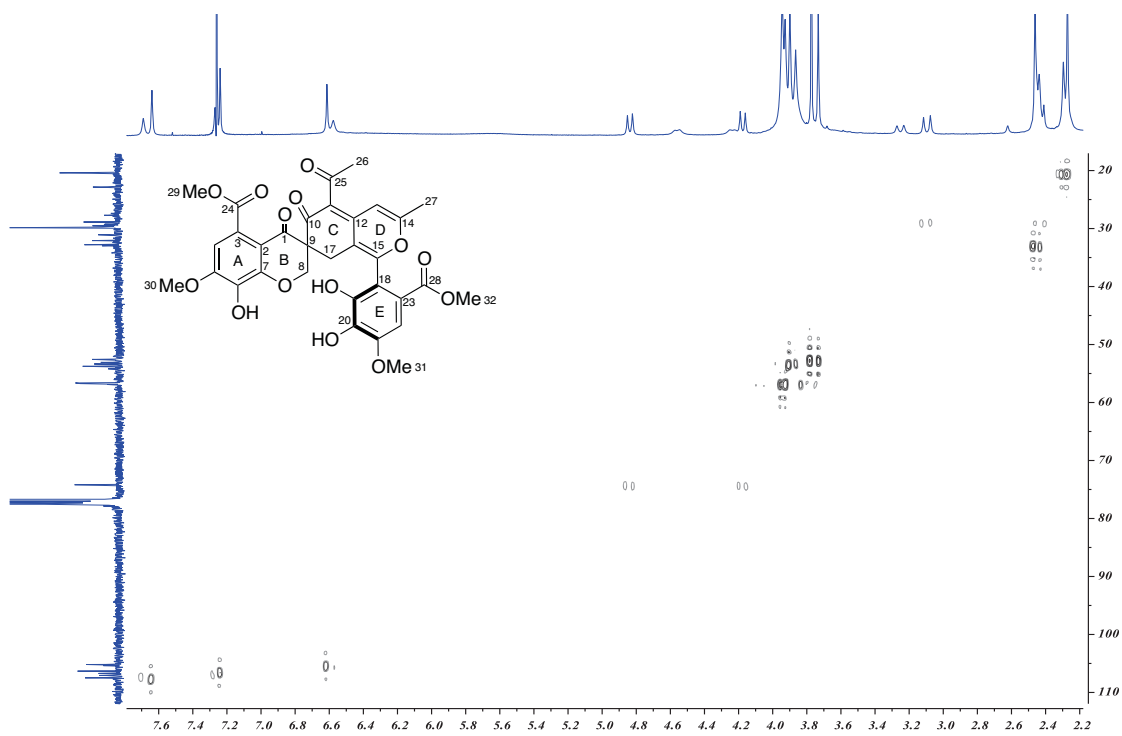


Figura AI-16. Espectro de HSQC de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros *P/M*, 7:3).

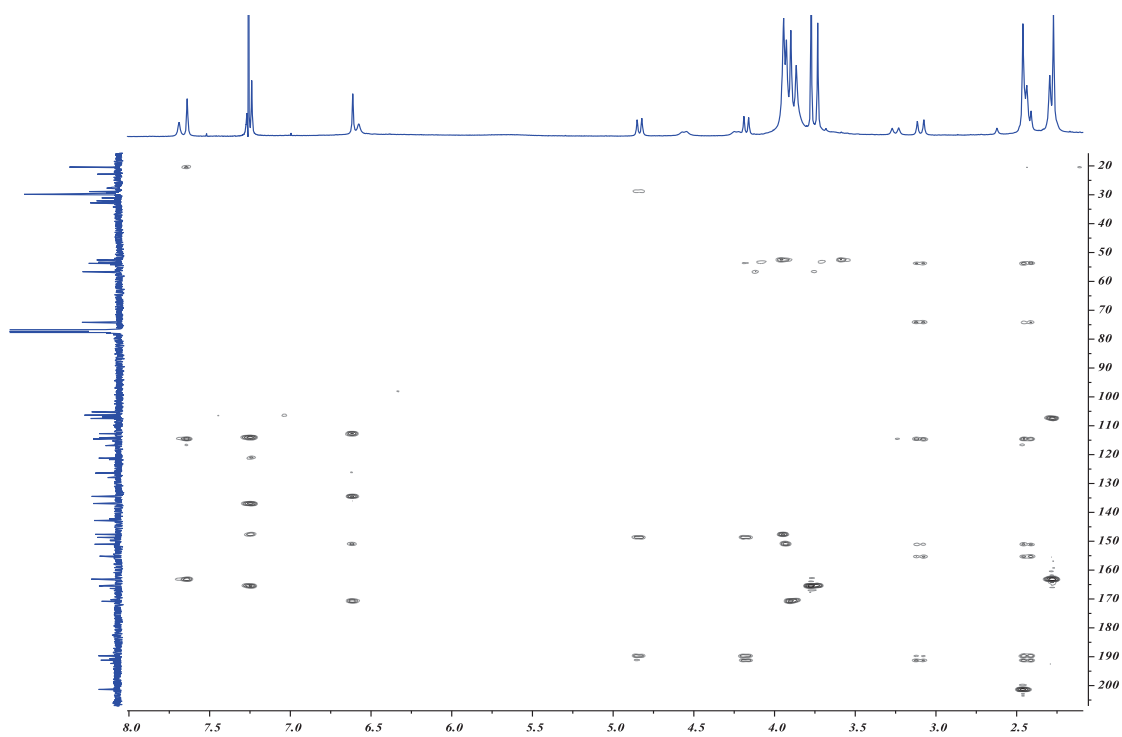


Figura AI-17. Espectro de HMBC de la fimetarona (174) en CDCl_3 (mezcla de atropoisómeros *P/M*, 7:3).

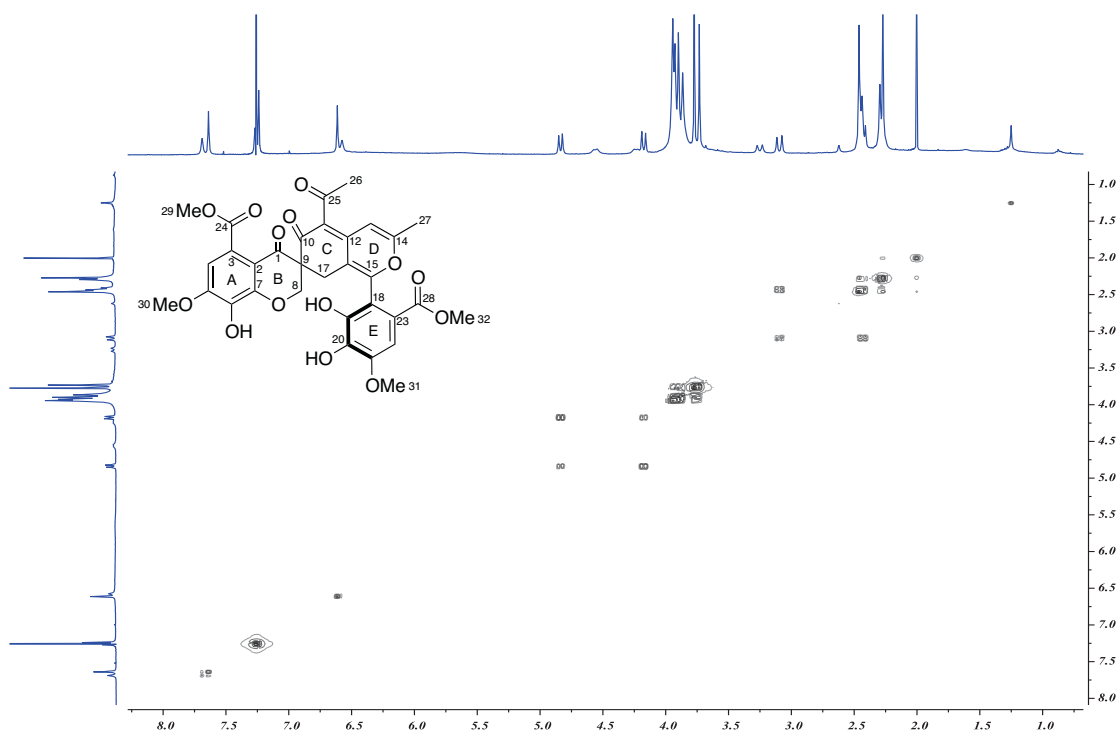


Figura AI-18. Espectro COSY de la fimetarona (174) en CDCl₃ (mezcla de atropisómeros *P/M*, 7:3).

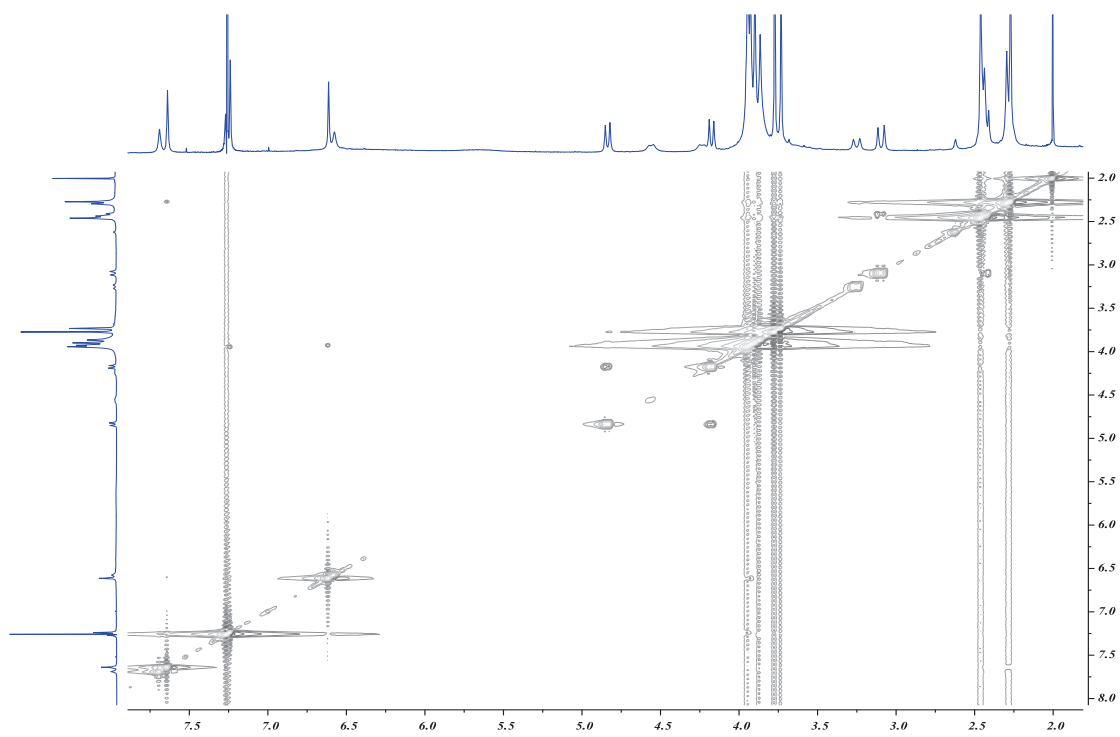


Figura AI-19. Espectro NOESY de la fimetarona (174) en CDCl₃ (mezcla de atropisómeros *P/M*, 7:3).

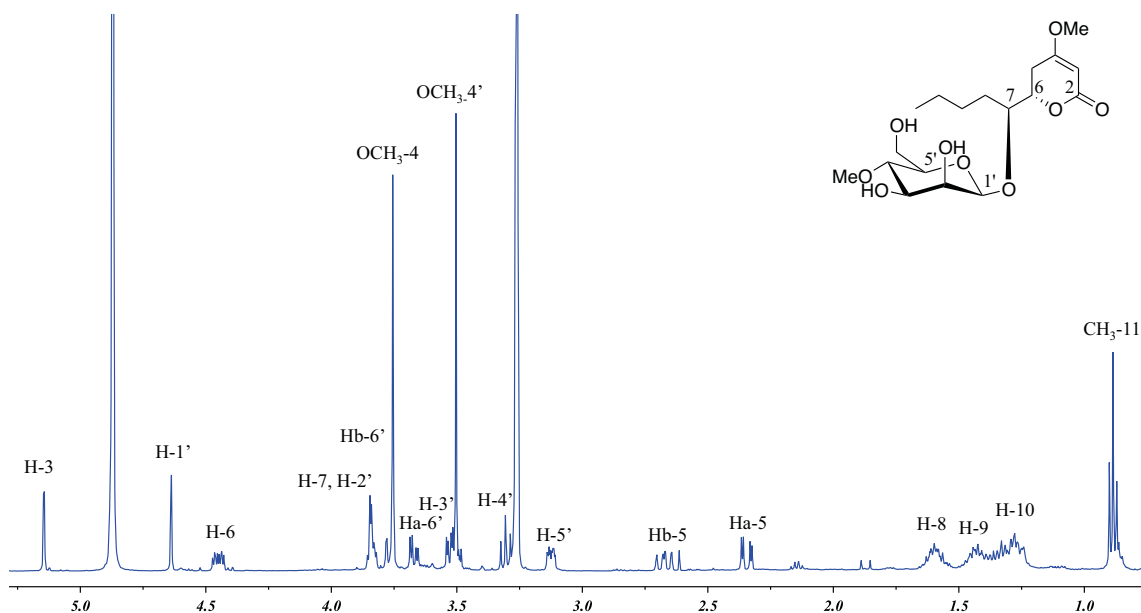


Figura AI-20. Espectro de ^1H -RMN del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

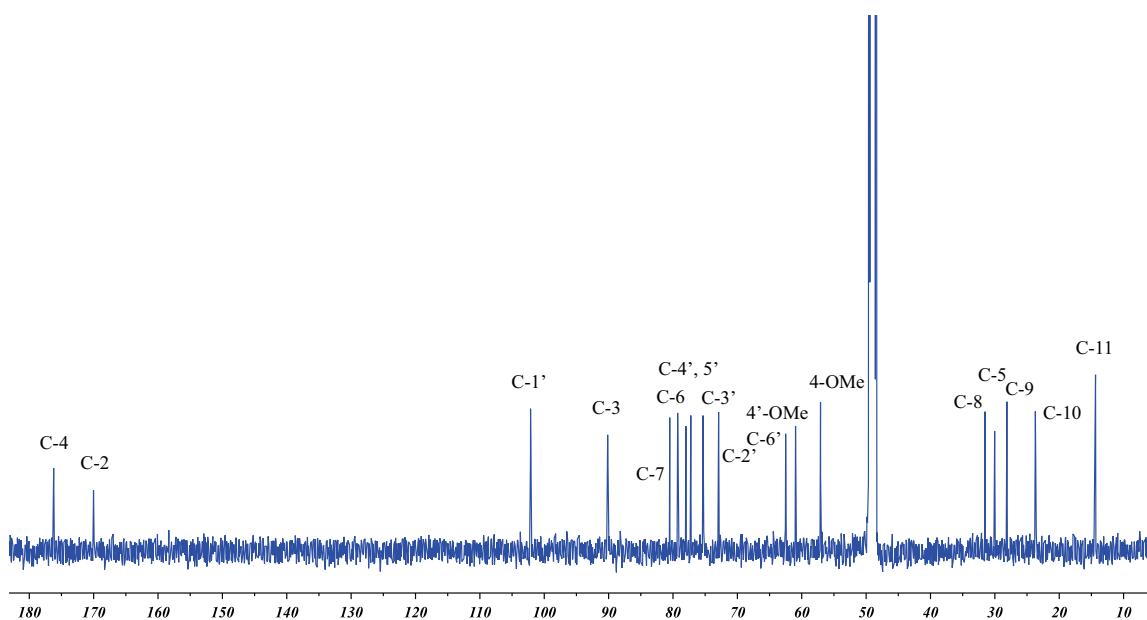


Figura AI-21. Espectro de ^{13}C -RMN del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

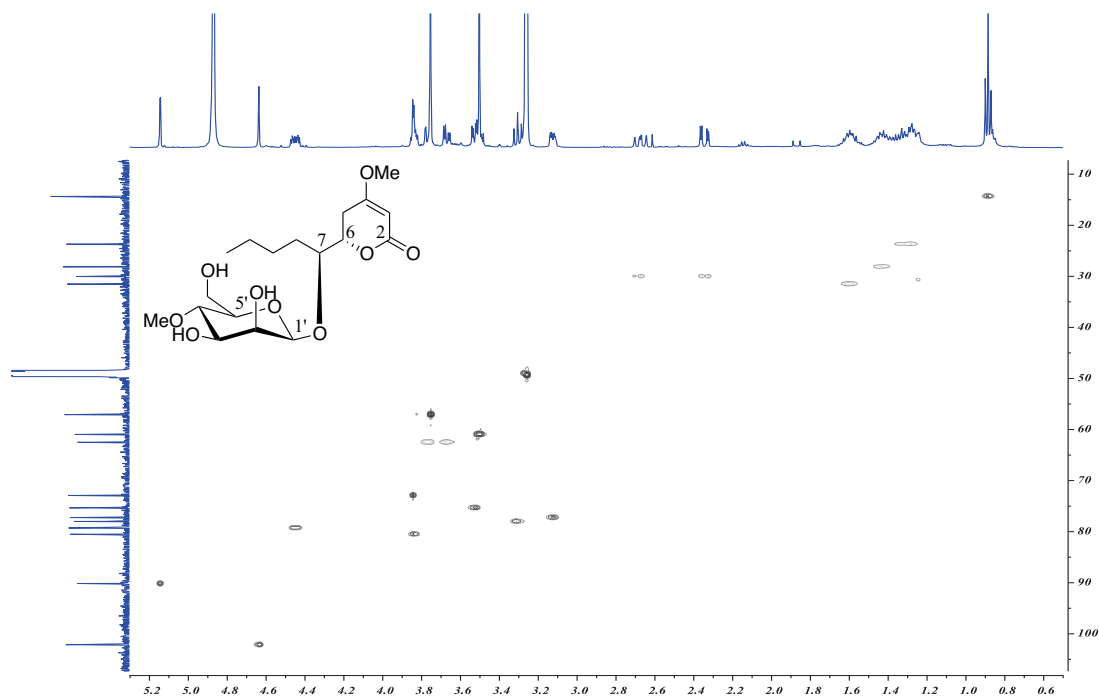


Figura AI-22. Espectro de HSQC del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

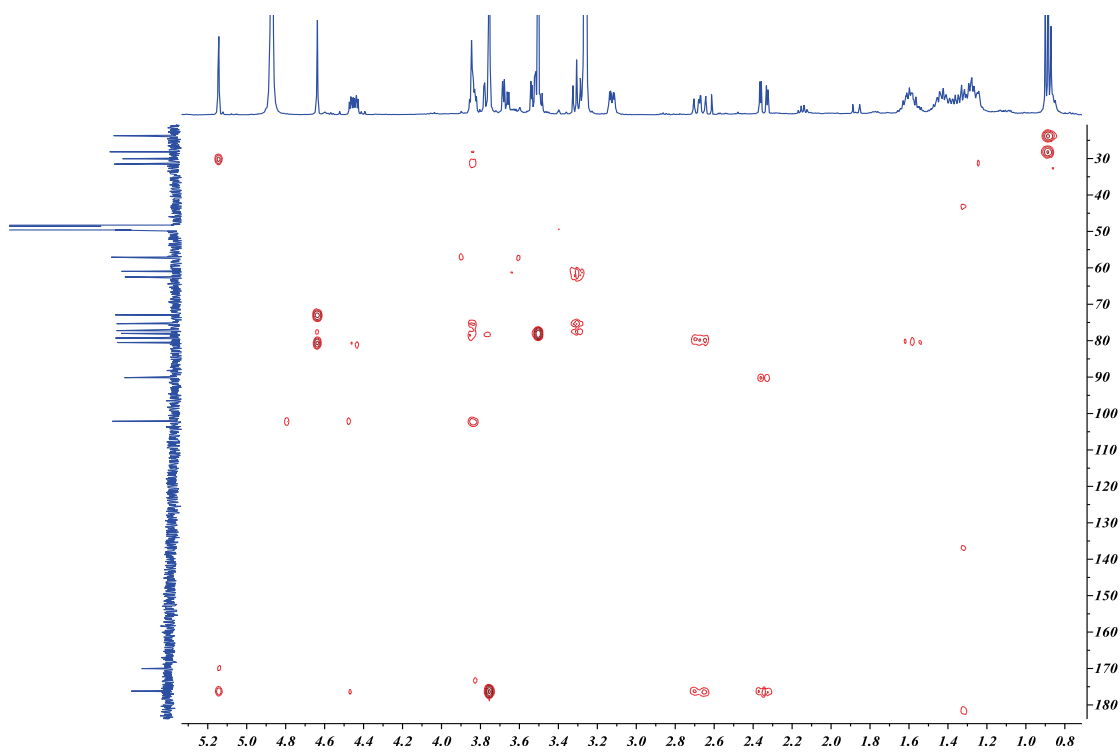


Figura AI-23. Espectro de HMBC del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

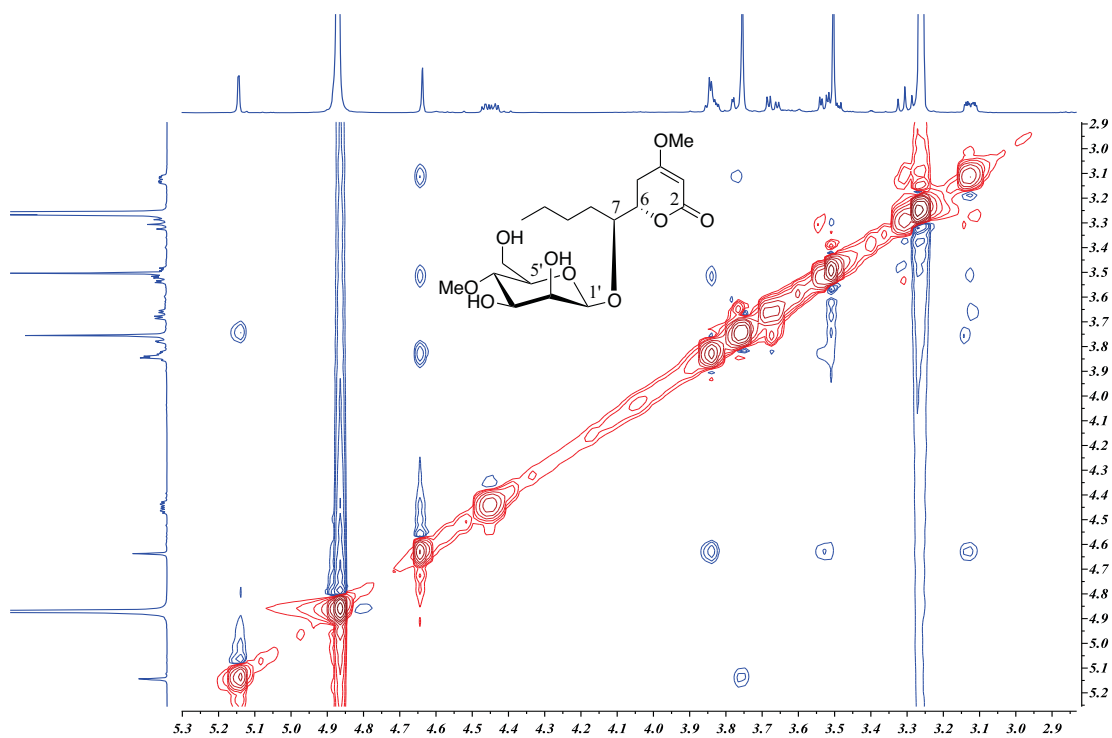


Figura AI-24. Espectro ROESY del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$.

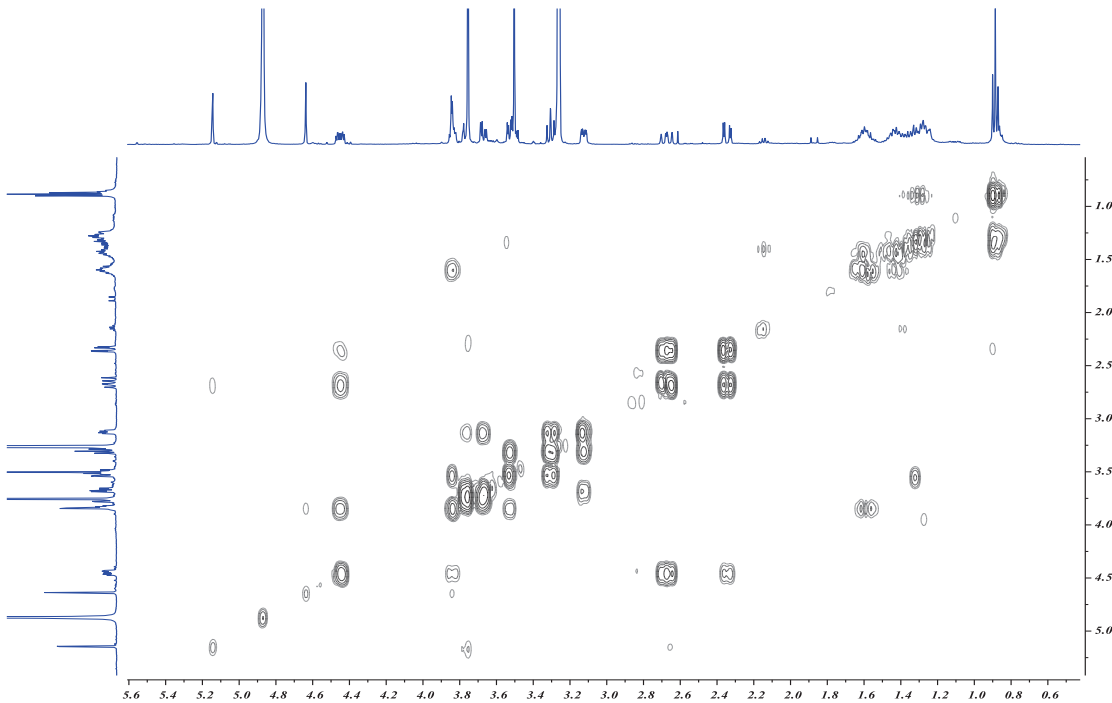
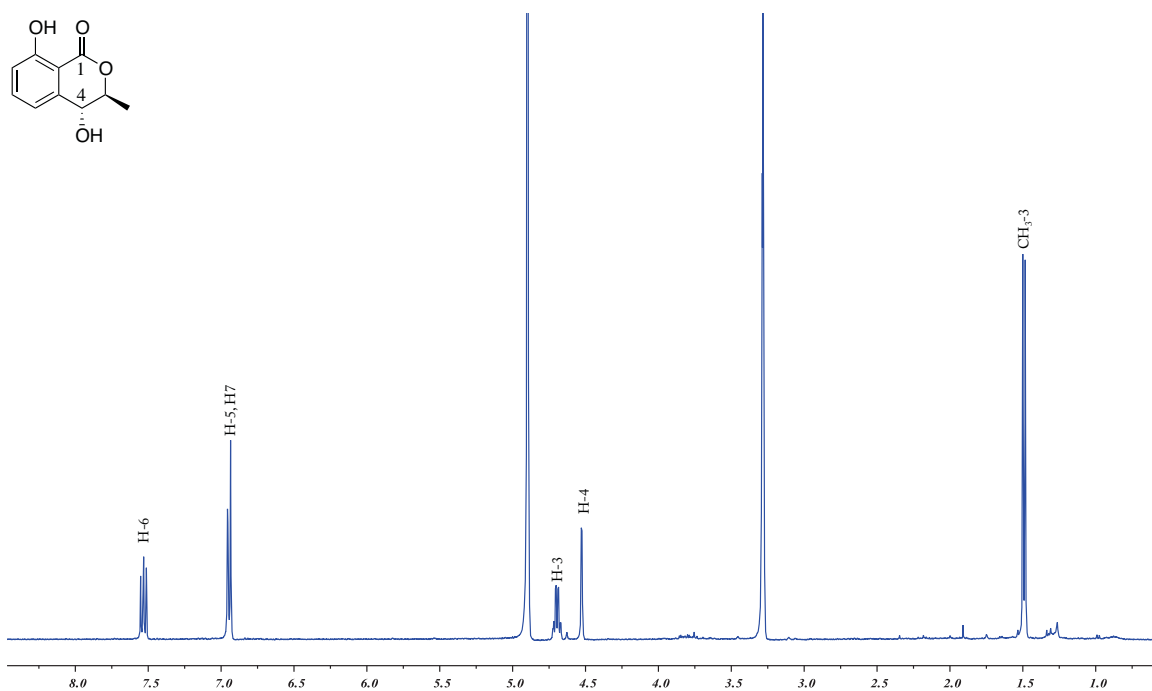
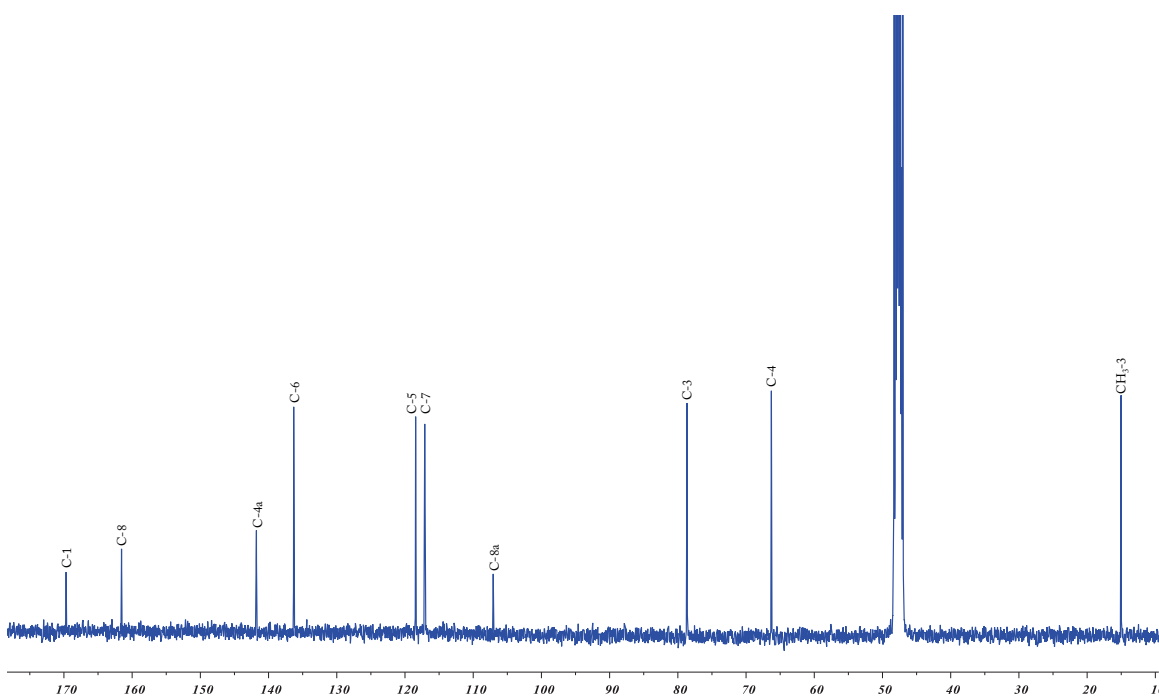


Figura AI-25. Espectro COSY del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$.

Figura AI-26. Espectro de ^1H -RMN de la 3*S*,4*R*-4-hidroxiemeleina (176) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.Figura AI-27. Espectro de ^{13}C -RMN de la 3*S*,4*R*-4-hidroxiemeleina (176) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

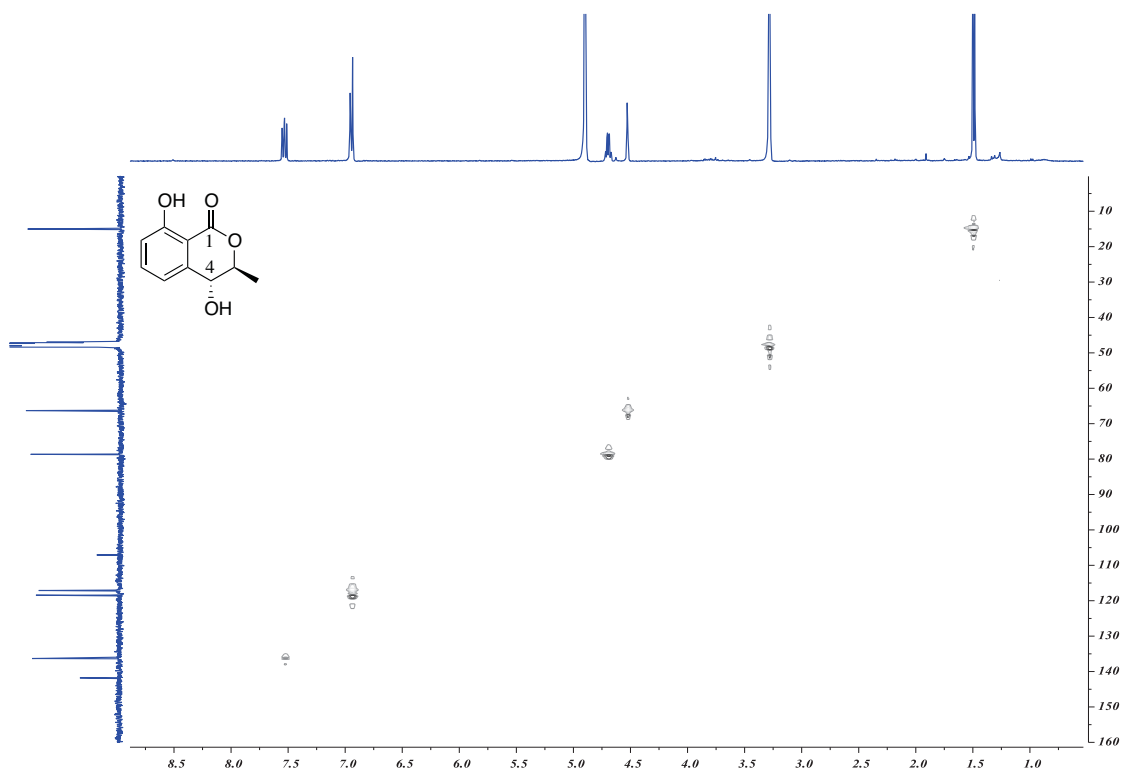


Figura AI-28. Espectro de HSQC de la 3*S*,4*R*-4-hidroximeleina (176) en CH₃OH-*d*₄.

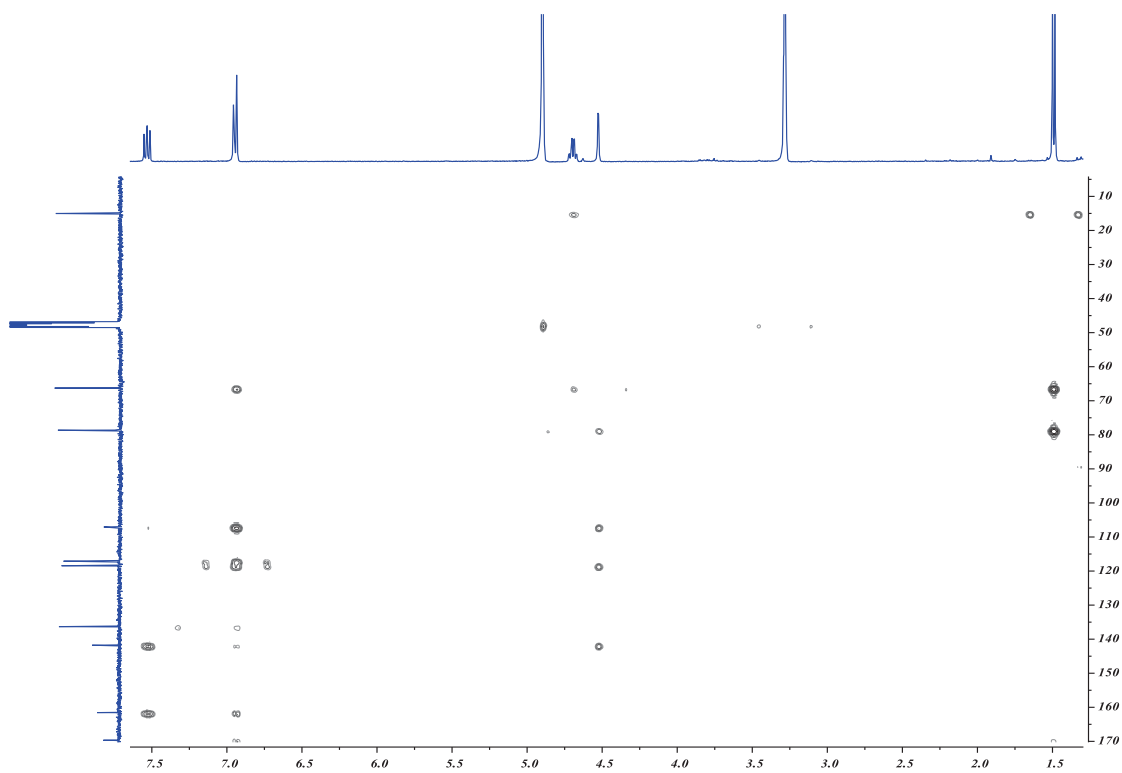


Figura AI-29. Espectro de HMBC de la 3*S*,4*R*-4-hidroximeleina (176) en CH₃OH-*d*₄.

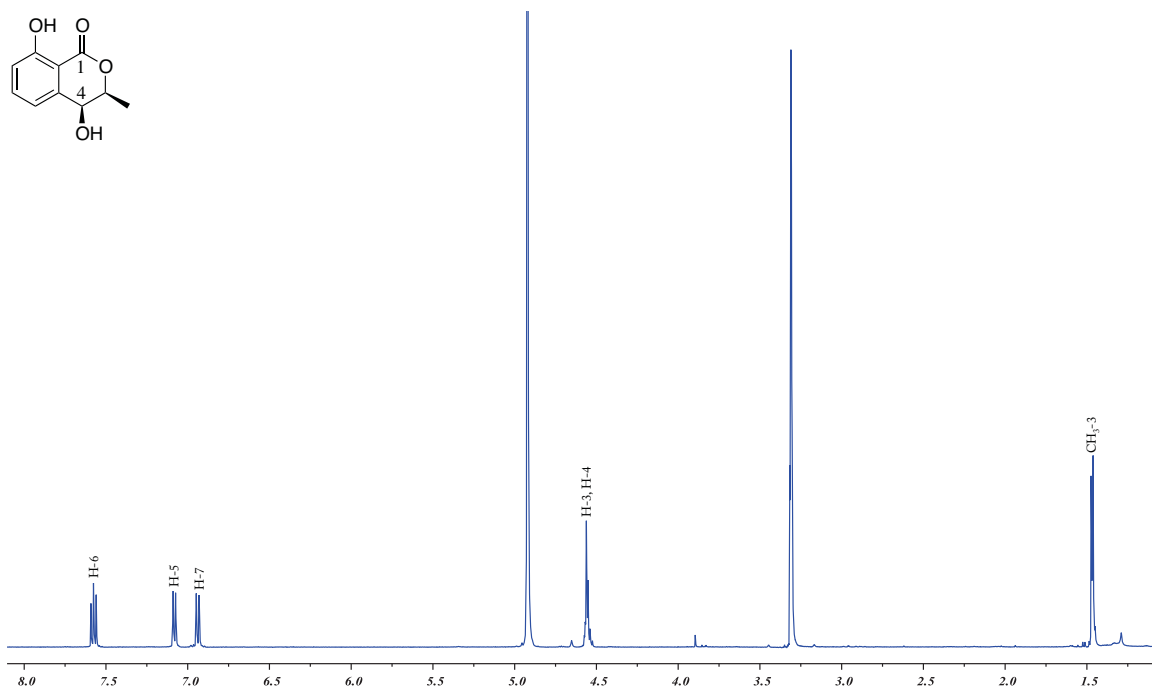


Figura AI-30. Espectro de ¹H-RMN de la 3*S*,4*S*-4-hidroxiemeleina (177) en CH₃OH-*d*₄.

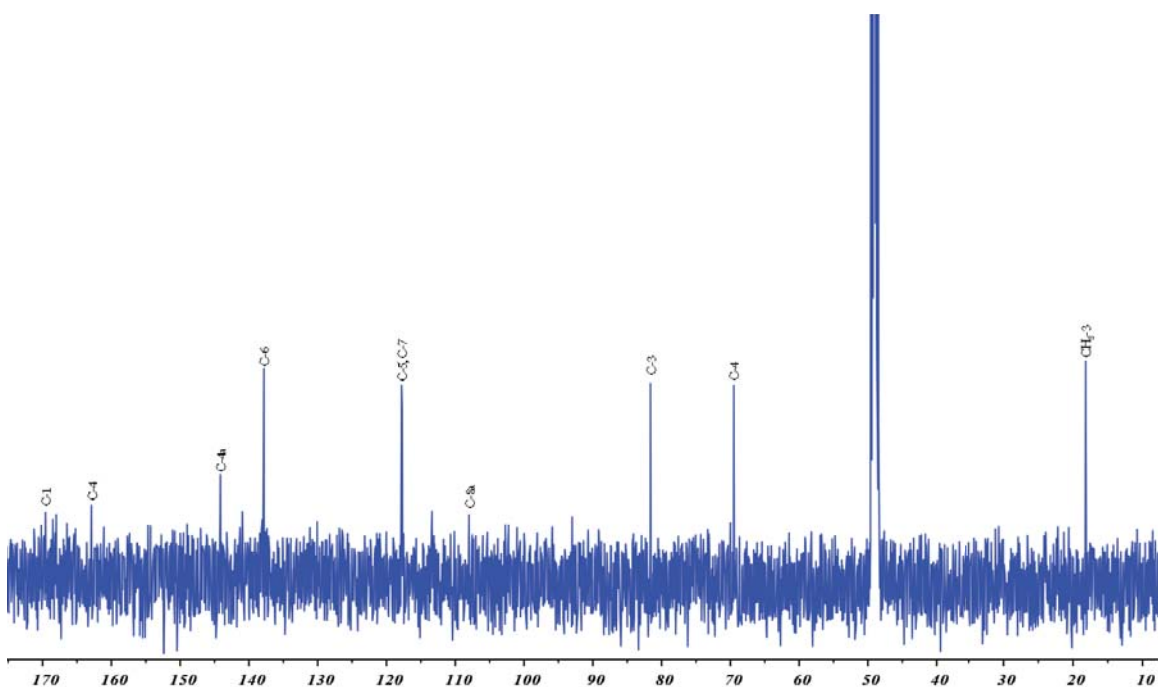
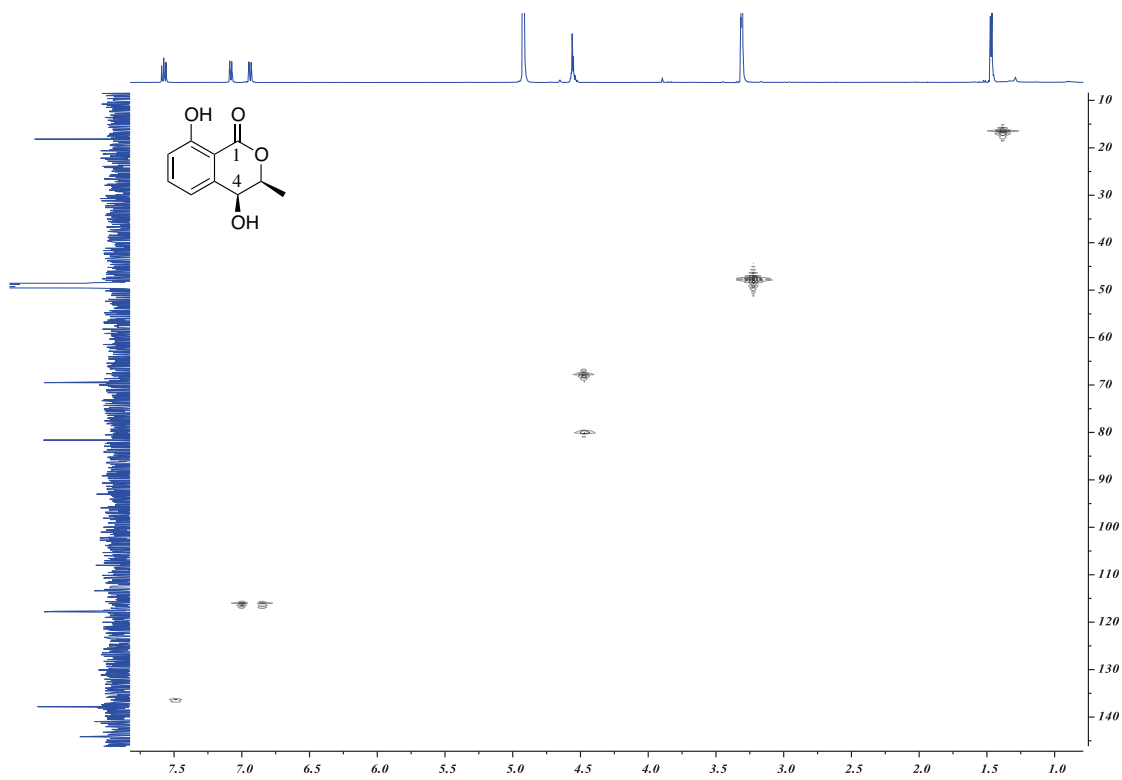
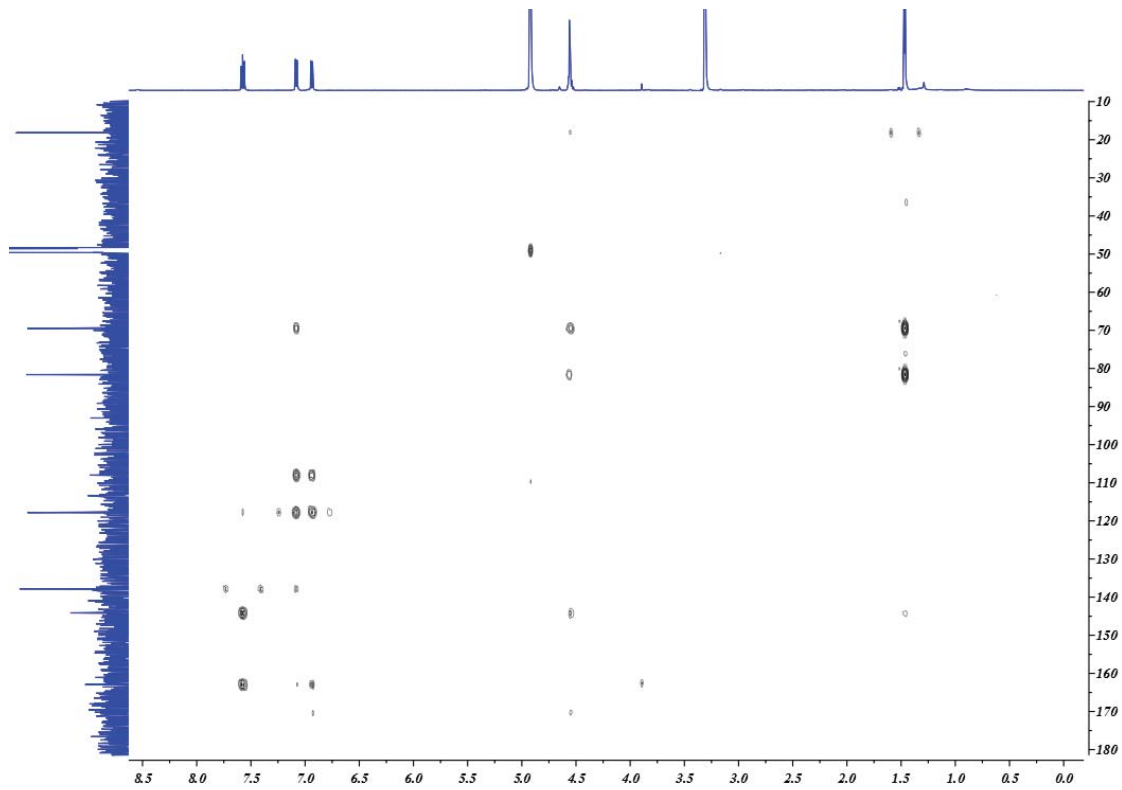


Figura AI-31. Espectro de ¹³C-RMN de la 3*S*,4*S*-4-hidroxiemeleina (177) en CH₃OH-*d*₄.

Figura AI-32. Espectro de HSQC de la 3S,4S-4-hidroximeleina (177) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.Figura AI-33. Espectro de HMBC de la 3S,4S-4-hidroximeleina (177) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

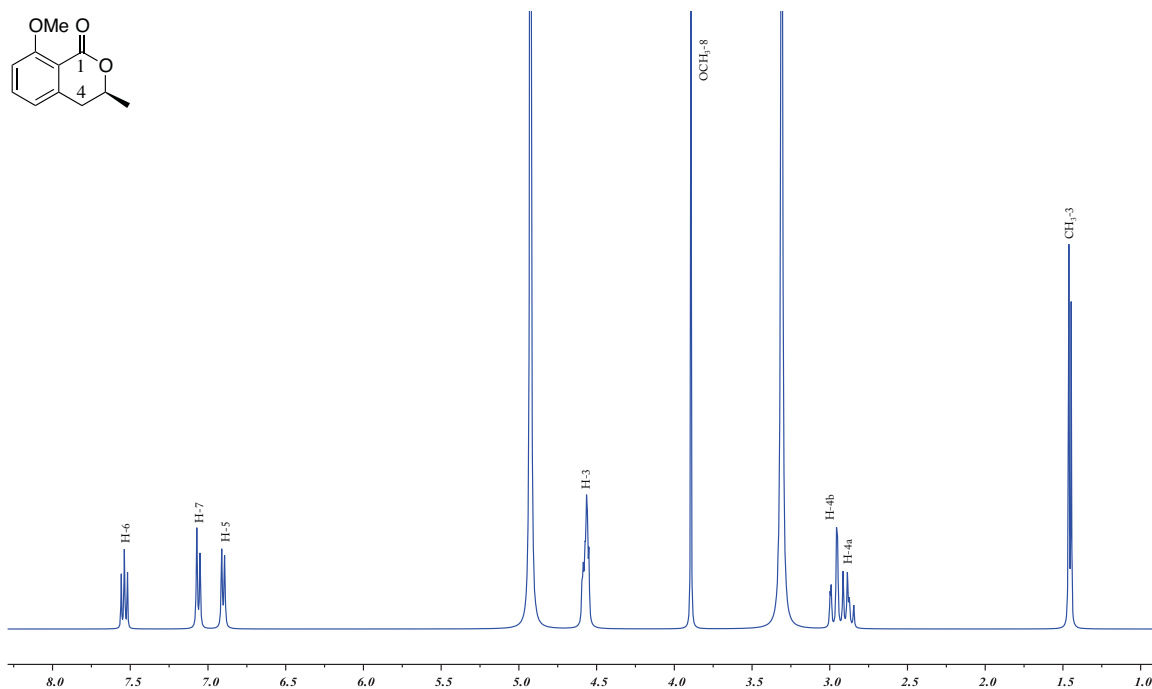


Figura AI-34. Espectro de ^1H -RMN de la 3*S*-8-metoximeleina (178) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

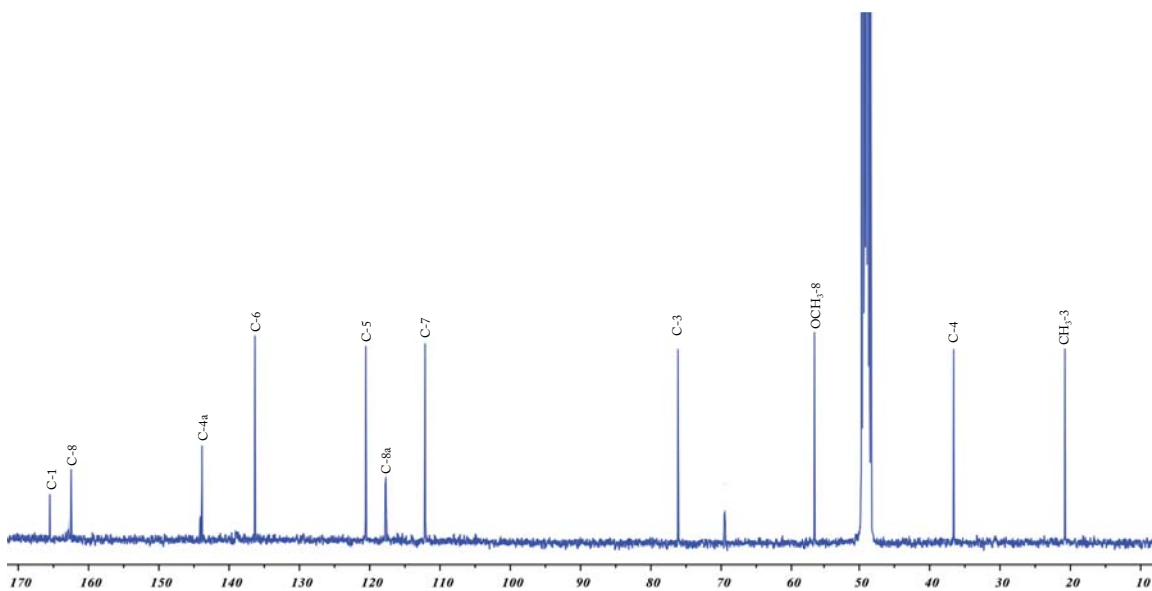


Figura AI-35. Espectro de ^{13}C -RMN de la 3*S*-8-metoximeleina (178) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

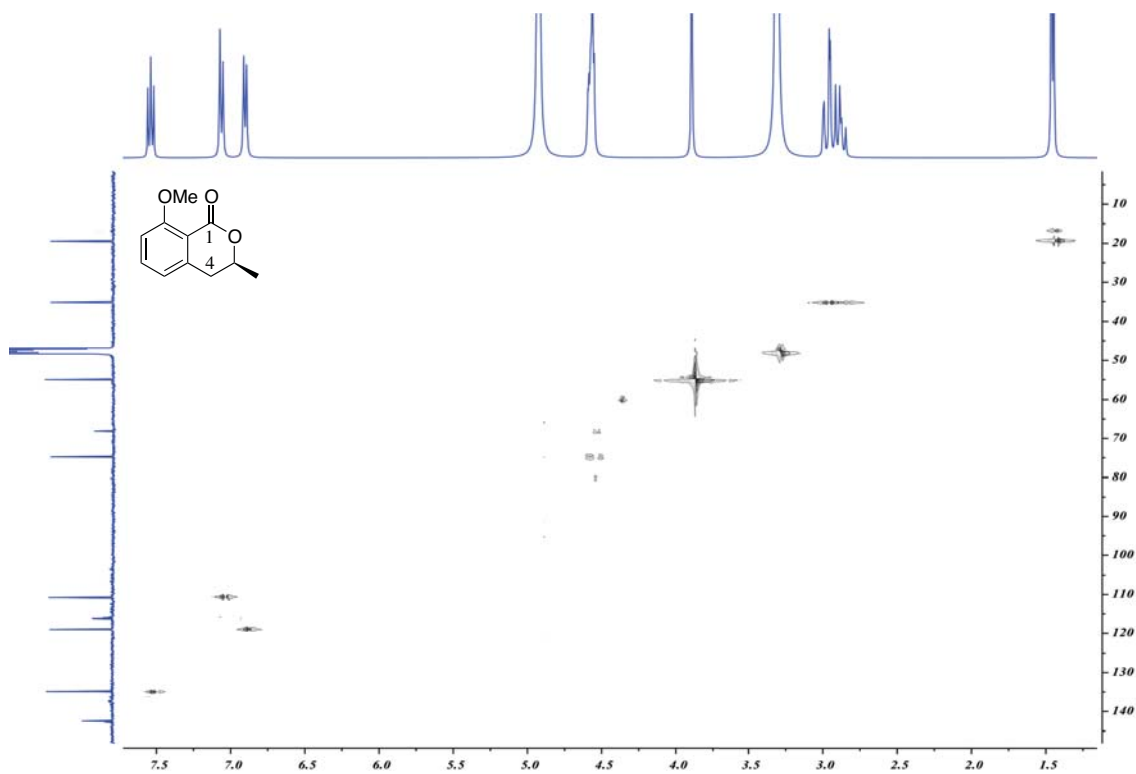


Figura AI-36. Espectro de HSQC de la 3S-8-metoximeleina (178) en CH₃OH-*d*₄.

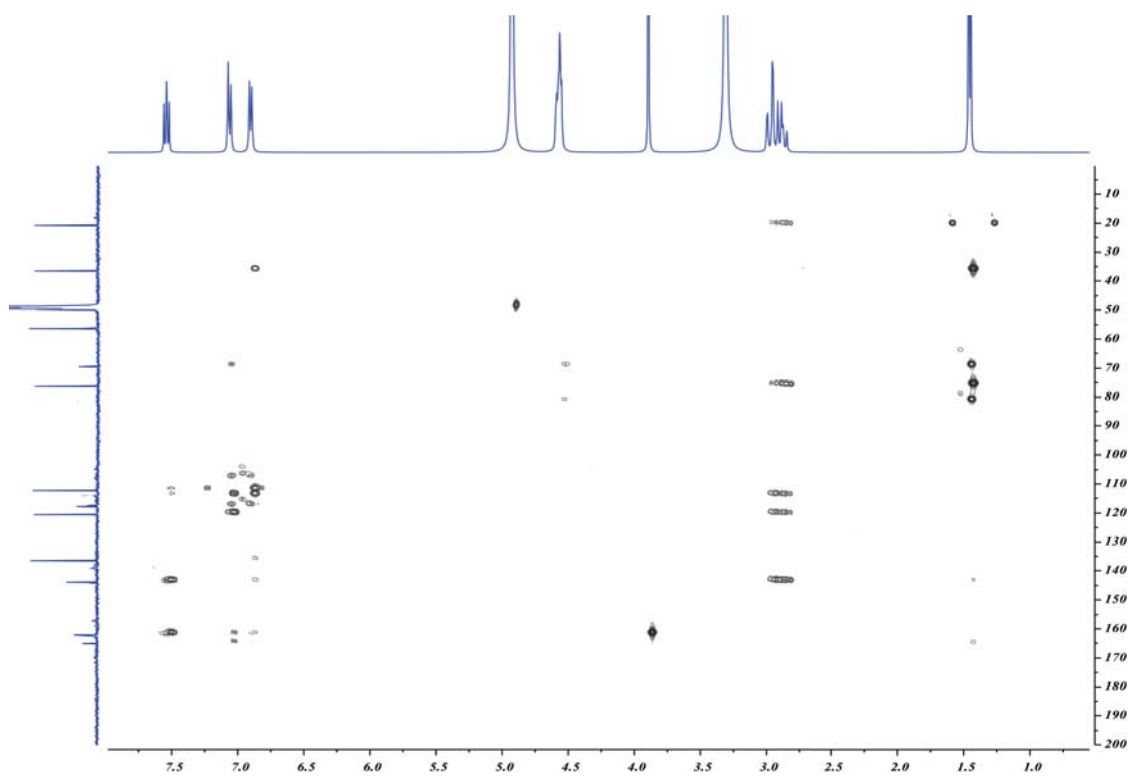


Figura AI-37. Espectro de HMBC de la 3S-8-metoximeleina (178) en CH₃OH-*d*₄.

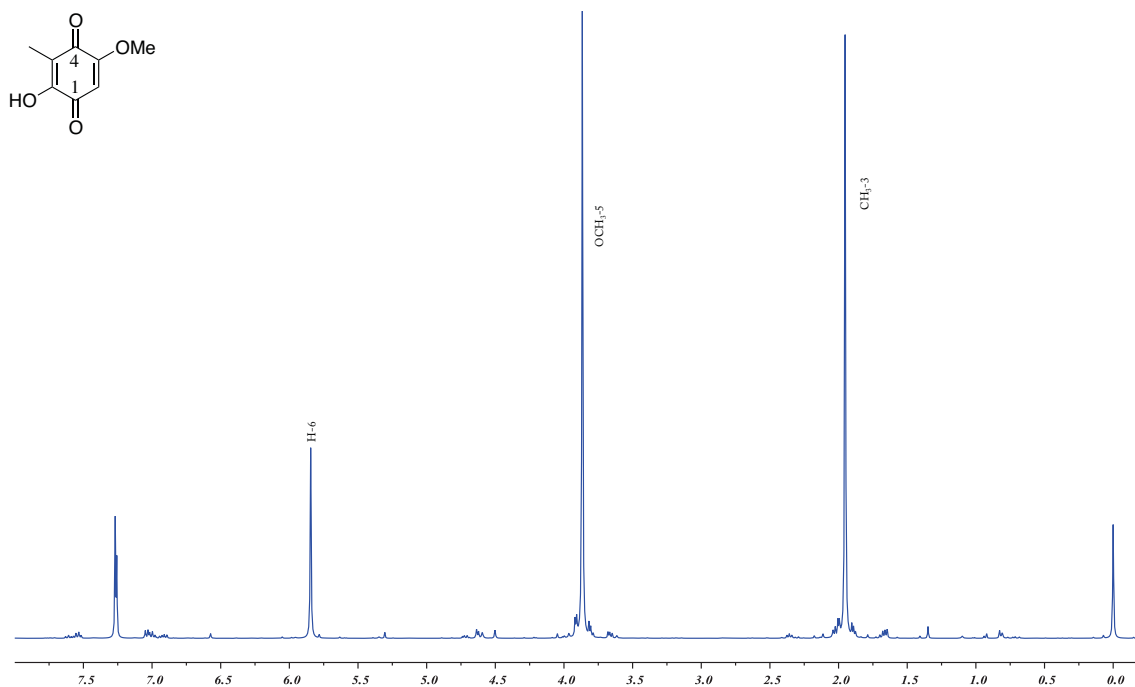


Figura AI-38. Espectro de ¹H-RMN de la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179) en CDCl₃.

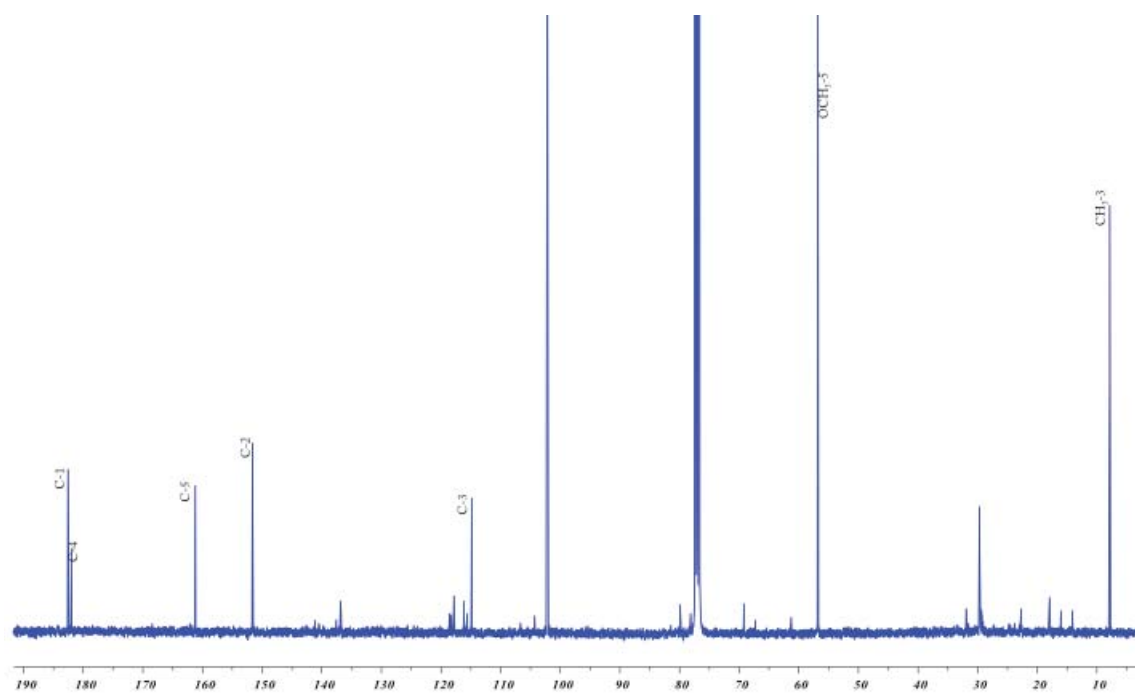


Figura AI-39. Espectro de ¹³C-RMN de la 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (179) en CDCl₃.

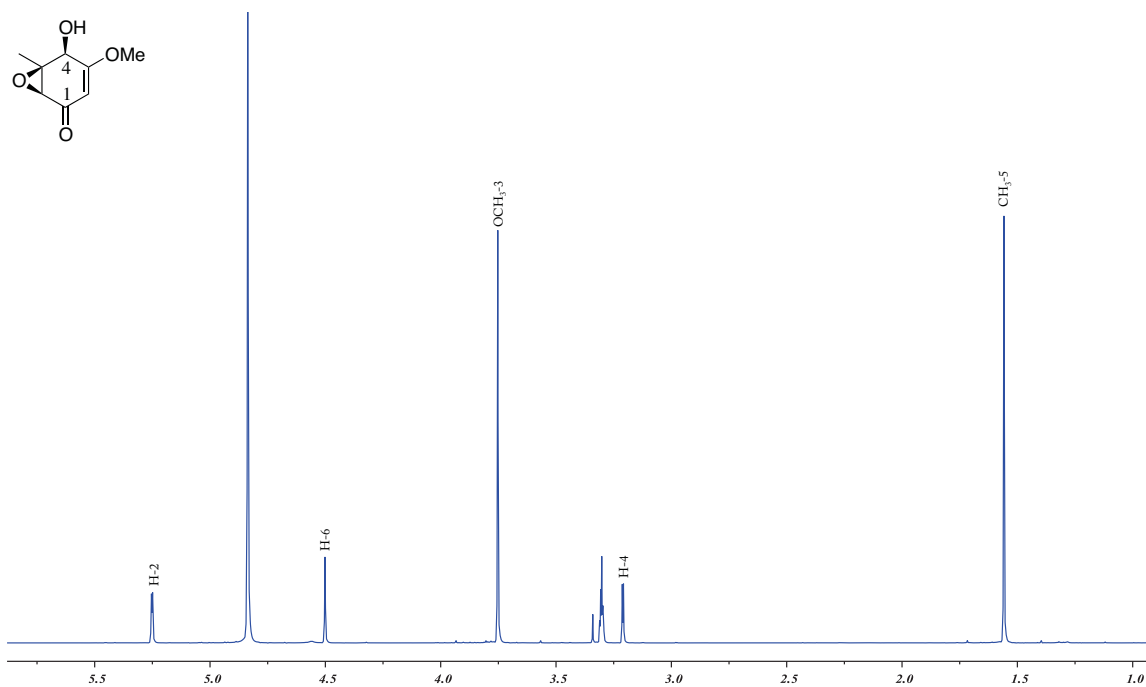


Figura AI-40. Espectro de ¹H-RMN de la 4S,5S,6S-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en CH₃OH-*d*₄.

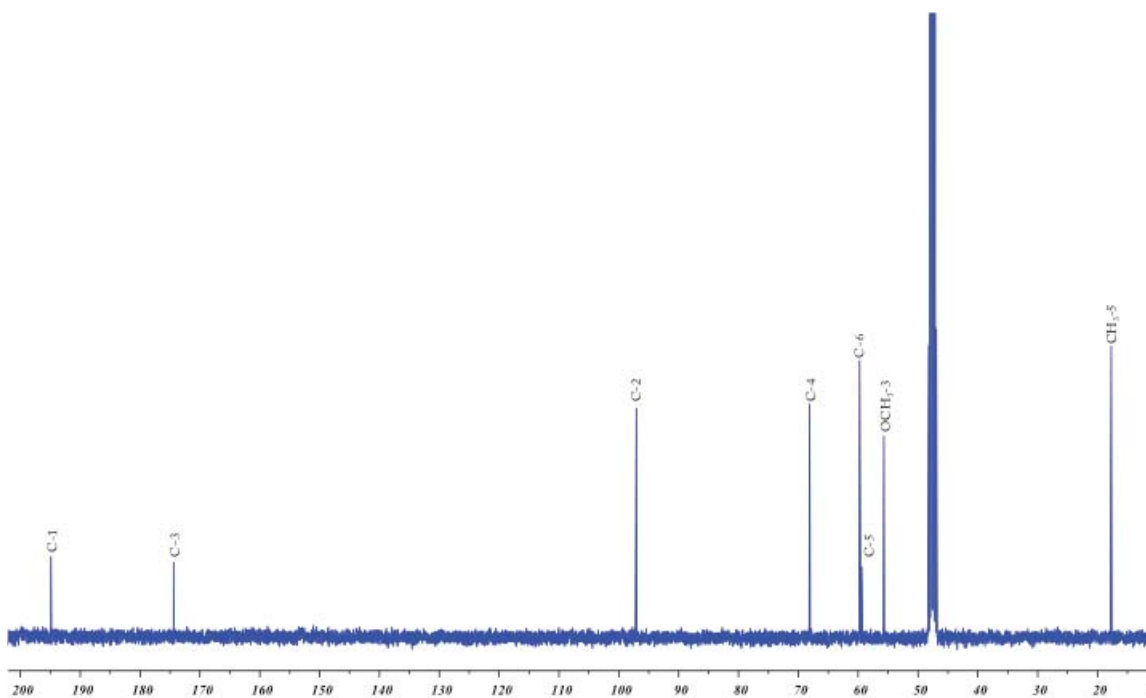


Figura AI-41. Espectro de ¹³C-RMN de la 4S,5S,6S-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en CH₃OH-*d*₄.

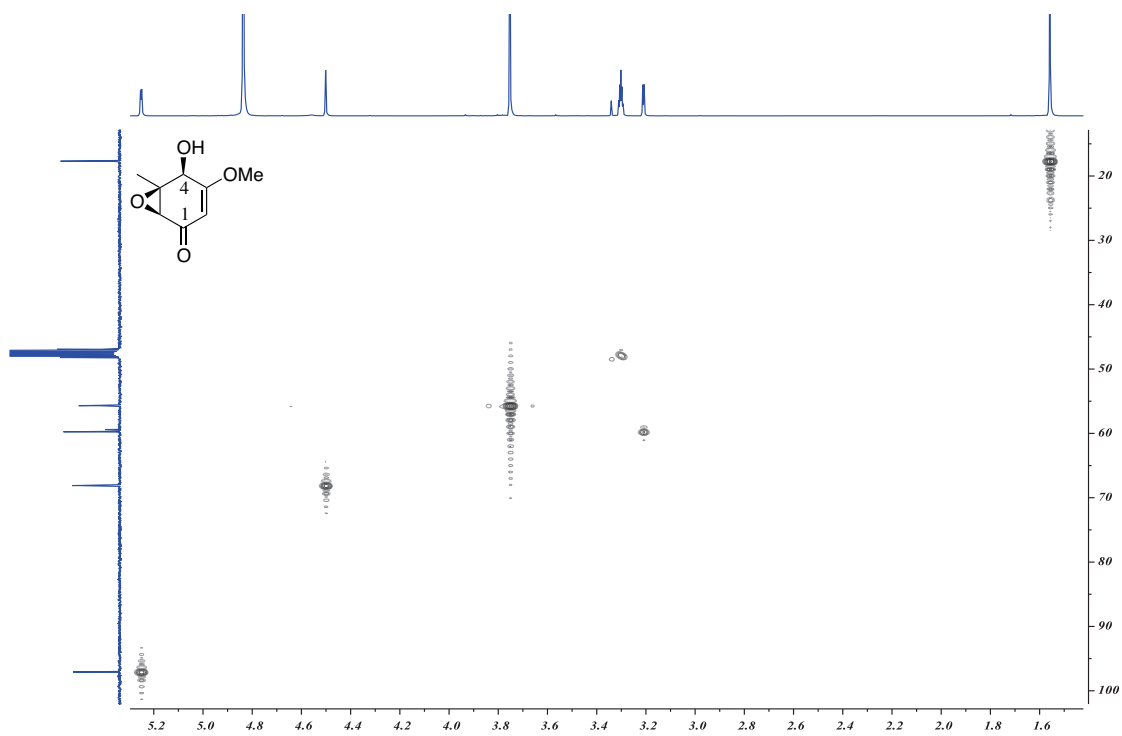


Figura AI-42. Espectro de HSQC de la 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

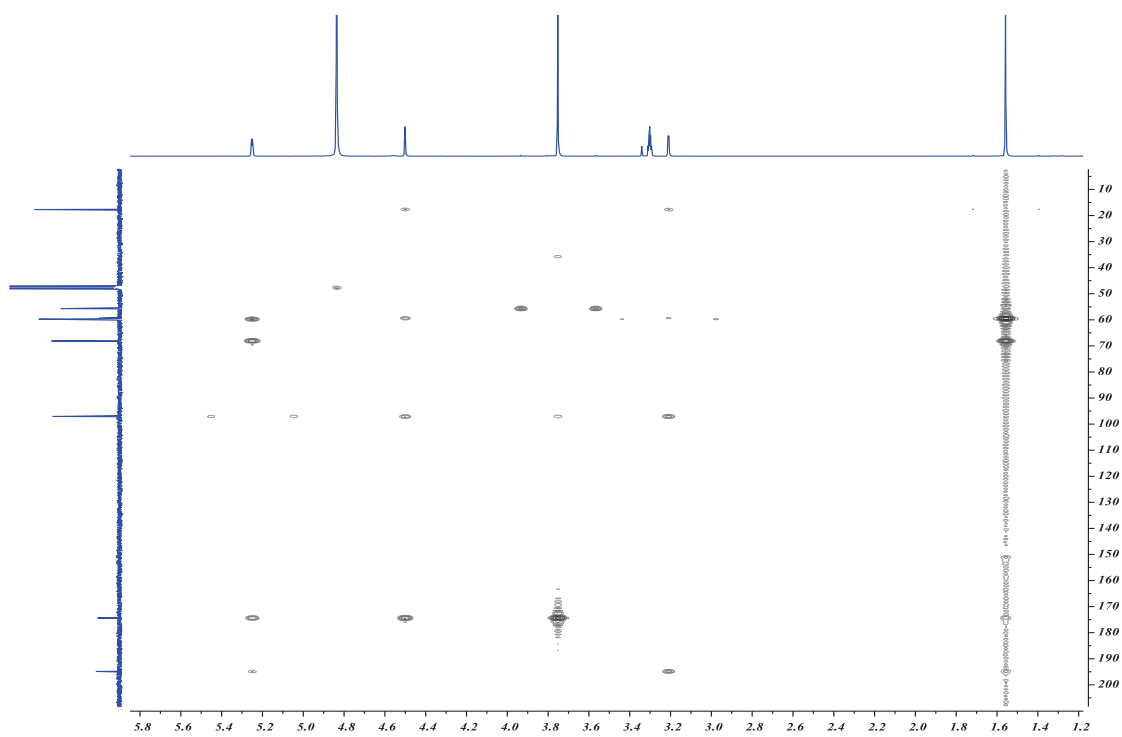


Figura AI-43. Espectro de HMBC de la 4*S*,5*S*,6*S*-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxiciclohex-2-en-1-ona (180) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

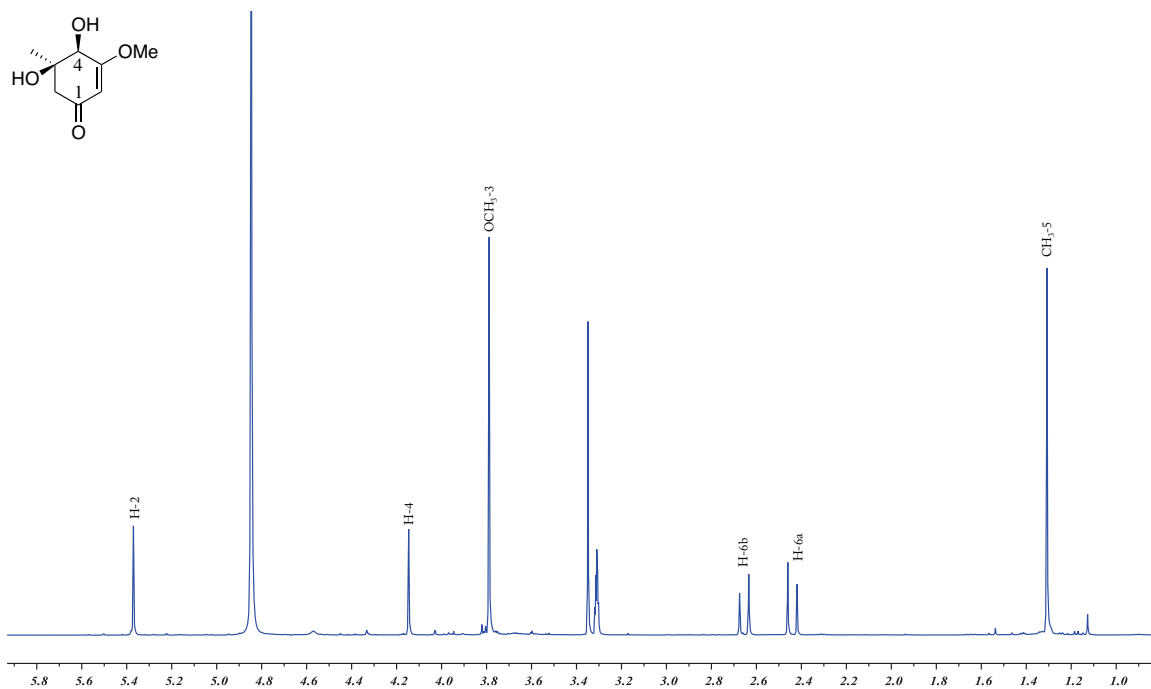


Figura AI-44. Espectro de ¹H-RMN de la 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en CH₃OH-*d*₄.

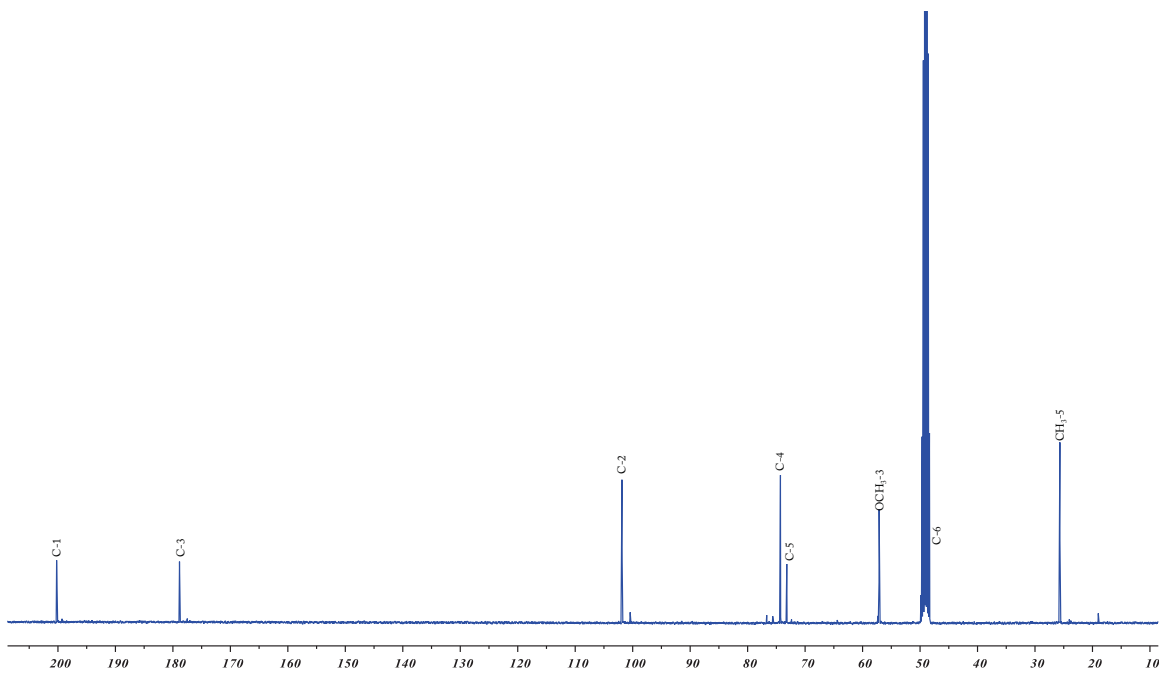


Figura AI-45. Espectro de ¹³C-RMN de la 4*R*,5*R*-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en CH₃OH-*d*₄.

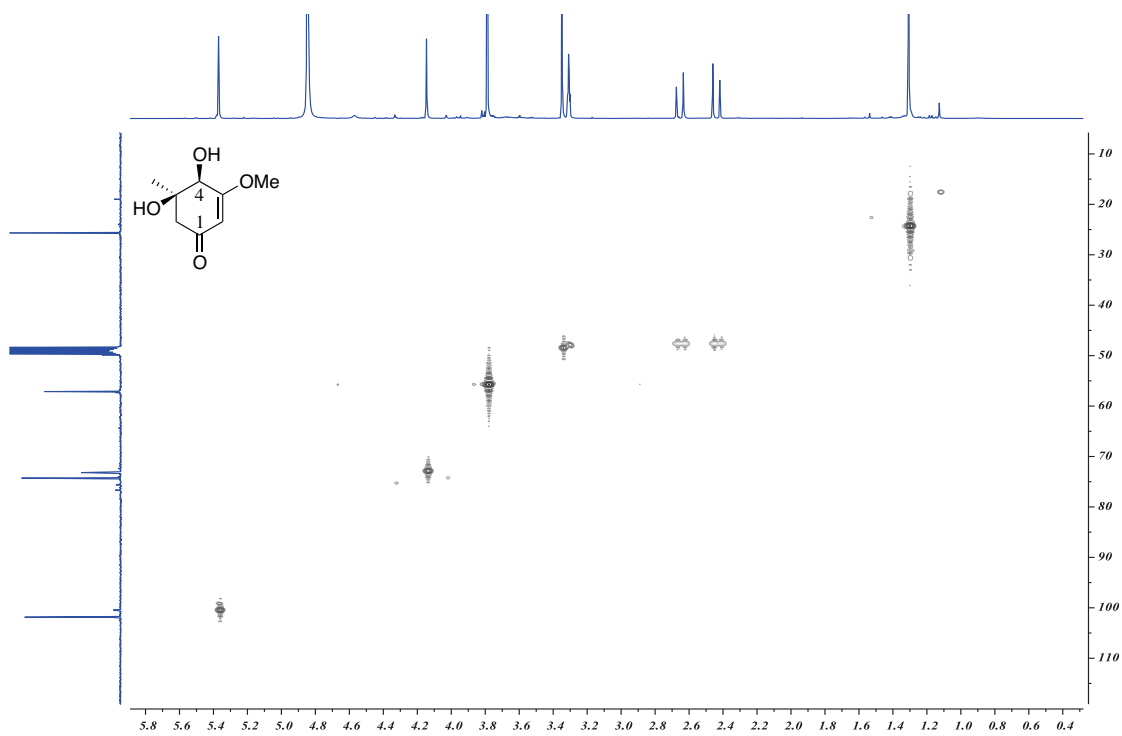


Figura AI-46. Espectro de HSQC de la 4R,5R-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

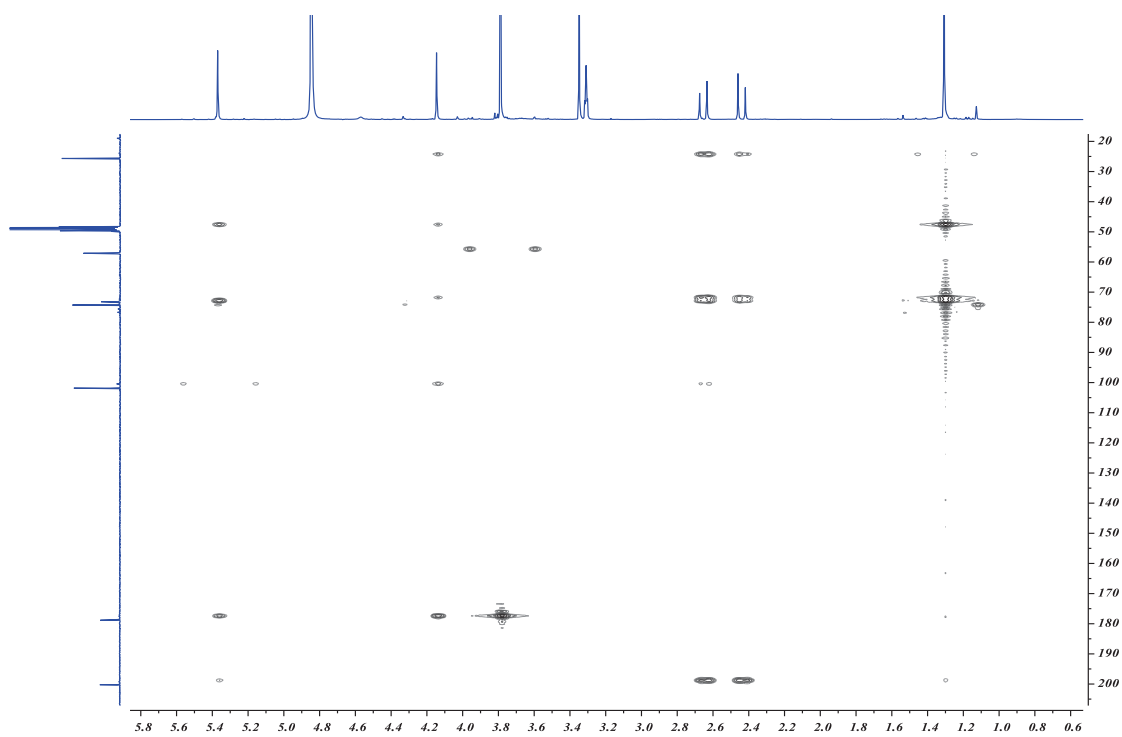


Figura AI-47. Espectro de HMBC de la 4R,5R-dihidroxi-3-metoxi-5-metilciclohexen-2-en-1-ona (181) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$.

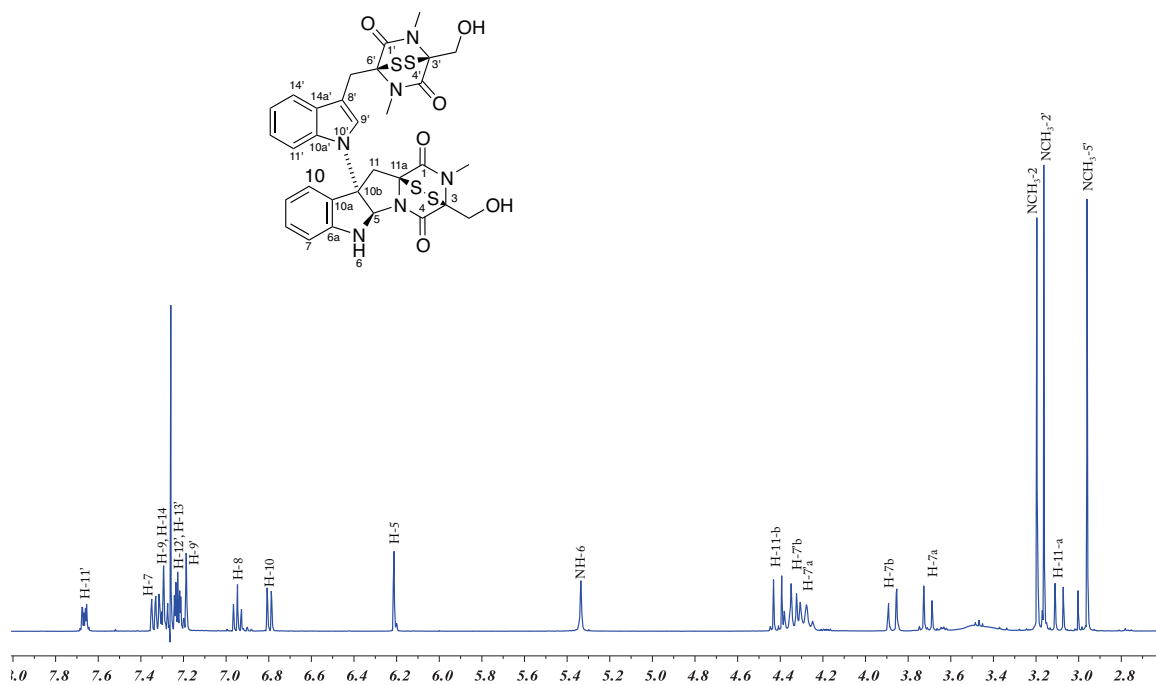


Figura AI-48. Espectro de ^1H -RMN de la chaetomina (128) en CDCl_3 .

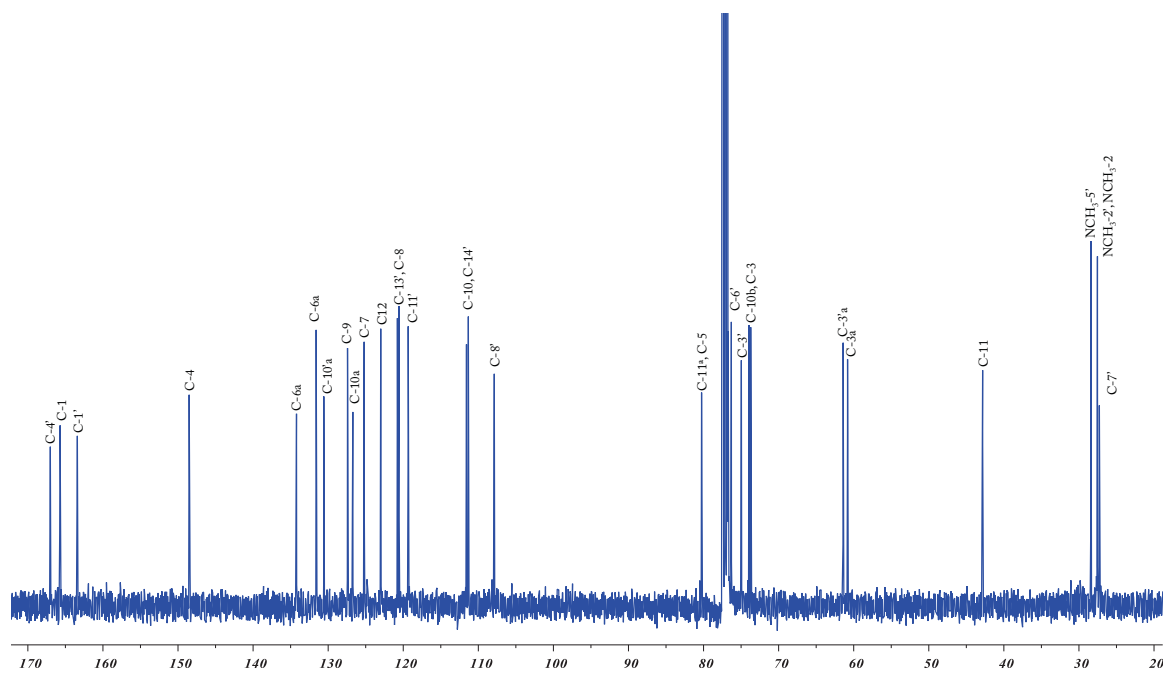
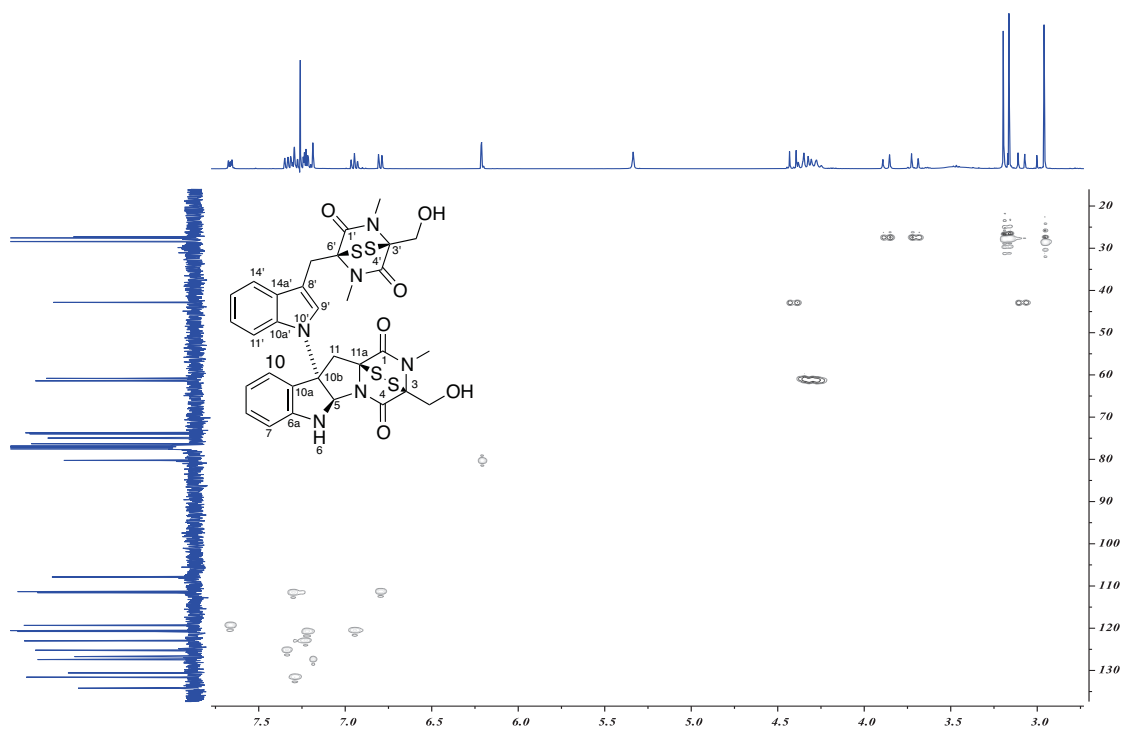
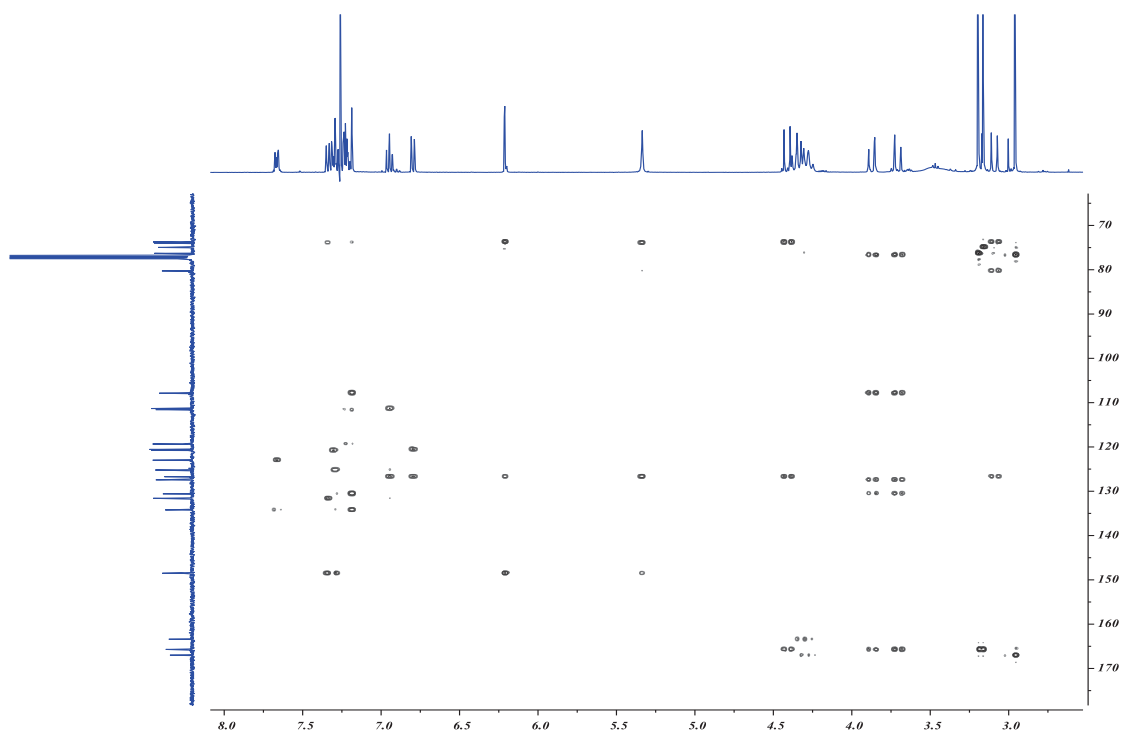


Figura AI-49. Espectro de ^{13}C -RMN de la chaetomina (128) en CDCl_3 .

Figura AI-50. Espectro de HSQC de la chaetomina (128) en CDCl₃.Figura AI-51. Espectro de HMBC de la chaetomina (128) en CDCl₃.

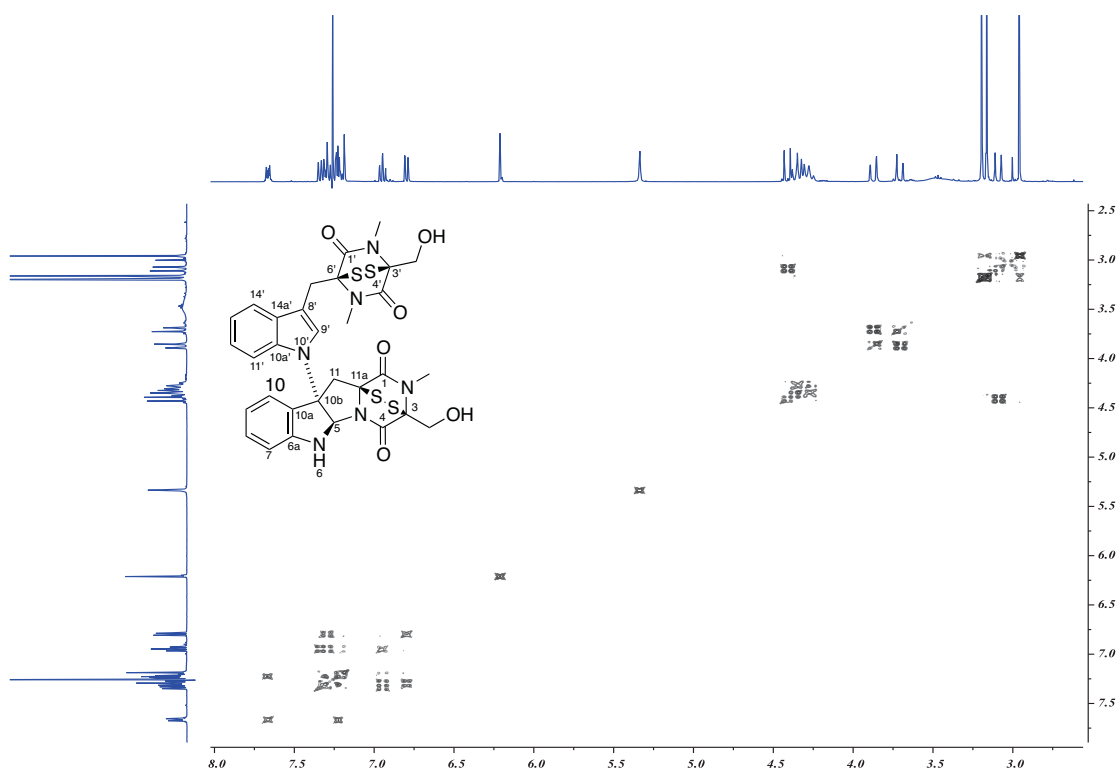


Figura AI-52. Espectro COSY de la chaetomina (128) en CDCl_3 .

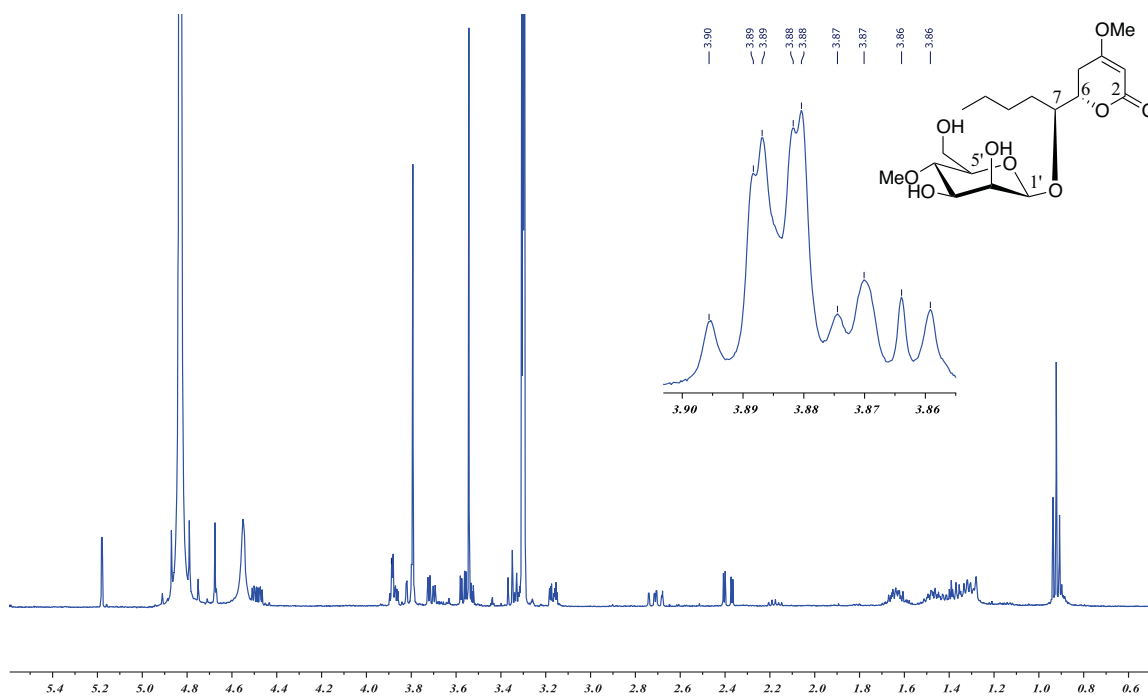


Figura AI-53. Espectro de ^1H -RMN del 6*S*,7*S*-4'-*O*-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Ampliación de la señal entre 3.85-3.90 ppm.

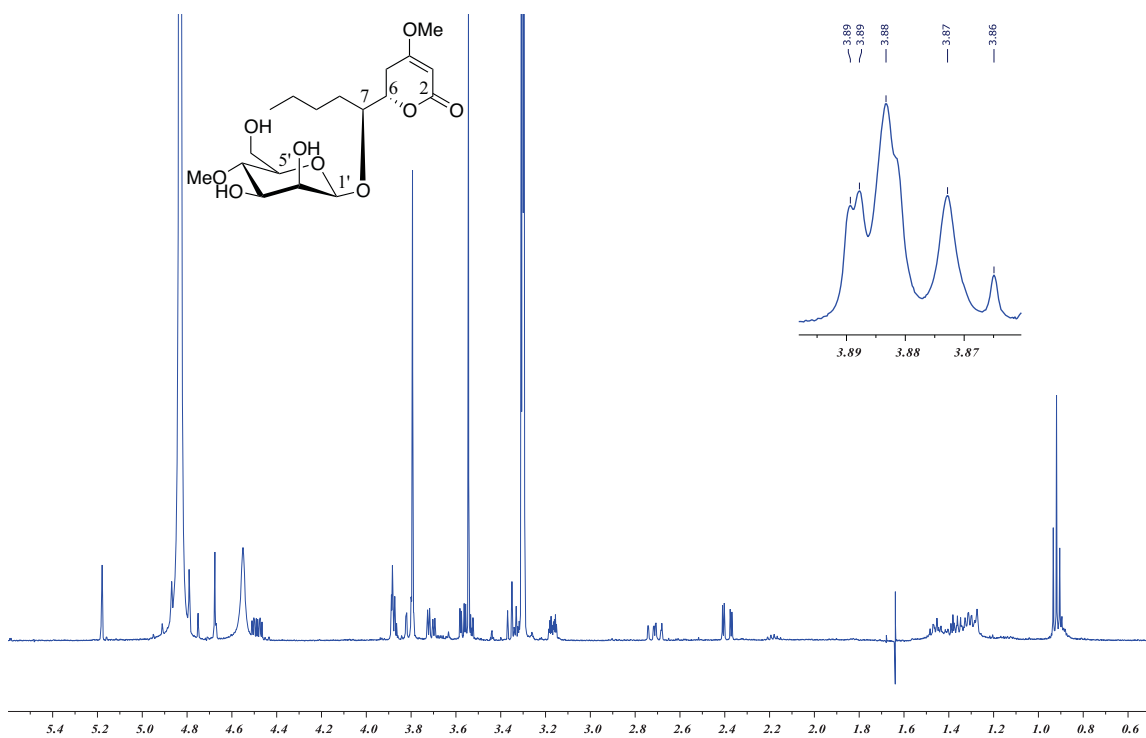


Figura AI-54. Espectro NOE del 4'-O-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Irradiación selectiva a 1.58 ppm.

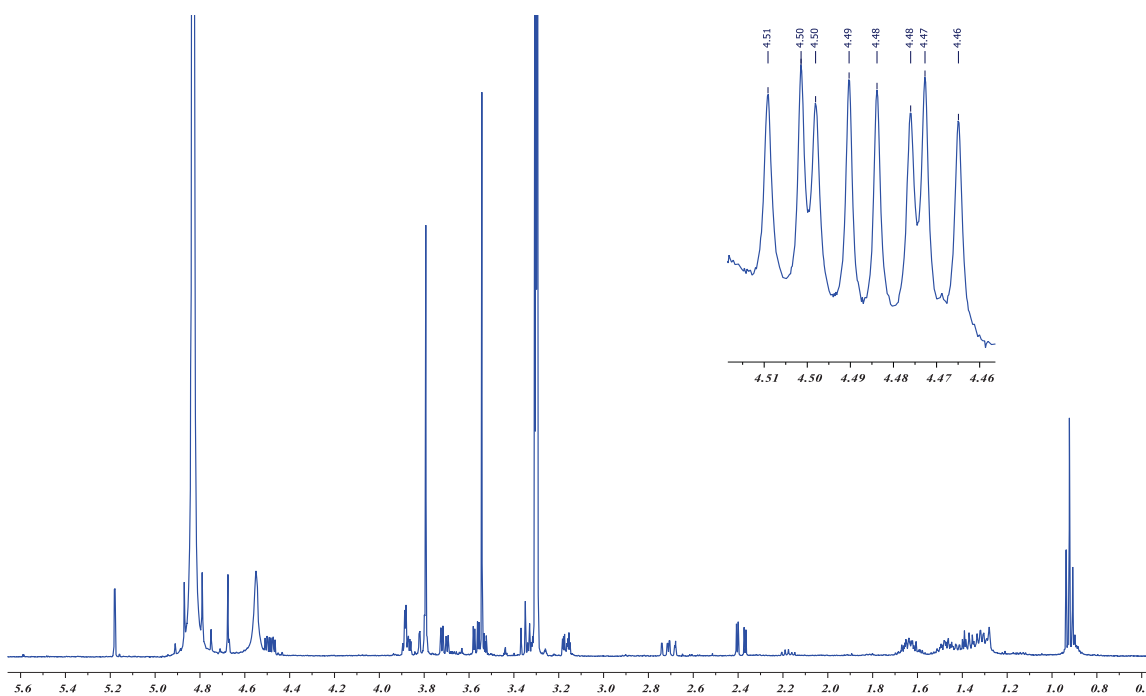


Figura AI-55. Espectro de ^1H -RMN del 6S,7S-4'-O-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Ampliación de la señal entre 4.46-4.51 ppm.

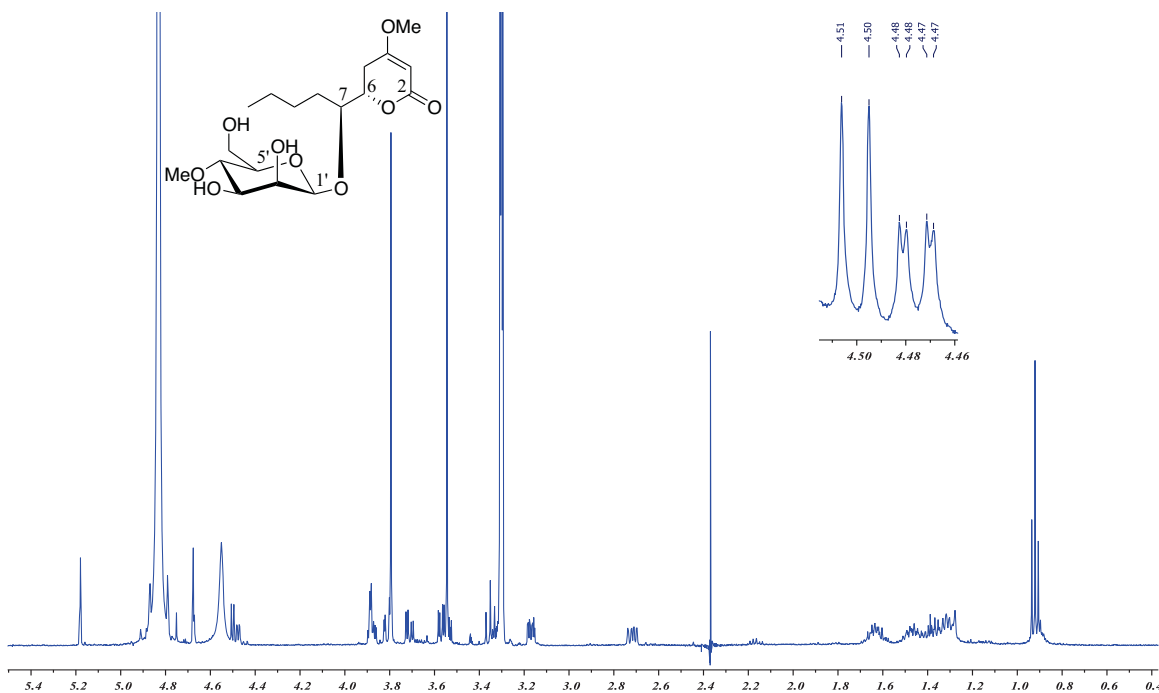


Figura AI-56. Espectro NOE del 4'-O-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Irradiación selectiva a 2.35 ppm.

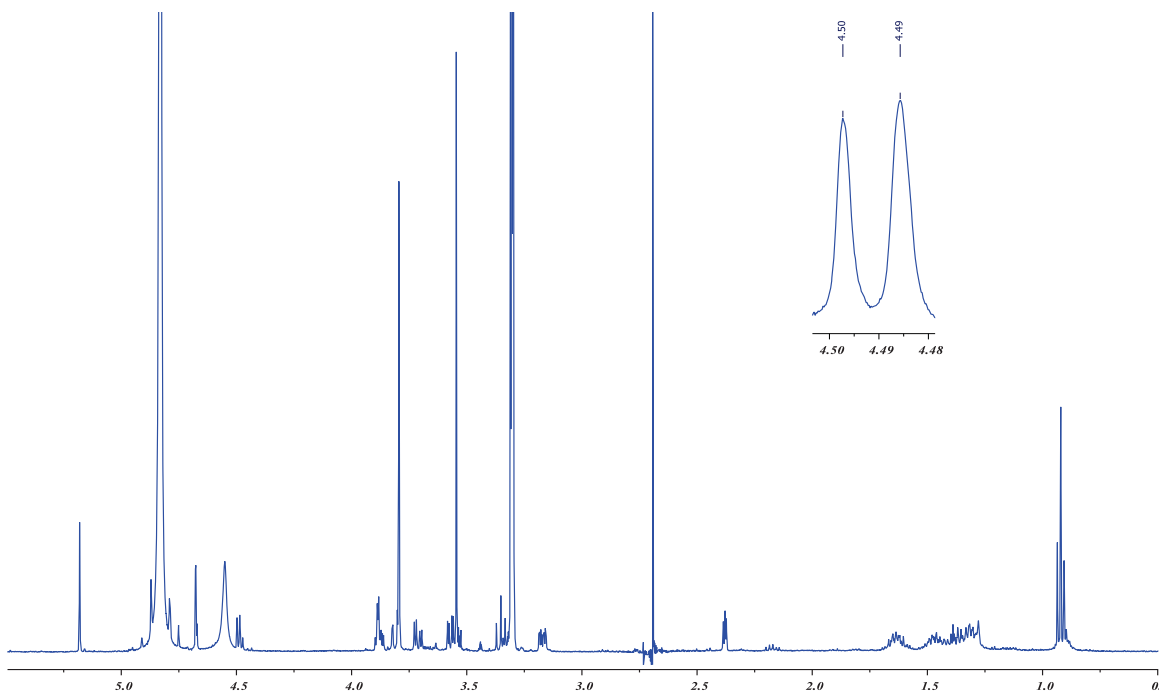


Figura AI-57. Espectro NOE del 4'-O-metil- β -D-manopiranosido de pestalotina (175) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Irradiación selectiva a 2.67 ppm.

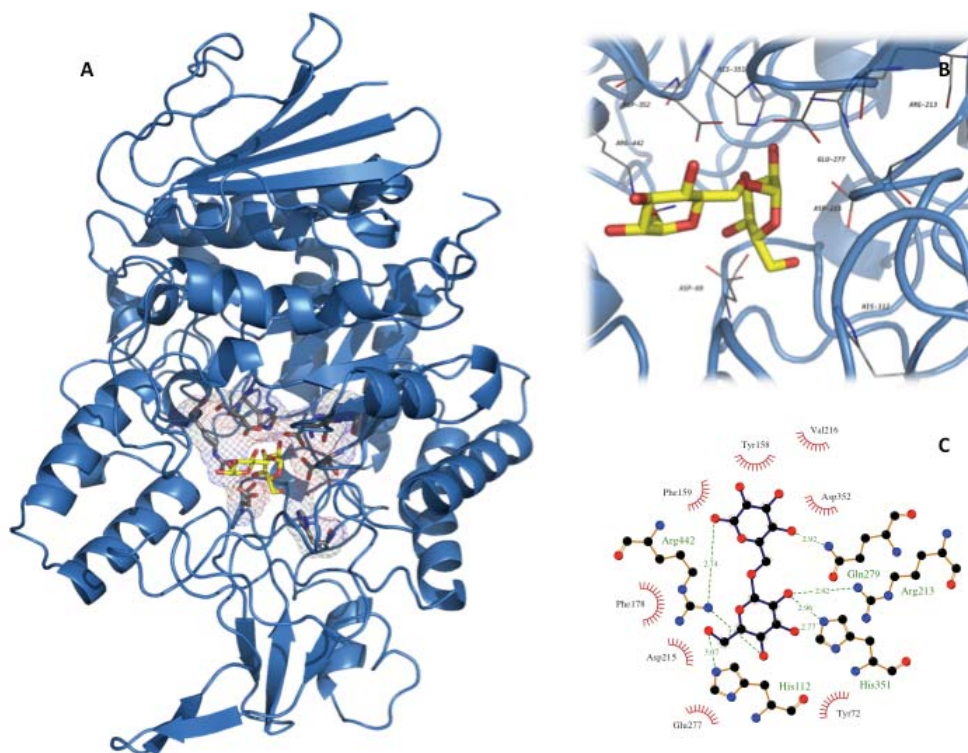


Figura AI-58. Validación del protocolo de acoplamiento molecular. A) Modelo estructural generado para el complejo α *GHY*-isomaltosa. B) Representación 3D de la interacción de la isomaltosa (bastones amarillos) en el dominio catalítico de la enzima (líneas grises). C) Representación 2D de la interacción entre la enzima α *GHY* y la isomaltosa.

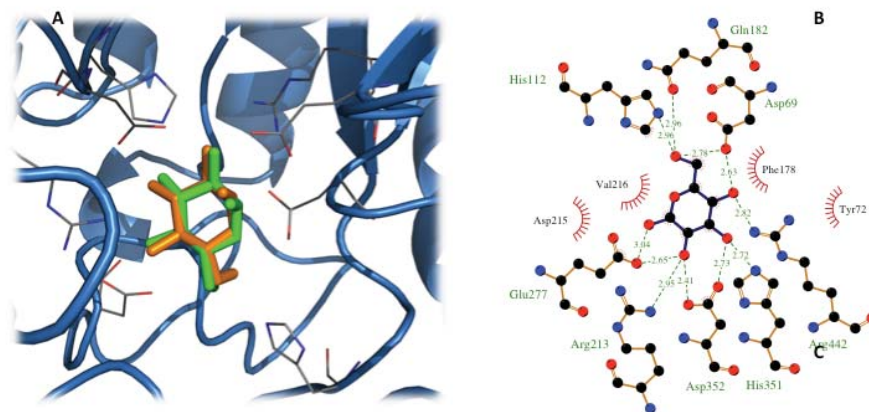


Figura AI-59. Validación del protocolo de acoplamiento molecular. A) Modelo estructural generado para el complejo α *GHY*-glucosa. B) Representación 3D de la interacción de la glucosa (bastones verdes) en el dominio catalítico de la enzima (líneas grises); glucosa cocrystalizada con la enzima α *GHY* (bastones naranjas). C) Representación 2D de la interacción entre la enzima α *GHY* y glucosa.

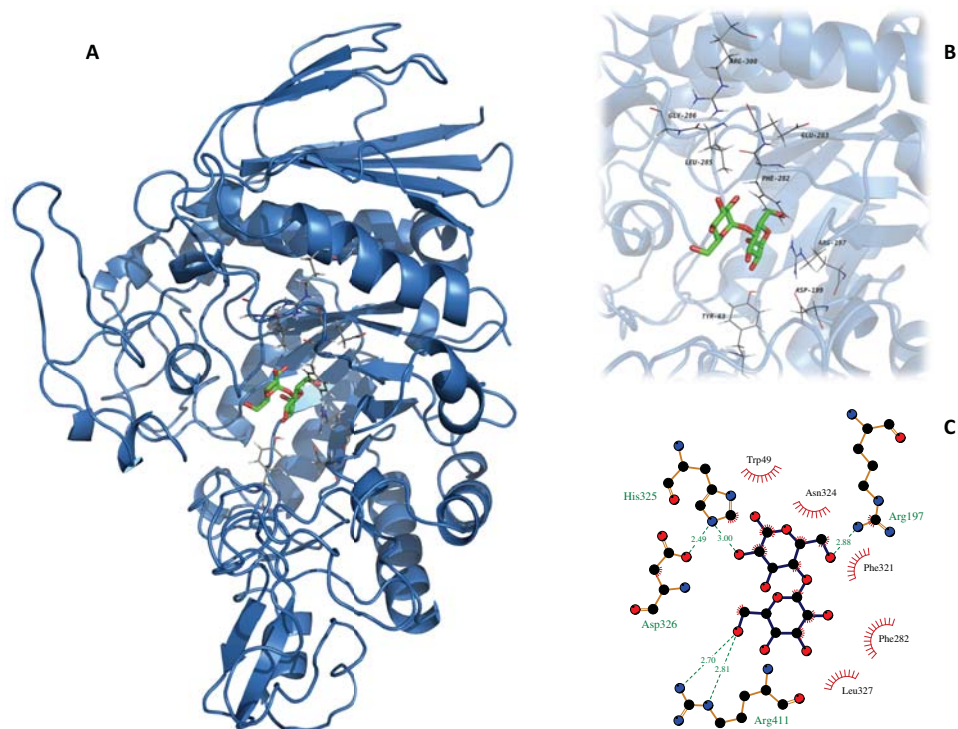


Figura AI-60. Validación del protocolo de acoplamiento molecular. A) Modelo estructural generado para el complejo α GHBs-maltosa. B) Representación 3D de la interacción de la maltosa (bastones verdes) en el dominio catalítico de la enzima (líneas grises). C) Representación 2D de la interacción entre la enzima α GHBs y la maltosa.

ANEXO II

Determinación de la configuración absoluta del producto 6S,7S(-)-4'-O-metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175): estrategia alterna

Como se mencionó en el apartado 6.3.1.1 de la sección de resultados y discusión, la configuración absoluta del producto 175 en el carbono C-6 se determinó por comparación de su espectro de DC experimental con aquellos calculados para los posibles diastereoisómeros del producto (6S,7S, 6S,7R, 6R,7S, y 6R,7R; 175a-175d, respectivamente, Figura AII-1). Para ello se realizaron cálculos de modelado molecular utilizando la TDDFT. Inicialmente, se estableció una configuración relativa *pseudoecuatorial* para la cadena lateral, de acuerdo con los valores observados para las constantes de acoplamiento entre los protones H-5 y H-6 ($J_{5ax-6} = 12.6$ Hz y $J_{5ec-6} = 3.8$ Hz). Posteriormente, la estructura de cada diastereoisómero fue minimizada y sometida a una búsqueda conformacional empleando un protocolo Monte Carlo; este procedimiento se llevó a cabo en el programa Spartan 02 utilizando un campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94. Posteriormente, todos los conformeros dentro de una ventana de 3.0 kcal/mol fueron seleccionados y reoptimizados utilizando DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Una vez obtenidos los conformeros de mínima energía, se calculó el espectro de DC para cada uno de los diastereoisómeros utilizando el mismo nivel de teoría. Cabe mencionar que durante este procedimiento los diastereoisómeros 175a, 175c y 175d mantuvieron la orientación *pseudoecuatorial* en la cadena lateral, sin embargo, en el conformero de mínima energía para diastereoisómero 175b esta cadena se orientó de manera *pseudoaxial* (Figura AII-1).

El análisis preliminar de los resultados indicó que el espectro de DC obtenido para el diastereoisómero 175a presentó una excelente correlación con el espectro experimental, el cual mostró un efecto Cotton positivo y uno negativo en 230 y 260 nm, respectivamente (Figura AII-2). Los diastereoisómeros 175c y 175d (Figura AII-2) fueron descartados automáticamente ya que presentaron un efecto Cotton positivo asociado a la transición $n-\pi^*$ de la pirona y a una configuración *R* en C-6. Finalmente el diastereoisómero 175b, se descartó ya que en el conformero de menor energía ($P = 0.71$) la

cadena lateral se encontraba orientada de manera *pseudoaxial*, y el efecto Cotton asociado a la transición $n-\pi^*$ también fue positivo, tal como lo señalara Snatzke en 1968 y Beecham y colaboradores en 1972 (Snatzke, 1968; Beecham et al., 1972). Sin embargo, al repetir el cálculo del espectro de DC para el distereoisómero **175b** considerando sólo aquellos conformeros en los cuales la cadena lateral esta orientada *pseudoecuatorialmente* (Figura AII-3), el efecto Cotton asociado a la transición $n-\pi^*$ de la pirona fue negativo, tal como lo establece la regla de Snatzke para lactonas α,β -insaturadas (Snatzke 1968). De esta manera se confirmó la configuración absoluta *S* en el centro estereogénico C-6 del producto **175**, misma que corresponde a una quiralidad positiva, como se desprende del valor del Ψ (+166.7° y +166.3) calculado para el cromóforo C=C-C=O en las estructuras de mínima energía generada para **175a** y **175b**, respectivamente.

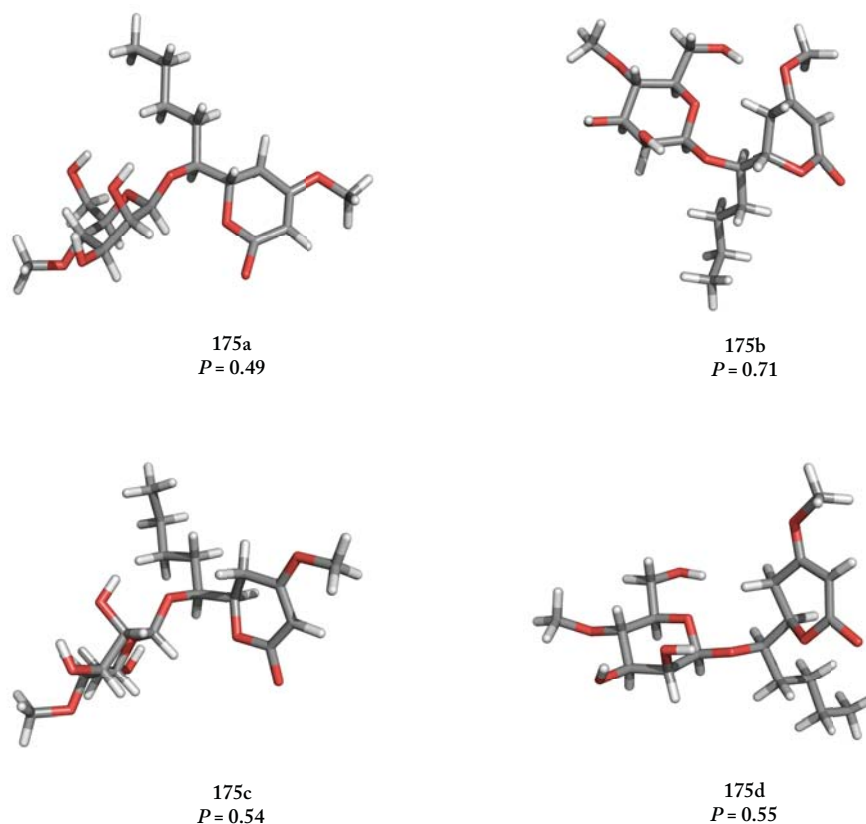


Figura AII-1. Estructuras de mínima energía de los cuatro posibles diastereoisómeros de **175**.

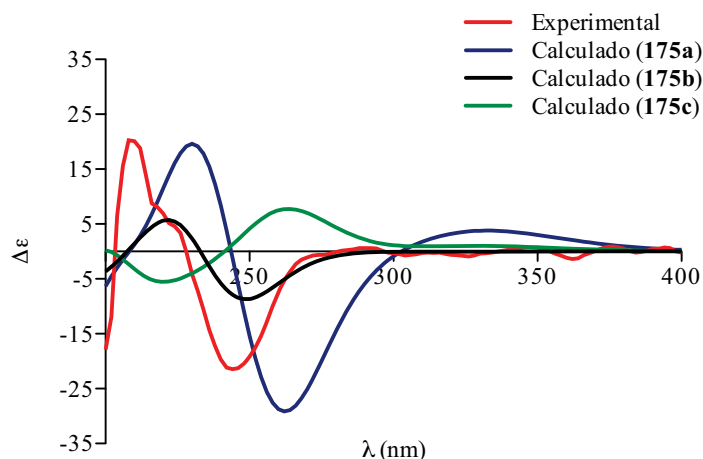


Figura AII-2: Comparación entre los espectros de DC calculados (línea azul, 175a; línea negra, 175b; línea verde 175c) y experimental (línea roja) para el producto 6S,7S-4'-O-metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (175).

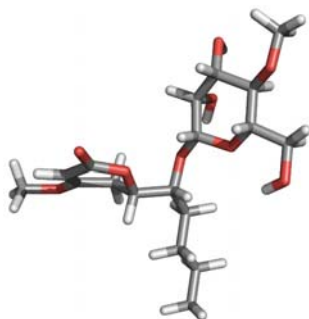


Figura AII-3. Estructura de mínima energía del diastereoisómero 175b con la cadena lateral orientada *pseudoecuatorialmente*.

Para determinar la configuración absoluta en el carbono C-7, se compararon las constantes de acoplamiento calculadas $^3J_{6-7}$, $^3J_{5_{ec}-6}$ y $^3J_{5_{ax}-6}$ (obtenidas a partir de cálculos de modelado molecular usando DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP) con las experimentales (obtenidas de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ mediante experimentos de irradiación selectiva sobre las señales en δ_{H} 2.35 y 2.67 ppm, H-5_{ec} y H-5_{ax}, respectivamente) [Figuras A56 y A57]. El análisis se realizó sólo para los diastereoisómeros 175a y 175b, los cuales presentan una configuración *S* en el carbono C-6. En el caso de 175b sólo se consideraron los conformeros con la cadena lateral orientada

pseudoecuatorialmente. Las constantes de acoplamiento ${}^3J_{6-7}$, ${}^3J_{5ec-6}$ y ${}^3J_{5ax-6}$ (**Cuadro AII-1**) calculadas para el diastereoisómero **175a** mostraron una excelente correlación con los valores experimentales; el error medio cuadrático (EMC) fue de 0.64. Para el diastereoisómero **175b** el valor de las constantes de acoplamiento calculadas difirió considerablemente del experimental (EMC = 2.11). Estos datos permiten proponer que la configuración en C-7 del producto natural es *S*. Así, el compuesto **175** fue caracterizado como 6*S*,7*S*-(-)-4'-*O*-metil-β-D-manopiranosido de pestalotina (**175**). Si bien, en la conformación de menor energía del distereoisómero **175a** (**175a**₁, *P* = 0.49) se observa una relación *anticlinal* entre los protones H-6 y H-7, lo cual indicaría un valor grande en la constante de acoplamiento (${}^3J_{6-7}$ = 8.1), la presencia del confórmero **175a**₂ (*P* = 0.27, ${}^3J_{6-7}$ = 4.2), donde la relación es *sinclinal*, disminuyó considerablemente el valor promedio de la constante calculada (${}^3J_{6-7}$ = 6.5).

Cuadro AII-1. Constantes de acoplamiento (${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$) experimentales y calculadas para el producto **175**.

${}^3J_{\text{H-H}}$	Experimental	Constantes de acoplamiento calculadas ^a	
		175a	175b
J_{6-7}	5.5	6.5 ^b	2.1 ^b
J_{5ec-6}	3.8	3.5	3.8
J_{5ax-6}	12.6	13.0	13.7
EMC		0.64	2.11

Constantes de acoplamiento (*J*) expresadas en Hz. ^aLos valores de las constantes de acoplamiento fueron calculados con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Las constantes de acoplamiento fueron ponderadas utilizando la ecuación $\sum_i J^i \times P^i$, donde J^i es el valor de la constantes de acoplamiento calculado para cada confórmero y P^i es la población para el *i*ésimo confórmero. ^bEl valor promedio de las constantes de acoplamiento fue escalado con el factor: $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ (López-Vallejo et al., 2011; Suárez-Ortiz et al., 2013).

PUBLICACIONES

	Página
Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., González, M.C., Glenn, A.E., Mata, R., 2013. Thielavins A, J and K: α-Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from <i>Hintonia latiflora</i> . <i>Phytochemistry</i> , 94, 198–205.	166
Rachel Mata, Mario Figueroa, Martín González-Andrade, José Rivera-Chávez, Abraham Madariaga-Mazón, and Paulina Del Valle., 2015. Calmodulin inhibitors from natural sources: an update . <i>Journal of Natural Products</i> . DOI: 10.1021/np500954x.	175
Rivera-Chávez, J., Figueroa, M., González, M.C., Glenn, A.E., Mata, R., 2015. α-Glucosidase inhibitors from a <i>Xylaria feejeensis</i> associated with <i>Hintonia latiflora</i> . <i>Journal of Natural Products</i> . DOI: 10.1021/np500897y.	185
Anaya-Eugenio, G.D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J., Mata, R., 2014. Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> 155, 416–425.	191



Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora* [☆]

José Rivera-Chávez ^a, Martín González-Andrade ^b, María del Carmen González ^c, Anthony E. Glenn ^d, Rachel Mata ^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

^b Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Secretaría de Salud, Distrito Federal, C.P. 14610, México City, Mexico

^c Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

^d Toxicology & Mycotoxin Research Unit, 950 College Station Road, USDA ARS Russell Research Center, Athens, GA 30605, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2013

Received in revised form 16 May 2013

Available online 26 June 2013

Keywords:

Type II diabetes mellitus

Hintonia latiflora

Endophytic fungus

Thielavins

α -Glucosidase

Enzymatic inhibition

Molecular docking

Oral sucrose tolerance test

ABSTRACT

Bioassay-guided fractionation of the bio-active organic extract obtained from solid-media culture of MEXU 27095, an endophytic fungus isolated from the Mexican medicinal plant *Hintonia latiflora* (Rubiaceae), led to separation of three tridepsides which were identified as thielavins A, J and K. All three compounds inhibited *Saccharomyces cerevisiae* α -glucosidase (α GHY) in a concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 23.8, 15.8, and 22.1 μ M, respectively. Their inhibitory action was higher than that of acarbose (IC₅₀ = 545 μ M), used as a positive control. Kinetic analysis established that the three compounds acted as non-competitive inhibitors with k_i values of 27.8, 66.2 and 55.4 μ M, respectively (α = 1.0, 1.2, 0.7, respectively); acarbose behaved as competitive inhibitor with a k_i value of 156.1 μ M. Thielavin J inhibited the activity of α -glucosidase from *Bacillus stearothermophilus* (α GHBs) with an IC₅₀ of 30.5 μ M, being less active than acarbose (IC₅₀ = 0.015 μ M); in this case, compound (2) (k_i = 20.0 μ M and α = 2.9) and acarbose (k_i = 0.008 μ M and α = 1.9) behaved as non-competitive inhibitors. Docking analysis predicted that all three thielavins and acarbose bind to homologated α GHBs and to α GHY (PDB: 3A4A) in a pocket close to the catalytic site for maltose and isomaltose, respectively. The α -glucosidase inhibitory properties of thielavin K (3) were corroborated *in vivo* since it induced a noted antihyperglycemic action during an oral sucrose tolerance test (3.1, 10.0 and 31.6 mg/kg) in normal and nicotinamide-streptozotocin diabetic mice. In addition, at a dose of 10 mg/kg, it provoked a moderate hypoglycemic activity in diabetic mice.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a polygenic complex metabolic disorder characterized by high blood glucose levels. This disease is one of the most challenging health problems to all nations in the 21st century. In 2010, an estimated 285 million people worldwide had diabetes mellitus, 90% of whom had type 2 diabetes mellitus (TII-DM) which is associated with low insulin production or insulin resistance due to genetic and/or epigenetic causes (Chen et al., 2011; Scully, 2012). Globally, the number of people with diabetes mellitus is projected to rise to 439 million by 2030. The serious complications associated with TII-DM, such as cardiovascular disease, peripheral vascular disease, stroke, diabetic neuropathy, amputations, renal failure, and blindness result in increasing disability, reduced life expectancy, and enormous health costs (Scully, 2012).

The best treatment for TII-DM involves hyperglycemic control using appropriate therapies and a healthy lifestyle. Most treatments focus on increasing insulin levels, improving sensitivity to the hormone in tissues, or reducing the rate of carbohydrate absorption from the gastrointestinal tract (Israili, 2011). The last group of drugs includes inhibitors of α -glucosidases, which catalyze the final step in the digestive process of carbohydrates and are useful to prevent the progression of the disease. α -Glucosidases are membrane-bound enzymes that hydrolyze the glycosidic bond of larger carbohydrate molecules to yield glucose and related monosaccharides. Therefore, α -glucosidase inhibitors delay glucose absorption and lower the postprandial blood glucose peak (Israili, 2011). The best known α -glucosidase inhibitors are acarbose, isolated from *Actinoplanes* species, and miglitol, an analogue of the natural product 1-deoxynojirimycin isolated from mulberry, *Morus alba* L. (Wardrop and Waidyarachchi, 2010).

In recent years substantial efforts to discover effective inhibitors of α -glucosidases from natural sources have been made (Bennalla et al., 2010; Sim et al., 2010; Miller et al., 2012; Mata et al., 2013). In turn, these inhibitors would be useful for the develop-

[☆] Taken in part from the Ph.D. thesis of J. Rivera-Chávez.

* Corresponding author. Tel.: +52 5 55 622 5289; fax: +52 5 55 622 5329.

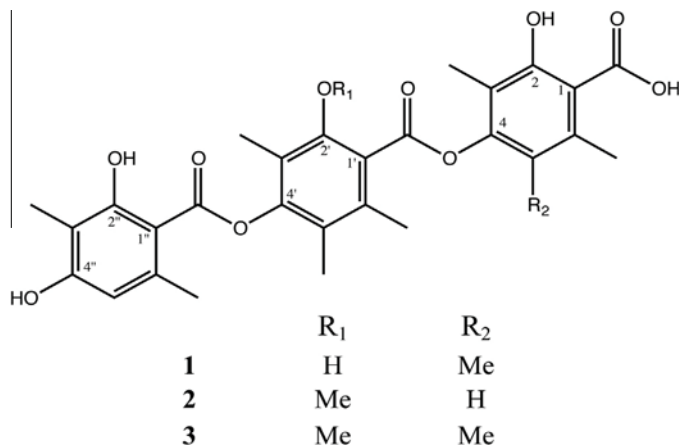
E-mail address: rachel@unam.mx (R. Mata).

ment of new drugs for the treatment of diabetes. In this scenario, the present investigation was undertaken to find new inhibitors of α -glucosidases from a new fungal species belonging to the *Chaetomiaceae* family (MEXU 27095) using *in vitro*, *in silico* and *in vivo* studies. MEXU 27095 is an endophyte associated with *Hintonia latiflora* (Sesse & Moc. ex DC.) Bullock (Rubiaceae), a medicinal antidiabetic plant which possesses 4-phenylcoumarins and cucurbitacins with hypoglycemic and antihyperglycemic properties (Guerrero-Analco et al., 2007; Mata et al., 2013).

2. Results and discussion

2.1. Isolation of α -glucosidase inhibitors

As a part of our program to discover new inhibitors of α -glucosidases from natural sources, a few endophytic fungi associated with *H. latiflora* were isolated and cultured. Organic soluble extracts were prepared and tested *in vitro* against α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (α GHY) using a well-known spectrophotometric procedure (Oki et al., 1999). An extract of MEXU 27095 was selected for chemical analysis based on its potent inhibitory activity against α GHY (IC_{50} = 46.4 μ g/ml). Bioassay-guided fractionation of this extract using different chromatographic procedures led to isolation of tridepsides **1–3**, which were characterized as thielavins A (**1**), J (**2**) and K (**3**) by comparison of their spectroscopic and spectrometric data with those previously described (Kitahara et al., 1981; Sakemi et al., 2002). The spectroscopic data are provided in the Supplementary material (Table S1 and Figs. S1–S6).



2.2. α -Glucosidases inhibition evaluation and kinetic studies

Thielavins **1–3** inhibited α GHY in a concentration-dependent manner with IC_{50} values of 23.8, 15.8 and 22.1 μ M, respectively, establishing that the small differences in the structures have little impact on enzymatic inhibitory activity. The three tridepsides were more potent than acarbose (positive control, IC_{50} = 545.4 μ M) against α GHY, a type I α -glucosidase which hydrolyzes heterogeneous substrates including sucrose and *p*NPG. On the other hand, acarbose was a better inhibitor (IC_{50} of 0.015 μ M) of α -glucosidase from *Bacillus stearothermophilus* (α GHBs) than thielavin J (**2**), which exhibited an IC_{50} of 30.5 μ M; α GHBs is a type IV α -glucosidase with maltase activity. These differences in activity against α -glucosidases from different sources are well documented and explained in terms of enzyme substrate recognition (Oki et al., 1999; Nakai et al., 2005). The corresponding graphics for the calculation of

the IC_{50} values are included in the supplementary information (Figs. S7 and S8).

In order to obtain further evidence of the nature of the interaction of **1–3** with α GHY kinetic analyses were carried out. Acarbose was also included in the study. Lineweaver–Burk plots were constructed using different concentrations of inhibitors. The results in Fig. 1 indicated that **1–3** showed typical reversible-non-competitive plots, with series of lines with different slopes intersecting in the second quadrant between x – y axes. The calculated k_i and α values were 27.8, 66.2 and 55.4 μ M, respectively (α = 1.0, 1.2, 0.7, respectively). These results suggested that **1–3** bind to α GHY or to the substrate-enzyme complex (*p*NPG- α GHY in this case) (Segel, 1993; Copeland, 2000; Xu, 2010). Acarbose (k_i = 156.1 μ M), on the other hand, behaved as competitive inhibitor.

Lineweaver–Burk plots (Fig. 2) generated for the interaction of α GHBs with **2** (k_i = 20.0 μ M) and acarbose (k_i = 0.008 μ M) established that both substances acted as non-competitive inhibitors against this enzyme. Altogether, these results indicated that compound **1–3** could better inhibit *in vivo* the activity of sucrase type of α -glucosidases.

2.3. Molecular modeling and docking studies

In order to envisage the mode of interaction of compound **1–3** with α GHY and α GHBs docking analyses were carried out (Morris et al., 1998; Rudnitskaya et al., 2010). Molecular dockings were performed using a homologated structure for α GHBs (maltase), and a crystallized glucose- α -glucosidase (isomaltase-sucrase) complex for α GHY. The latter structure (PDB: 3A4A) was obtained from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>). Before molecular docking of thielavins **1–3** and acarbose was carried out, a molecular modeling protocol was established and validated for both enzymes with its natural ligands (maltose and isomaltose from crystal structures PDB: 1URG and 3AXH, respectively). The results of the validation indicated that isomaltose did not bind to the catalytic domain of α GHBs, confirming that this α -D-glucosidase is specific for non-reducing terminal α -1,4 bonds of maltosaccharides (Suzuki et al., 1984; Takii et al., 1996; Tsujimoto et al., 2007). On the other hand, the results obtained for α GHY (PDB: 3A4A) showed that isomaltose bound at the catalytic domain but maltose did not (Yamamoto et al., 2004). The validation data are also included in the Supplementary material (Figs. 9–11).

Thielavins **1–3** and acarbose were next docked into both α -glucosidase models. The lowest energy conformation obtained for each ligand in a blind docking was selected and re-docked in the binding site in order to get the better model of interaction. In the case of α GHBs, the docking results predicted that **1–3** bound in the catalytic domain adopting the same conformation. The pocket was found to be composed by Tyr-63, Arg-197, Asp-199, Phe-282, Leu-285, Gly-283, Arg-300, and the main interactions were hydrophobic although hydrogen bonds were observed between Asp-199 (residue involved in the catalytic domain) and the hydroxyl group at C-4', and between Leu-285 and Arg-300 with the carboxylic residue of compounds **1–3**. The calculated k_i values for **1–3** were 3.0, 4.3 and 3.4 μ M, respectively. Fig. 3 shows the results for compound **3**; for compounds **1** and **2** the corresponding drawings are included in the Supplementary material (Figs. 12 and 13, respectively). Acarbose attached to α GHBs (Fig. 3) at the catalytic pocket (as maltose and **1–3**) with an estimated k_i of 28 nM, correlating well with the experimental data.

The docking results of tridepsides **1–3** and acarbose with α GHY showed that the four ligands lodged in the same pocket near the active site. Hydrogen bonds and hydrophobic-contacts were again the most important type of interactions with the enzyme. In all cases, the pocket included Lys-156, Ser-157, Tyr-158, Ser-240, Ser-241, Asp-242, His-280, Ser-304, Asp-307, Pro-312, Leu-213

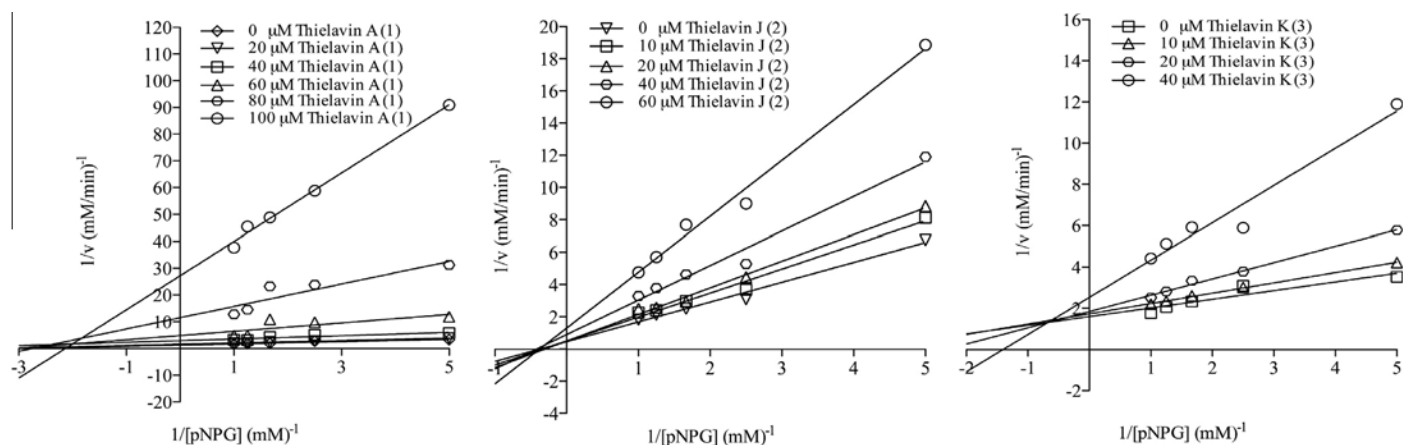


Fig. 1. Lineweaver–Burk plots of α GHY inhibition at different concentrations of substrate and thielavins A, J, and K (1–3).

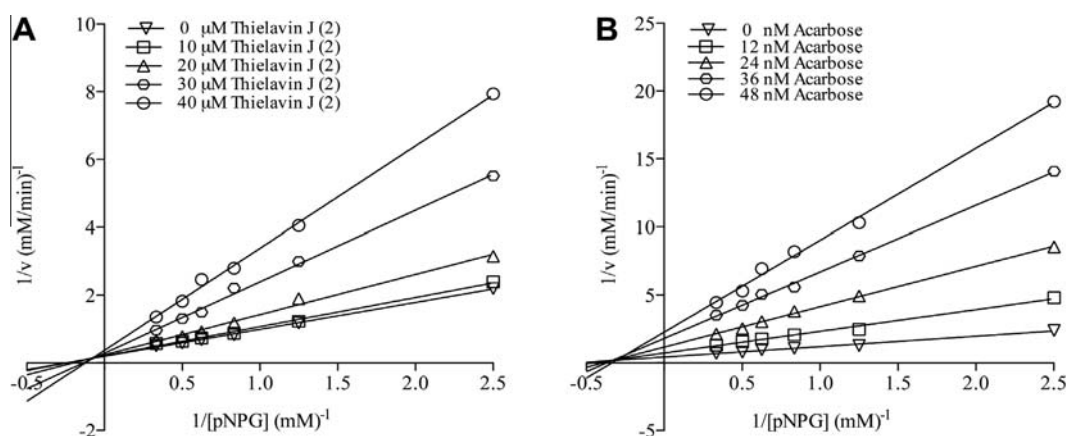


Fig. 2. Lineweaver–Burk plots of α GHBs inhibition at different concentrations of substrate and (A) thielavin J (2) and (B) acarbose.

and Arg-315. Hydrogen bonds were observed between Ser-240, Ser-241 and Asp-242 and the carboxylic acid residue of 1–3; in addition, the carbonyl ester of the middle C₆–C₁ unit in compounds 1 and 3 displayed hydrogen bond with Arg-315. The theoretical k_i values for 1–3 were 11.4, 1.1 and 4.9 μ M, respectively. Fig. 4 summarizes the information for compound 3, and Figs. S14 and S15 illustrated the results for 1 and 2, respectively.

The theoretical and experimental studies indicated that thielavins 1–3 interacted with α GHBs and α GHY in the same pocket as acarbose adopting a similar conformation as the pseudotetrasaccharide. Furthermore, the *in silico* results supported the outcomes from the experimental kinetic analysis.

2.4. *In vivo* assays for anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect

Thielavin K (3), the major tridepside produced by the fungus, was next evaluated to assess its potential antihyperglycemic action using an oral sucrose tolerance test (OSTT) *in vivo*. The OSTT is usually performed to evaluate intestinal α -glucosidase inhibition *in vivo*. Two sets of animals, healthy and diabetic mice were used. Experimental type-II DM was achieved by treating mice with streptozotocin (STZ, 120 mg/kg) 15 min after an injection of nicotinamide (NA, 50 mg/kg). This preliminary treatment with NA provokes partial protection against the cytotoxic action of STZ by scavenging free radicals and causes only minor damage to pancreatic β -cell mass creating a diabetic syndrome close to type-II DM (Masiello et al., 1998). This model has recently proven to be a valuable tool for investigation of new antidiabetic agents.

Compound 3 was evaluated at a dose range from 3.1 to 31.6 mg/kg. The results of these experiments indicated that 3 decreased glucose blood levels (postprandial peak; $p \leq 0.05$) 30 min after oral administration of the sucrose load (3.0 g/kg) in normal mice (Fig. S16) at all doses tested. In NA-STZ diabetic mice only the highest dose (31.6 mg/kg) provoked a significant decrease of blood glucose levels (Fig. 5). The inhibition of postprandial peak was comparable to that of acarbose, used as positive control.

Thielavin K (3) was also tested in an acute hypoglycemic experiment *in vivo*. The results indicated that thielavin K (3) at the doses of 3.1 and 10 mg/kg decreased blood glucose levels in normal and diabetic mice (Figs. S17 and 6, respectively). In both cases the effect was attained after 5 h and maintained throughout the experiment. Glibenclamide (GLI) was used as positive control in this test.

The results *in vivo* suggest that compound 3 shows potential as antidiabetic agent acting at different targets, namely inhibiting the α -glucosidases at the intestinal levels and other mechanisms yet to be established. In this regard, Sakemi and coworkers (2002) previously demonstrated that 3 inhibited *in vitro* glucose-6-phosphatase (G6Pase); thus, the hypoglycemic effect *in vivo* demonstrated in our study might be also related with the inhibition of G6Pase, which in turn would provoke an important decrease of hepatic glucose output from glyconeogenesis and glycogenolysis.

3. Concluding remarks

Endophytic fungus MEXU 27095 associated with *H. latiflora* biosynthesizes tridepsides 1–3 of the thielavins family. These com-

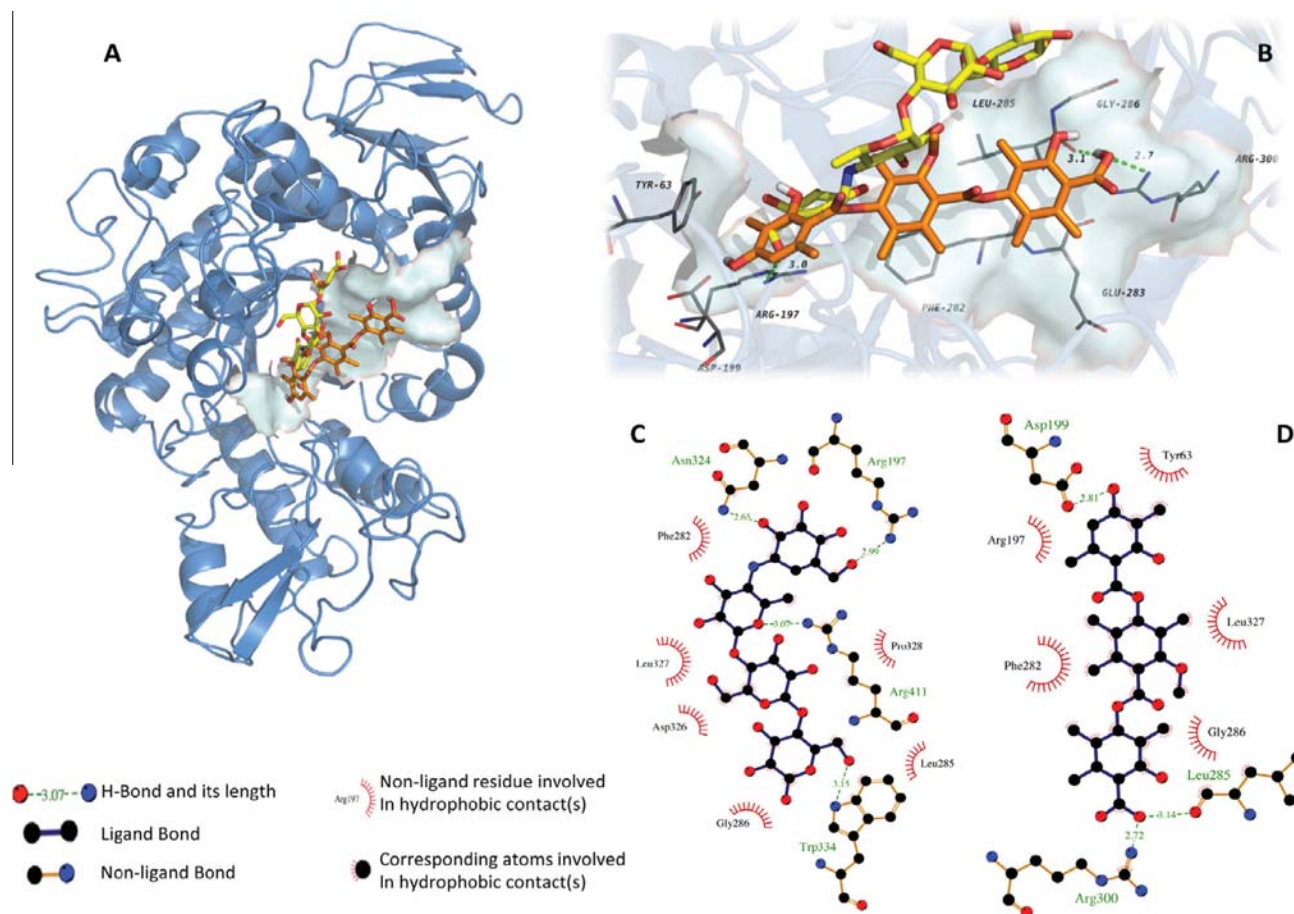


Fig. 3. (A) Structural model of the complex thielavin K (**3**) (orange sticks)- α GHBs and acarbose (yellow sticks)- α GHBs. (B) 3D Representation of the interaction between thielavin K (**3**), acarbose and α GHBs in the binding site predicted. (C) 2D Representation of the interactions among α GHBs and acarbose. (D) 2D Representation of the interactions among α GHBs and thielavin K (**3**). Graphics generated with PyMol and LigPlot. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pounds showed a high potential as inhibitors of α GHY. Molecular docking of thielavins **1–3** with α GHY predicted that these compounds adopt a similar conformation and bind in a similar site as acarbose. *In vivo* evaluation of **3** showed that this compound decreased fasting and postprandial glucose levels in a T1D-DM animal model. Thus thielavin-type tridepsides represent a new class of α -glucosidase inhibitors. Likewise our results confirmed that endophytic fungi from medicinal plants are good sources for the discovery of new leads for drug development.

4. Experimental

4.1. Reagents

p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG), streptozotocin 98%, nicotinamide, glibenclamide, sucrose, acarbose, and α -glucosidases from *Bacillus stearothermophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* were purchased from Sigma–Aldrich St. Louis, MO, USA. All other chemicals used in this study were of analytical grade.

4.2. General experimental procedures

IR spectra were obtained using a Perkin-Elmer Spectrophotometer 400 FT-IR. NMR spectra including HSQC, and HMBC were recorded in MeOH- d_4 or in a mixture of CDCl₃-MeOH- d_4 (7:3) using a Varian Inova 500 spectrometer at 500 (¹H) and 125 MHz (¹³C), with tetramethylsilane (TMSi) as an internal standard; chemical shifts were recorded as δ values. Electrospray ionization mass

spectra were recorded on a Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS (Fourier Transform Mass Spectrometer) in the positive or negative ionization mode. HPLC separations were performed using a Symmetry RP column [7.8 \times 300 mm, and 3.0 ml/min] and CH₃CN (acidified with HCO₂H at 0.5%). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic output was performed by the Empower[®] 2 software program (Waters). The absorbance in the enzymatic assay was determined at 405 nm in a BIO-RAD microplate reader model 680. Column chromatography (CC) was carried out on either Sephadex[®] LH-20 (Sigma–Aldrich–Fluka) or silica gel 60 (70–230 mesh, Merck). Thin layer chromatography (TLC) analyses were carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using ceric sulphate (10%) solution in H₂SO₄ as color reagent.

4.3. Plant material

H. latiflora leaves were collected and identified by Sol Cristians-Niizawa in Huetamo (18°31.709'N, 101°4.692'W; 221 masl), State of Michoacán, México, in July 2010. A voucher specimen (131,316) was deposited at the Herbarium of the School of Sciences (FCME), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.

4.4. Fungus isolation and identification

The endophytic fungus MEXU 27905 was isolated from selected healthy leaves of *H. latiflora*. A strong surface sterilization protocol was applied to 1 g of leaves (Rodríguez et al., 2009). Complete in-

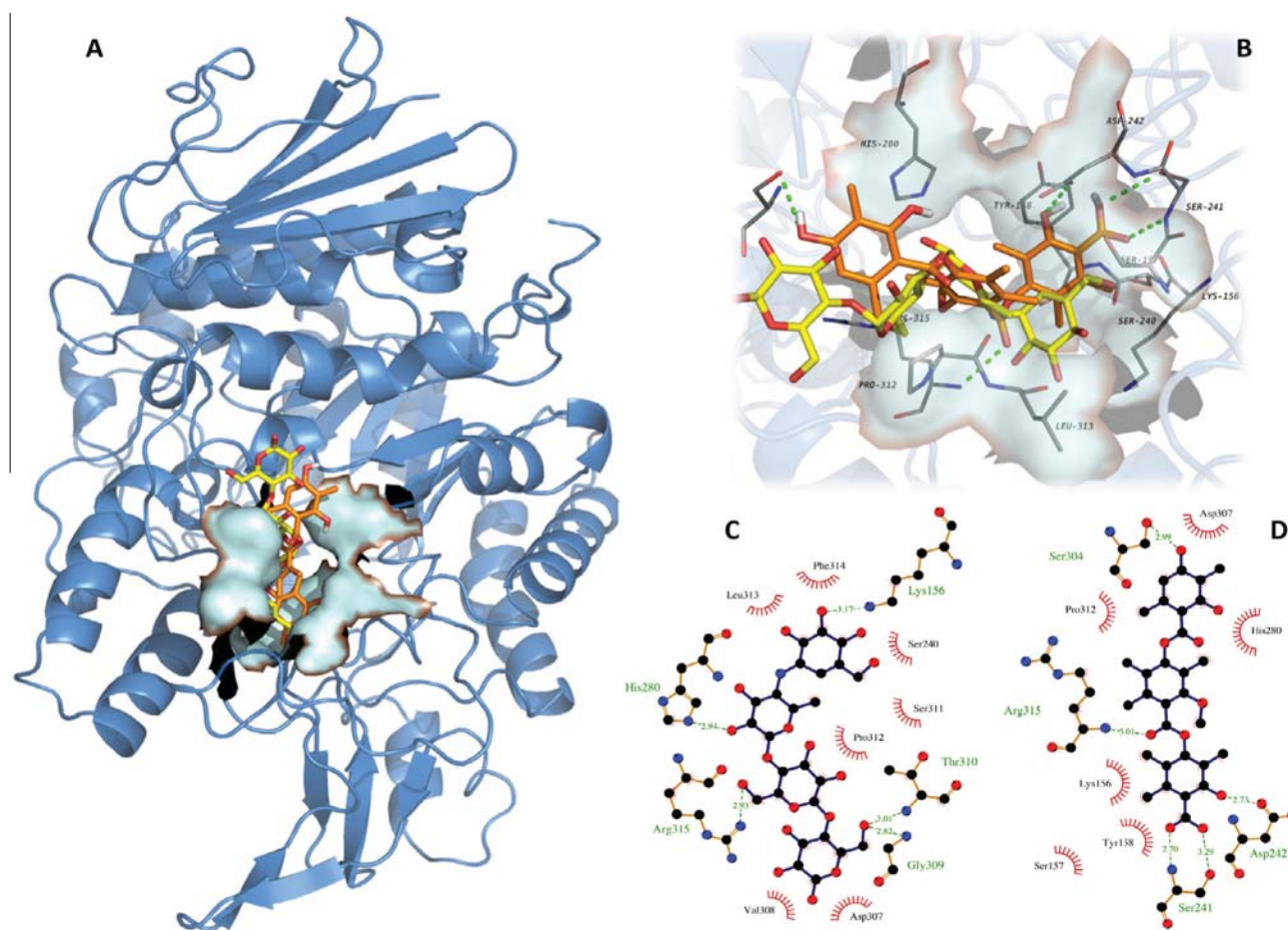


Fig. 4. (A) Structural model of the complex thielavin K (**3**) (orange sticks)- α GHY and acarbose (yellow sticks)- α GHY. (B) 3D Representation of the interaction between thielavin K (**3**), acarbose and α GHY in the binding site predicted. (C) 2D Representation of the interactions between α GHY and acarbose (2D). (D) 2D Representation of the interactions between α GHY and thielavin K (**3**). Graphics generated with PyMol and LigPlot. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

tact leaves were immersed in EtOH-H₂O (50 ml, 75:25, v/v) (1 min), 3.4% aqueous NaOCl solution (10 min) and EtOH-H₂O (50 ml, 75:25, v/v) (1 min); afterward the sterilized leaves were rinsed with sterile distilled H₂O and dried with sterile absorbent paper. Sterilized leaves were cut into 5 × 5 mm pieces and deposited on a Petri dish (3–5 pieces by plate) containing PDA (potato-

dextrose agar; Difco) and streptomycin sulfate (4 μg/ml) and cyclosporine A (5 μg/ml). The pure fungal strain was obtained after serial transfers on PDA and was deposited in the fungal collections of the Herbario Nacional de Mexico (MEXU) under the accession number of MEXU 27095. Sequence data (28S ribosomal RNA and internal transcribed spacer (ITS) region) were deposited in GenBank as accessions JX292135 and JX292136, respectively. Data available at GenBank aligning with MEXU 27905 suggested this fungus is a member of the Chaetomiaceae (Fig. S18).

4.5. Fermentation, extraction and isolation

MEXU 27095 was cultured in 15 Petri dishes containing 120 ml of solid media PDA. After 20 days of fungal growth at 25 °C, the culture media was extracted exhaustively with CH₂Cl₂-MeOH 9:1 (3 × 2 L) and the resulting extract was evaporated *in vacuo* to yield a brown solid residue (4.1 g). The crude extract was fractionated by open silica-gel cc, eluting with a gradient of hexane-CH₂Cl₂ (10:0 → 0:10) and CH₂Cl₂-MeOH (10:0 → 5:5), respectively. Each fraction was monitored by TLC, and fractions with similar patterns were combined to yield six primary fractions (F_I-F_{VI}). F_{VI} (500 mg), the most active fraction (98.9% of inhibition) in a preliminary α -glucosidase inhibition test using α GHY (Oki et al., 1999), was subjected to open Sephadex[®] LH-20 cc eluting with MeOH to yield four secondary fractions (F_{VI-1}-F_{VI-4}). The resolution of fraction F_{VI-4} (390 mg) by reversed phase HPLC led to the isolation of thielavin A (**1**, 31.3 mg), thielavin J (**2**, 60.2 mg) and thielavin K (**3**,

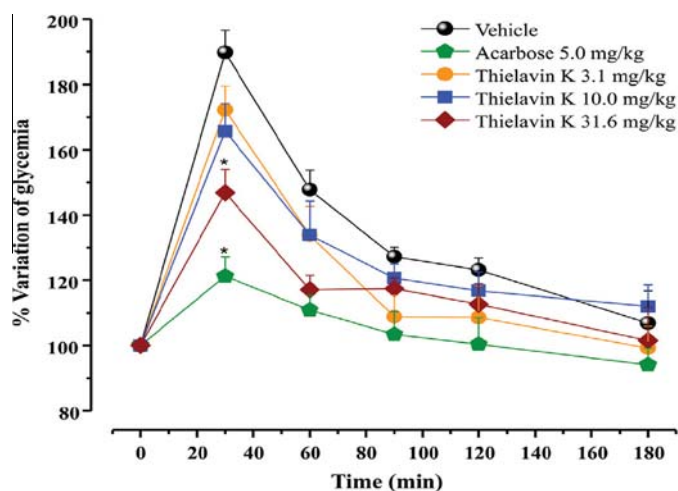


Fig. 5. Influence of thielavin K (**3**) on blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice during an OSTT. **p* < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t* test.

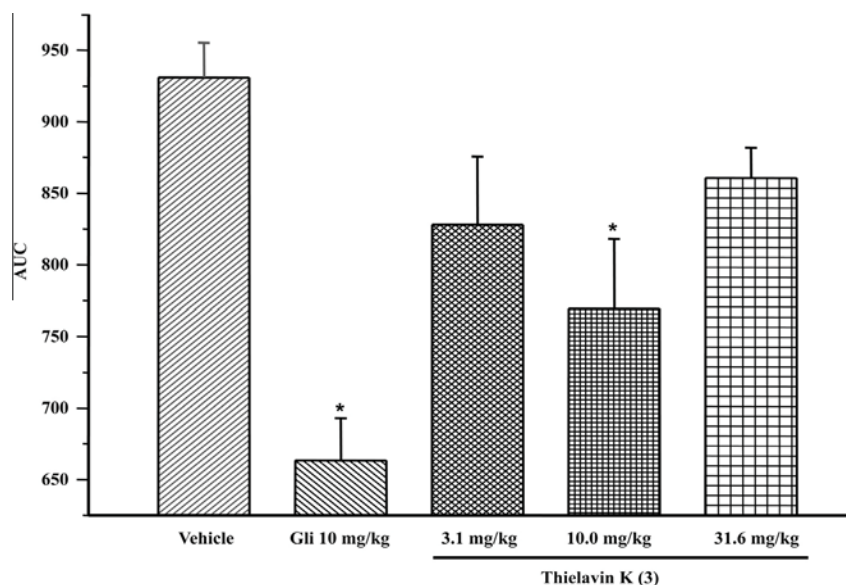


Fig. 6. Influence of thielavin K (3) on blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice using the acute hypoglycemic test. Each value is the mean \pm SEM for six mice in each group. * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test.

68.5 mg) as glassy solids. Their IR, NMR and MS were identical to those previously reported (Kitahara et al., 1981; Sakemi et al., 2002).

4.6. Assay for α -glucosidase inhibitors

The fungal extract, fractions, compounds **1–3** and acarbose (positive control) were dissolved in either MeOH or phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH 7). Aliquots of 0–10 μ l of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20 μ l of enzyme stock solution (0.4 units/ml of α GHBs or 0.75 units/ml of α GHY in PBS). After incubation, 10 μ l of substrate [*p*NPG, 10 mM for α GHBs and 5 mM for α GHY] was added and incubated for 20 min at 37 °C. Absorbance at 405 nm was then determined (Oki et al., 1999).

The inhibitory activity of the fungal extract and fractions was determined as a percentage in comparison to a blank according with the following equation:

$$\% \alpha \text{GHY} = \left(1 - \frac{A_{405t}}{A_{405c}} \right) \times 100\%$$

where $\% \alpha \text{GHY}$ is the percentage of inhibition, A_{405t} is the corrected absorbance of extract, fraction or compound under testing ($A_{405end} - A_{405initial}$) and A_{405c} is the absorbance of blank ($A_{405endblank} - A_{405initialblank}$). The concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50% (IC_{50}) was calculated by regression analysis (Figs. S7 and S8), using the following equation:

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

where A_{100} is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC_{50} is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and s is the cooperative degree (Copeland, 2000).

The mode of inhibition of α -glucosidase was determined by the Lineweaver–Burk plots. Dixon plots were used to determine the inhibitory constants. The inhibition is described by the following equation:

$$V = \frac{V_{max}S}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i} \right) + s \left(1 + \frac{[I]}{\alpha k_i} \right)}$$

where v is the initial velocity in the absence and presence of the inhibitor, S and I respectively are the concentration of substrate and inhibitor, V_{max} is the maximum velocity, k_m is the Michaelis–Menten constant, k_i is the competitive inhibition constant, and αk_i is the uncompetitive inhibition constant. The kinetic data were analyzed using Origin 8.0 software.

4.7. Computational methods

4.7.1. Proteins

A three dimensional model of α GHBs was built by comparative modeling using the SWIS-MODEL program (automated protein structure homology-modeling server; <http://swissmodel.expasy.org>). The crystallographic structure of the related GH-13 α -glycosidase from *Geobacillus* sp. strain HTA-462 (PDB: 2ZE0; Shirai et al., 2008) was selected as template due to its highest sequence identity (94%) with respect to α GHBs. The homology modeling begins with the retrieval of the amino acid sequence of *B. stearothermophilus* exo- α -glycosidase (EC 3.2.1.20) which comprises 555 amino acid residues (GenBank accession: D84648.1; NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The modeled protein was optimized geometrically with the program HyperChem 8 and validated using the ProCheck (stereochemical quality analysis software) program (Laskowski et al., 1993, 1996). Yeast isomaltase (α GHY) crystallographic structure was downloaded from the Protein Data Bank site (PDB: 3A4A). Subsequently all hydrogen and Kolleman charges were assigned to both receptors using AutoDockTools 1.5.4. The files were saved in proper format for use with Autogrid4.0 and AutoDock4.0 systems.

4.7.2. Ligands

Compounds **1–3** were built using the program Spartan'02 (www.wavefunction.com) and optimized geometrically using the program Gaussian 09, revision A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA) at DFT B3LYP/DGDZVP level of theory. The ligands were prepared by assigning the Gasteiger–Marsilli atomic charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.4 (<http://mg1-tools.scripps.edu/>).

4.7.3. Docking

Binding pockets of enzymes and docking simulation were predicted using AutoDock 4.0 (<http://autodock.scripps.edu/>; (Morris et al., 1998; Rudnitskaya et al., 2010; Çifci et al., 2012)). Initially, a blind docking was performed at the interface as the first ligand binding position; then, the best energy result of the previous procedure was used as initial conformation to undertake simulation. Docking studies were done with Lamarckian Genetic Algorithm (LGA). Grid box for docking was set around central atom of the ligand with dimension of $40 \times 40 \times 40$ Å. Parameters were set to a LGA calculation of 250 runs, whereas energy evaluations were set to 2,500,000 and 27,000 generations (repetition of process). The obtained docked poses were analyzed with AutoDockTools using cluster analysis, PyMOL (De Lano and Scientific, 2002) and LIGPLOT⁺ (www.ebi.ac.uk).

4.8. In vivo assays for anti-hyperglycemic and hypoglycemic actions

4.8.1. Experimental animals

All animal assays were conducted both in normoglycemic and diabetic mice (Verspohl, 2002; Escandón-Rivera et al., 2012). Male ICR mice, weighing 20–25 g and 20–25 days old, were obtained from Centro UNAM Harlan (Harlan México, SA de CV). All procedures involving animals were conducted in agreement with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. The animals were contained in groups of eight under standard laboratory conditions (12 h light-dark cycle under controlled temperature, 22 ± 1 °C) and maintained on a standard pellet diet and water *ad libitum*.

4.8.2. Preparation of the test samples

Thielavin K (**3**) was suspended in saline solution. Glibenclamide (10 mg/kg) was used as hypoglycemic control drug. Acarbose (5 mg/kg) was used as an anti-hyperglycemic drug. Sucrose (3 g/kg) was used for the carbohydrate tolerance test. Control mice group received only saline solution. All animals were orally administered (Escandón-Rivera et al., 2012).

4.8.3. Induction of type II DM (experimental model)

Type II DM was induced by i.p. administration of freshly prepared STZ (120 mg/kg) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, 15 min after an injection of NA (50 mg/kg) dissolved in distilled water as previously described (Escandón-Rivera et al., 2012).

4.8.4. Collection of blood samples and determination of blood glucose levels

Blood samples were collected from the caudal vein by means a small incision at the end of the tail. Blood glucose levels (mg/dl) were estimated by the enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, CA, USA). The percentage variation of glycaemia for each group was calculated with respect to the initial (0 h) level, according to the following equation, where G_i is initial glycaemia value and G_t is the glycaemia value after treatment administration (Verspohl, 2002):

$$\% \text{Variation of glycaemia} = \left(\frac{G_t}{G_i} \right) 100$$

4.8.5. Acute hypoglycemic assay

Normal and diabetic animals were placed in acrylic boxes in groups of six deprived of food but free access to water 4 h before experimentation. Thielavin K (**3**) was orally administered (3.1, 10.0 y 31.6 mg/kg of body wt) to three different groups of animals;

GLI (10 mg/kg) and saline solution were given as positive control and vehicle, respectively to two other groups of animals. Glibenclamide and **3** were suspended in the vehicle. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7 and 9 h after administrations (Escandón-Rivera et al., 2012). Area under the curve (AUC) was calculated applying the following equation:

$$\text{AUC} = \Sigma \left(\frac{\% \text{VG}_{T1} + \% \text{VG}_{T2}}{2} \right) (T_2 - T_1)$$

where $\% \text{VG}_{T1}$ and $\% \text{VG}_{T2}$ represent the percentage variation of glycaemia at 0, 1.5, 3, 5, 7 and 9 h after oral sucrose feeding to mice.

4.8.6. Oral sucrose tolerance test

Both groups of mice (normal and diabetic) were placed in acrylic boxes forming groups of six animals (I–V). Group I was administrated with the vehicle; group II received acarbose; group III to V received different amounts of thielavin K (**3**) (3.1, 10.0 and 31.6 mg/kg of body wt). Time 0 min was measured before treatment with compound **3** or control; 30 min later a sucrose load (3.0 g/kg) was given to the animals. Blood samples were obtained 30, 60, 90, 120, and 180 min after the carbohydrate load.

4.8.7. Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of six animals in each group. Analysis of variance (ANOVA, one way) was used to analyze changes in the percentage variation of glycaemia followed by Dunnett's test; $p < 0.05$ was considered statistically significant. Sigma stat software was used for data analysis.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from CONACyT (99395). We thank G. Duarte, M. Guzmán, M. Gutierrez, I. Rivero, A. Pérez, G. Anaya and S. Cristians for their valuable technical assistance. J. Rivera-Chávez acknowledges a fellowship from CONACyT to pursue graduate studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.021>.

References

- Benalla, W., Bellahcen, S., Bnouham, M., 2010. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Curr. Diabetes Rev.* 6, 247–254.
- Chen, L., Magliano, D.J., Zimmet, P.Z., 2011. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nature Publishing Group* 8, 228–236.
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, second ed. Wiley-VCH.
- Çifci, G., Aviyente, V., Akten, E.D., 2012. Molecular Docking study based on pharmacophore modeling for novel phosphodiesterase IV inhibitors. *Mol. Inf.* 31, 459–471.
- De Lano, W., Scientific, L.D., 2002. De Lano: PyMOL version 0.99, DeLano Scientific.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R., 2012. α -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *J. Nat. Prod.* 75, 968–974.
- Guerrero-Analco, J., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry* 68, 2087–2095.
- Israili, Z.H., 2011. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* 18, 117–152.
- Kitahara, N.N., Endo, A.A., Furuya, K.K., Takahashi, S.S., 1981. Thielavin A and B, new inhibitors of prostaglandin biosynthesis produced by *Thielavia terricola*. *J. Antibiot.* 34, 1562–1568.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.

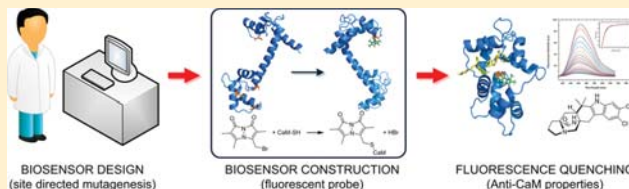
- Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., Thornton, J.M., 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* 8, 477–486.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J. Nat. Prod.* 130304132955004.
- Miller, K.L., Qing, C., Sze, D.M.-Y., Roufogalis, B.D., Neilan, B.A., 2012. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. *Microb. Ecol.* 64, 431–449.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.
- Nakai, H., Okuyama, M., Kim, Y., Saburi, W., Wongchawalit, J., Mori, H., Chiba, S., Kimura, A., 2005. Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia, Bratislava* 60, 131–135.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase, inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 550–553.
- Rodríguez, R.J., White Jr., J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314–330.
- Rudnitskaya, A., Török, B., Török, M., 2010. Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 38, 261–265.
- Sakemi, S.S., Hirai, H.H., Ichiba, T.T., Inagaki, T.T., Kato, Y.Y., Kojima, N.N., Nishida, H.H., Parker, J.C.J., Saito, T.T., Tonai-Kachi, H.H., VanVolkenburg, M.A.M., Yoshikawa, N.N., Kojima, Y.Y., 2002. Thielavins as glucose-6-phosphatase (G6Pase) inhibitors: producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot.* 55, 941–951.
- Scully, T., 2012. Diabetes in numbers. *Nature* 485, S2–S3.
- Segel, I.H., 1993. *Enzyme Kinetics*. Wiley-Interscience.
- Shirai, T., Hung, V.S., Morinaka, K., Kobayashi, T., Ito, S., 2008. Crystal structure of GH13 α -glucosidase GSJ from one of the deepest sea bacteria. *Proteins* 73, 126–133.
- Sim, L., Jayakanthan, K., Mohan, S., Nasi, R., Johnston, B.D., Pinto, B.M., Rose, D.R., 2010. New glucosidase inhibitors from an Ayurvedic herbal treatment for type 2 diabetes: structures and inhibition of human intestinal maltase-glucoamylase with compounds from *Salacia reticulata*. *Biochemistry* 49, 443–451.
- Suzuki, Y., Shinji, M., Eto, N., 1984. Assignment of a *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranosidase of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12016 to a novel exo- α -1,4-glucosidase active for oligomaltosaccharides and α -glucans. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Struct. Mol. Enzymol.* 787, 281–289.
- Takii, Y., Takahashi, K., Yamamoto, K., Sogabe, Y., Suzuki, Y., 1996. *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 α -glucosidase specific for α -1,4 bonds of maltosaccharides and α -glucans shows high amino acid sequence similarities to seven α -D-glucohydrolases with different substrate specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 629–634.
- Tsujimoto, Y., Tanaka, H., Takemura, R., Yokogawa, T., Shimonaka, A., Matsui, H., Kashiwabara, S.I., Watanabe, K., Suzuki, Y., 2007. Molecular determinants of substrate recognition in thermostable α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 13. *J. Biochem.* 142, 87–93.
- Verspohl, E.J., 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med.* 68, 581–590.
- Wardrop, D.J., Waidyarachchi, S.L., 2010. Synthesis and biological activity of naturally occurring α -glucosidase inhibitors. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1431.
- Xu, H., 2010. Inhibition kinetics of flavonoids on yeast-glucosidase merged with docking simulations. *Protein Pept. Lett.* 17, 1270–1279.

Calmodulin Inhibitors from Natural Sources: An Update[#]

Rachel Mata,^{*,†} Mario Figueroa,[†] Martín González-Andrade,[‡] José Alberto Rivera-Chávez,[†] Abraham Madariaga-Mazón,[†] and Paulina Del Valle[†]

[†]Facultad de Química and [‡]Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

ABSTRACT: Calmodulin (CaM) plays a central role in regulating a myriad of cellular functions in physiological and pathophysiological processes, thus representing an important drug target. In previous reviews, our group has reported relevant information regarding natural anti-CaM compounds up to 2009. Natural sources continue to provide a diverse and unique reservoir of CaM inhibitors for drug and research tool discovery. This review provides an update of natural products with reported CaM inhibitory properties, which includes around 70 natural products and some synthetic analogues, belonging to different structural classes. Most of these natural inhibitors were isolated from fungi and plants and belong to the stilbenoid, polyketide, alkaloid, and peptide structural classes. These products were discovered mainly using a fluorescence-based method on rationally designed biosensors, which are highly specific, low-cost, and selective and have short reaction times. The effect of several antimetabolic drugs on Ca²⁺-hCaM is also described.



■ INTRODUCTION

Calmodulin (CaM) is the most important intracellular Ca²⁺-binding protein in eukaryotic organisms. From the structural point of view, it is a small protein with only 148 amino acid residues arranged in two globular domains (N- and C-terminals), each one with two Ca²⁺-binding sites. Both domains are connected by a flexible linker, which is involved in the interactions of CaM with its target proteins and antagonists.¹ CaM plays a central role in regulating a myriad of cellular functions in physiological and pathophysiological processes. Thus, CaM is involved in cell motility, cytoskeleton architecture and function, cell proliferation, apoptosis, autophagy, metabolic homeostasis, phosphorylation/dephosphorylation of proteins, ion channel function, reproductive processes, smooth muscle contraction–relaxation, and gene expression, to mention a few. CaM controls all these events through the modulation of more than 100 different proteins including enzymes such as calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1), nitric oxide synthases (NOS), several kinases, ion channels, and phosphatases, among others. Moreover, CaM has been associated with several pathological conditions including unregulated cell growth and smooth muscle malfunctions.² For example, recent findings have shown that most types of cancer are associated with elevated levels of Ca²⁺-bound CaM (Ca²⁺-CaM) and that some of its antagonists inhibit tumor cell invasion in vitro and metastasis in vivo.² As a consequence, this protein represents a potential drug target, and those agents that interfere with its modulatory properties can be considered CaM antagonists, which are also valuable tools for the study of physiological processes where the protein is involved.

A few structurally diverse natural products are CaM antagonists or inhibitors of the complexes this protein forms with its target enzymes. These products have been isolated

from a wide variety of organisms from the Fungi, Animalia, Protista, and Plantae kingdoms. In previous reviews our group has reported the most relevant information regarding anti-CaM compounds from natural sources up to 2009.^{3,4} Herein, this information has been updated, emphasizing our own work.

■ ASSAYS FOR DISCOVERING CAM INHIBITORS

CaM antagonists have been detected by several methods. The most widely used include functional enzymatic assays (FEA),^{5,6} gel electrophoresis,⁷ affinity chromatography,^{7,8} site-directed mutagenesis,⁹ X-ray crystallography,^{10,11} circular dichroism,⁸ nuclear magnetic resonance spectroscopy,^{12,13} small-angle neutron scattering,^{14,15} isothermal titration calorimetry,^{16,17} localized surface plasmon resonance,¹⁸ dual polarization interferometry,¹⁹ intensity-fading matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (IF-MALDI-MS),²⁰ and fluorescence-based methods including bioengineered biosensors.^{21–26} The fluorescence-based methods are highly specific, low-cost, and selective and have short reaction times. In our studies, we have employed FEA with PDE1 as reporter enzyme, gel electrophoresis, and fluorescent biological sensors built with human CaM (hCaM). Our devices have been produced in *Escherichia coli* BL21-AI and engineered by rational design, replacing methionine, leucine, valine, or threonine in different positions by cysteine using site-directed mutagenesis; the resulting proteins were purified by hydrophobic exchange chromatography.^{24–26} Thereafter, a thiol reactive fluorophore [i.e., monobromobimane (*mBB*) or Alexa Fluor 350 (*AF*₃₅₀)] was covalently attached to the cysteine residue as a fluorescent

Special Issue: Special Issue in Honor of William Fenical

Received: November 28, 2014

Scheme 1

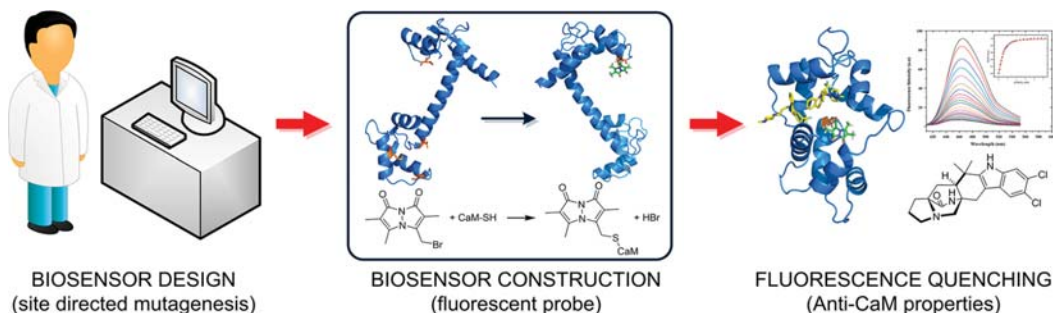
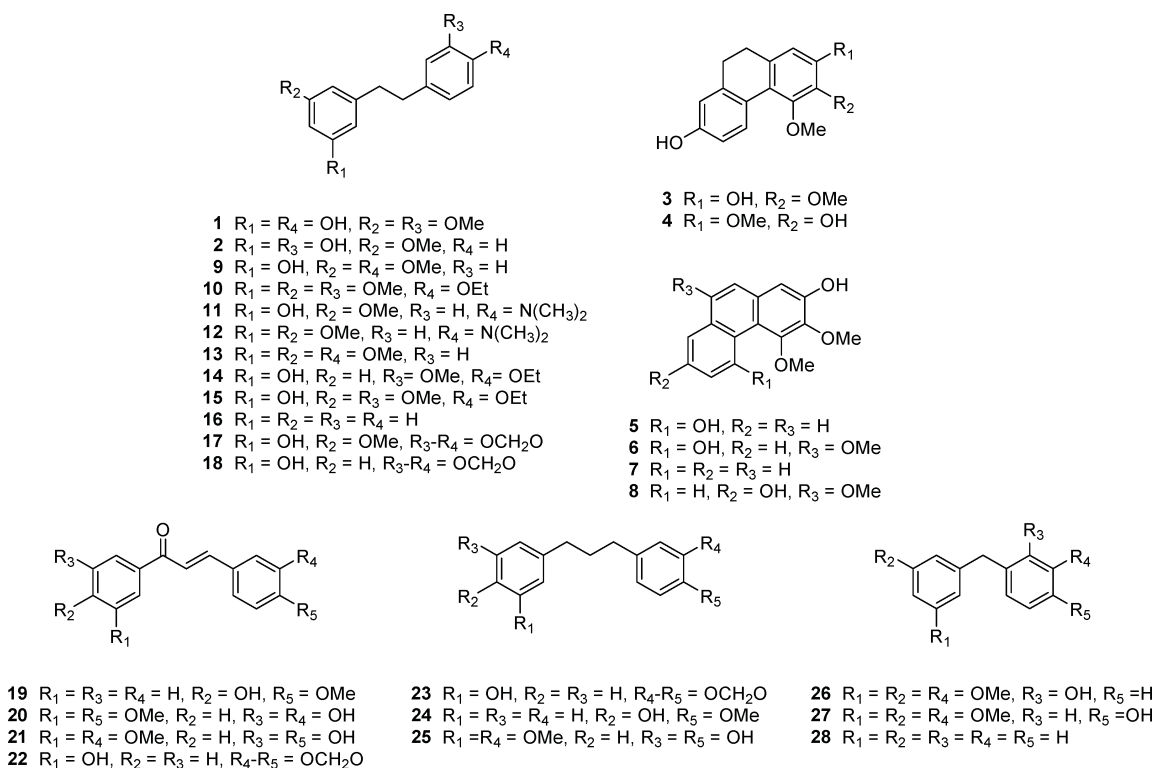


Chart 1



probe (Scheme 1). With these molecular tools it has been possible to correlate the conformational changes upon ligand binding to CaM with the changes in the emission properties of the labeled protein. Biosensor *hCaM M124C-mBBR* was built initially because the microenvironment surrounding methionine 124 is very susceptible to classical CaM inhibitors such as chlorpromazine (CPZ) and trifluorperazine (TFP).²⁴ Afterward, other devices were built including *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR*,²⁵ *hCaM M124C-AF₃₅₀*,²⁶ *hCaM V91C-mBBR*,²⁷ and *hCaM T110C-mBBR*.²⁸ The *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR* is suitable for detecting classical and nonclassical inhibitors of CaM because the labeled recognition fluorophores are strategically located, and upon any ligand binding, quenching of the fluorescence will always be detected. Biosensor *hCaM T110C-mBBR* is appropriated for testing nonclassical inhibitors since the fluorophore probe is located at the flexible linker, far from sites where TFP interacts. Finally, *hCaM M124C-AF₃₅₀* was designed as an alternative to detect colorful classical CaM inhibitors without interfering with the response of the biosensor. Measurements with all these

biosensors are carried out in solution, quantitatively or qualitatively, as well as with high sensitivity and specificity.

■ STILBENOIDS FROM SELECT ORCHIDS

As part of our program to demonstrate the preclinical efficacy of selected Mexican medicinal plants, it was demonstrated that the extracts from the orchids *Scaphyglottis livida* (Lindl.) Schltr., *Maxillaria densa* Lindl., and *Nidema boothii* (Lindl.) Schltr. induced relaxation of the spontaneous contractions of the guinea-pig or rat ilea using ex vivo models. The IC₅₀ values of these extracts ranged from 0.62 to 6 μg/mL, with maxima effects up to 90%.^{29–32} Bioassay-guided fractionation of the active extracts allowed the isolation of a few bioactive bibenzyls and phenanthrenes. These metabolites also inhibited the spontaneous contractions of the isolated rat or guinea-pig ilea in a concentration-dependent form with IC₅₀ values ranging from 0.33 to 7 μM.^{4,29–31} The studies conducted to determine their smooth muscle-relaxant mechanism revealed that their effects did not involve a direct interaction on the receptors of common transmitters nor any interference with Ca²⁺ influx in

Table 1. Calmodulin Inhibitors Obtained from Selected Fungi and Plants and by Synthesis As Detected by Fluorescence-Based Methods Using *hCaM M124C-mBBR*, *hCaM L39C-mBBR/V91C-mBBR*, *hCaM M124C-AF₃₅₀*, *hCaM V91C-mBBR*, and *hCaM T110C-mBBR* Biosensors and Docking Analysis

compound	K_d^a (μM)	K_i^b (μM)	source	ref(s)
gigantol (1)	60.8	37.0	<i>S. livida</i> , <i>N. boothi</i>	29, 31
ephemerantol B (3)	1.1	565.0	<i>N. boothi</i> , <i>M. densa</i>	30, 31
erianthridin (4)	1.4	160.0	<i>M. densa</i>	30
2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (5)	2.2	22.1	<i>S. livida</i> , <i>M. densa</i>	29, 30
fimbriol-A (6)	1.7	65.4	<i>M. densa</i>	30
nudol (7)	1.5	42.8	<i>M. densa</i>	30
gymnopusin (8)	0.19	275.0	<i>M. densa</i>	30
3-methoxy-5-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]phenol (9)	80.0	109.7	synthesis	35
4-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-1-ethoxy-2-methoxybenzene (10)	9.9	85.3	synthesis	35
3-[2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethyl]-5-methoxyphenol (11)	12.0	98.1	synthesis	35
<i>N</i> -{4-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]phenyl}- <i>N,N</i> -dimethylamine (12)	10.0	100.1	synthesis	35
1,3-dimethoxy-5-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]benzene (13)	21.8	88.9	synthesis	35
3-[2-(4-ethoxy-3-methoxyphenyl)ethyl]phenol (14)	58.1	109.7	synthesis	35
3-[2-(4-ethoxy-3-methoxyphenyl)ethyl]-5-methoxyphenol (15)	25.3	124.2	synthesis	35
diphenylethane (16)	NB ^c	113.4	synthesis	35
3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)ethyl]-5-methoxyphenol (17)	45.5	35.2	synthesis	35
3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)ethyl]phenol (18)	63.8	13.8	synthesis	35
(2 <i>E</i>)-1-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (19)	10.3	16.2	synthesis	35
(2 <i>E</i>)-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (20)	3.9	35.6	synthesis	35
(2 <i>E</i>)-1-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (21)	5.3	23.7	synthesis	35
(2 <i>E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(3-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (22)	ND ^d	13.5	synthesis	35
4-[3-(4-methoxyphenyl)propyl]phenol (23)	8.7	36.8	synthesis	35
4-[3-(1,3-benzodioxol-5-yl)propyl]phenol (24)	14.2	27.1	synthesis	35
4-[3-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)propyl]-2-methoxyphenol (25)	54.3	88.7	synthesis	35
2-(3,5-dimethoxybenzyl)-6-methoxyphenol (26)	33.8	116.8	synthesis	35
4-(3,5-dimethoxybenzyl)-2-methoxyphenol (27)	33.1	80.0	synthesis	35
diphenylmethane (28)	NB ^c	73.5	synthesis	45
malbrancheamide (29)	1.1	0.20	<i>M. aurantiaca</i>	39, 41
malbrancheamide B (30)	4.8	0.50	<i>M. aurantiaca</i>	41
isomalbrancheamide B (31)	4.8	0.50	<i>M. aurantiaca</i>	41
15-chlorotajixanthone (33)	0.03	ND ^d	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
14-methoxytjixanthone (34)	4×10^{-3}	0.03	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
shamixanthone (35)	0.24	0.08	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
tajixanthone hydrate (36)	0.09	8×10^{-3}	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
15-acetyltajixanthone hydrate (37)	0.50	3×10^{-3}	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
16-chlorotajixanthone (38)	7.3	0.08	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
tajixanthone (39)	4×10^{-3}	0.05	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
emericeillin (40)	7×10^{-3}	0.14	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
variecoxanthone A acetate (41)	0.12	0.28	<i>Emericella</i> sp. 25379	25, 43
acremoxanthone C (42)	0.02	0.41	<i>P. lilacinum</i>	28
acremonidin A (43)	0.02	0.37	<i>P. lilacinum</i>	28
vermelhotin (44)	0.25	168.0	endophyte MEXU 26346	46
5-hydroxy-2,7-dimethoxy-8-methylnaphthoquinone (45)	1.6	ND ^d	<i>S. minimoides</i>	27
emodin (46)	0.33	4.7	<i>A. stromatoides</i>	47
ω -hydroxyemodin (47)	0.76	5.3	<i>A. stromatoides</i>	47
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4 <i>H</i> -2,3-dihydronaphtho[2,3- <i>b</i>]-pyran-4-one (48)	0.22	34.9	<i>G. polythrix</i>	49, 50
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-4 <i>H</i> -2,3-dihydronaphtho[2,3- <i>b</i>]-pyran-4-one (49)	0.39	13.5	<i>G. polythrix</i>	49, 50
(2 <i>S</i>)-5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4 <i>H</i> -2,3-dihydronaphtho[2,3- <i>b</i>]-pyran-4-one (50)	2.2	52.1	<i>G. polythrix</i>	49, 50
(2 <i>S</i>)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2-methyl-4 <i>H</i> -2,3-dihydronaphtho[2,3- <i>b</i>]-pyran-4-one (51)	NB ^c	ND ^d	<i>G. polythrix</i>	49, 50
5-hydroxy-6,8-dimethoxy-2,3-dimethyl-4 <i>H</i> -naphtho[2,3- <i>b</i>]-pyran-4-one (52)	1.4	50.6	<i>G. polythrix</i>	49, 50
rubrofusarin B (53)	NB ^c	ND ^d	<i>G. polythrix</i>	49, 50
chaetomine (54)	0.06	1.8	<i>C. globosum</i>	
beauverolide C (55)	0.30	1.4	<i>I. fumosorosea</i>	52
beauverolide F (56)	0.40	0.63	<i>I. fumosorosea</i>	52
beauverolide I (57)	0.19	9.7	<i>I. fumosorosea</i>	52
beauverolide J _a (58)	0.08	0.39	<i>I. fumosorosea</i>	52
beauverolide L (59)	1.7	1.1	<i>I. fumosorosea</i>	52

Table 1. continued

compound	K_d^a (μM)	K_i^b (μM)	source	ref(s)
beauverolide M (60)	3.4	9.5	<i>I. fumosorosea</i>	52
beauverolide N (61)	1.7	5.6	<i>I. fumosorosea</i>	52
vinblastine	1.7	0.29	<i>Catharanthus roseus</i>	
vincristine	0.80	0.02	<i>Catharanthus roseus</i>	
colchicine	0.50	18.4	<i>Colchicum autumnale</i>	
paclitaxel	NB ^c	NB ^c	<i>Taxus brevifolia</i>	
griseofulvin	NB ^c	NB ^c	<i>P. raistrickii</i>	

^aApparent constant from the fluorescence experiments. ^bCalculated inhibition constant from docking results. ^cNB = not binding. ^dND = not determined.

the cell.^{29–32} However, functional assays and radioimmunoassays demonstrated that the bibenzyl compounds exerted smooth muscle-relaxant activity by the release of NO via an increase of cGMP levels in the rat ileum.²⁹ In the case of the phenanthrenes, a Ca^{2+} channel blockade partially accounted for their pharmacological effect.³³

The contraction–relaxation processes go around phosphorylation–dephosphorylation of the myosin light chain (MLC), and the equilibrium is controlled by a complex cell signaling cascade where CaM plays a central role.³⁴ Thus, upon any contractile stimulus, Ca^{2+} enters the cell and binds to CaM; the complex Ca^{2+} -CaM activates the myosin light chain kinase (MLCK), which in turn phosphorylates MLC, triggering smooth muscle contraction. On the other hand, smooth muscle relaxation occurs either as a result of removal of the contractile stimulus or by a direct action of a substance that stimulates inhibition of the contractile mechanisms, and regardless, the process of relaxation requires a decrease of intracellular Ca^{2+} and an increase of MLC phosphatase activity.³⁴ Thus, on the basis of these considerations, the effects of the stilbenoids (Chart 1) on Ca^{2+} -CaM were also investigated. In the electrophoresis assay, Ca^{2+} -CaM treated with these compounds had a lower electrophoretic mobility than the untreated protein.³¹ In the functional enzymatic assays, the isolated stilbenoids inhibited the activity of the complex Ca^{2+} -CaM-PDE1 with IC_{50} values ranging from 3.2 to 36.6 μM , which was similar to the action of CPZ ($\text{IC}_{50} = 10.3 \mu\text{M}$).³¹ More recently, we found that bibenzyls 1 and 2 and phenanthrenes 3–8 quenched the extrinsic fluorescence of the biosensors *hCaM* M124C-AF₃₅₀ or *hCaM* M124C-mBBR (Table 1). The fluorescence changes were monitored between 450 and 550 nm. In all cases, the fluorescence intensity changed with increasing concentrations of the compounds. These spectroscopic changes were attributed to the formation of Ca^{2+} -*hCaM*-tested compound complexes; the phenanthrenes showed the highest affinity. For example, Figure 1 illustrates the effect provoked by gigantol (1), gymnopusin (8), and CPZ. The K_d (dissociation constant) values were 60, 0.19, and 1.0 μM , respectively. Thus, the bibenzyls and phenanthrenes of the medicinal orchids are, unequivocally, Ca^{2+} -CaM antagonists, and this effect may be related with their spasmolytic action.

On the basis of the results above-discussed, more than 20 analogues of 1 were designed and synthesized to find more active *hCaM* antagonists (Chart 1).³⁵ The gigantol analogues 9–28 differed not only in the position of the hydroxy and methoxy groups along the bibenzyl core but also in the length of the linker chain joining both phenyl moieties. The bibenzyls were obtained using the Wittig reaction; the diphenylmethanes were obtained by an acid-catalyzed intramolecular rearrangement of a benzyl phenyl ether. Finally, the oxygenated 1,3-

diphenylpropanes were obtained by one-step catalytic reduction of some chalcones in acid and 10% palladium over carbon, at 60 °C.³⁵

The effect of the synthetic analogues 9–28 on the complex Ca^{2+} -*hCaM*-PDE1 and *hCaM* M124C-mBBR biosensor was also analyzed (Table 1). The synthetic compounds quenched the fluorescence of the device to different extents, then revealing different affinities to Ca^{2+} -*hCaM*; their K_d values were in the range 3–80 μM . The most active were those possessing a propyl chain between the phenyl rings, inclusive of compounds 20, 21, and 24. Among the bibenzyls, compounds 11–13 were the most potent. In general, the position of the oxygenated functions did not have a clear impact on the affinity of the compounds to the Ca^{2+} -*hCaM* complex.

In order to establish the putative binding mode of the bibenzyls and phenanthrenes to Ca^{2+} -*hCaM*, docking studies were performed using the program AUTODOCK 4.0.2.^{36,37} All structures were optimized with the program Gaussian 09, using the density functional theory method (DFT) at the B3LYP/3-21G level. Initially, the ligands were docked to the entire protein (Ca^{2+} -CaM-4TFP, PDB code 1LIN); then, the best conformations were docked in a smaller area in order to refine the results. In all cases, the two phenyl groups of the scaffold sink into the hydrophobic pockets, establishing hydrophobic and/or π - π interactions with the protein, in a similar way to TFP. As examples, docking results for compounds 8, 10, and 20, the most active according to the fluorescence assay, are illustrated in Figure 2.³⁸

FUNGAL METABOLITES

In our work, fungal microorganisms have yielded the best CaM antagonists, with some of these having K_d values in the nM range. To isolate these compounds, we have pursued bioassay-guided fractionation of the active fungal extracts. Thus, once the appropriate fermentation conditions (solid or liquid media) are established, organic-soluble extracts are prepared and submitted for anti-CaM testing using *hCaM* M124C-AF₃₅₀ or *hCaM* M124C-mBBR. The active extracts are fractionated until active compounds are isolated. In the next few paragraphs, selected examples are described.

Alkaloids from *Malbranchea aurantiaca*. The malbrancheamides (29–32) (Chart 2) belong to a rare family of prenylated indole alkaloids containing a bicyclic diazaoctane moiety. These compounds were isolated from the liquid culture (potato-dextrose broth, PDB) of the coprophilous fungus *Malbranchea aurantiaca* Sigler and Carmich (Myxotrichaceae). Initially, the effects of the alkaloids on CaM were assessed by gel electrophoresis and the FEAs.^{39–41} Most of these studies were described in our last review.⁴ More recently, 29–32 were tested with the *hCaM* M124C-mBBR biosensor, and only

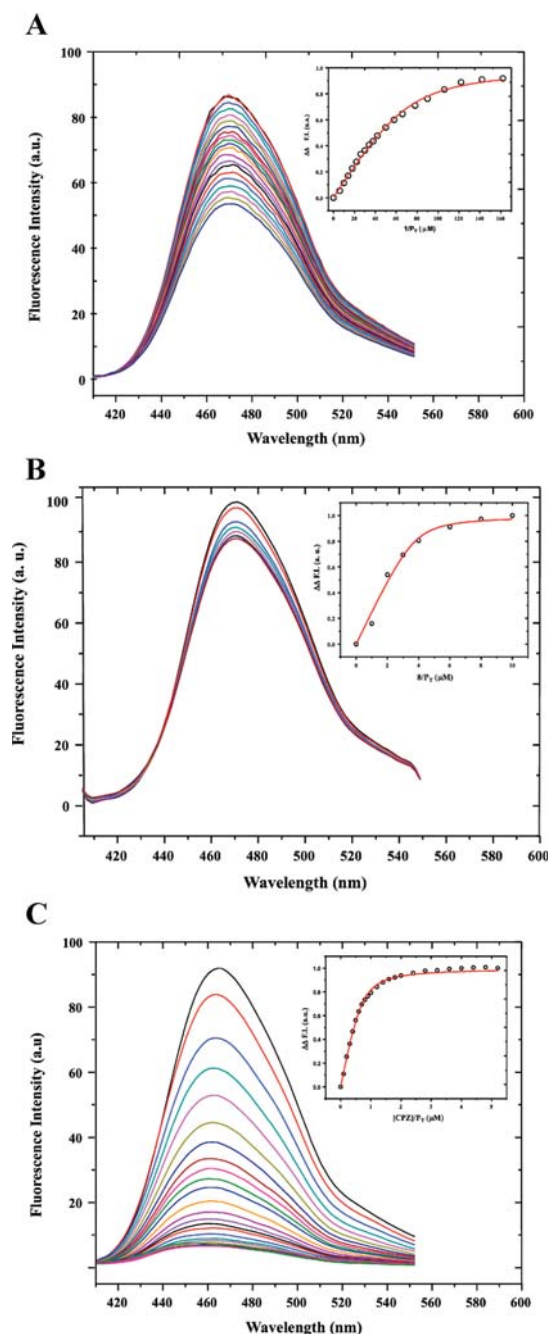


Figure 1. Fluorescence spectra and titration curves of the complexes Ca^{2+} -*hCaM* M124C-AF₃₅₀ with (A) gigantol (**1**), (B) gymnopusin (**8**), and (C) CPZ. The absolute changes of maximal fluorescence emission were corrected for light-scattering effects and plotted relative changes in intensity ($\Delta\Delta\text{IF}$) against the ligand to total protein–inhibitor complex ratio (insets).

malbrancheamide (**29**) quenched significantly ($K_d = 1.1 \mu\text{M}$) the fluorescence of the device.⁴¹ The monochlorinated derivatives (**30** and **31**) provoked only limited decreases in fluorescence quenching, and premalbrancheamide (**32**) none. Thus, the presence of two chlorine atoms confers to **29** the best affinity to Ca^{2+} -*hCaM*.⁴¹

Docking analysis predicted that **29** is anchored in the hydrophobic pocket of Ca^{2+} -*hCaM* through hydrogen-bonding and hydrophobic interactions with a few specified amino acids

of the protein.⁴¹ To map experimentally the hydrophobic interactions in the complex Ca^{2+} -*hCaM*-**29**, HSQC experiments were performed at different mixing times. Titration of ¹⁵N,¹³C double-labeled Ca^{2+} -*hCaM* with a solution of **29** induced a diamagnetic shift of most of the methionine methyl resonances (Figure 3). The most significant changes were observed for the methionine residues 36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144, and 145, thereby corroborating the docking predictions.⁴¹

The excellent CaM inhibitory properties of **29** prompted us to investigate its smooth muscle-relaxant activity using noradrenaline (NA) precontracted rat aortal rings. The results indicated that **29** induced a vasorelaxant effect ($\text{EC}_{50} = 2.7 \mu\text{M}$) mainly by an endothelium-dependent pathway, with maximum effects of almost 100%.⁴² In the absence of a functional endothelium, the effect of **29** ($\text{EC}_{50} = 42.1 \mu\text{M}$) was reduced but still significant. Experimental pharmacological evidence ruled out the COX pathway, the participation of K^+ -channels, and a direct cholinergic action in the relaxation effect of **29**. However, the involvement of the NO-cGMP pathway was demonstrated clearly.⁴² Although other mechanisms could be involved in the endothelium-independent relaxation, the fact that **29** was demonstrated as a well-characterized CaM antagonist led us to postulate that its mode of action could implicate also an interference with CaM or the contractile proteins modulated by CaM, e.g., MLCK. Therefore, the effect of **29** on two Ca^{2+} -*hCaM* target protein complexes [Ca^{2+} -*hCaM*-PDE1A and Ca^{2+} -*hCaM*-MLCK] was examined using the fluorescent biosensor *hCaM* M124C-*mBBr*.²⁶ CPZ was also used as a control for these experiments. The results revealed that **29** and CPZ perturbed the Ca^{2+} -*hCaM*-PDE1A and Ca^{2+} -*hCaM*-MLCK complexes since quenching of the fluorescence was observed upon titration with both inhibitors (Figure 4); compound **29** exhibited a higher affinity for the complex Ca^{2+} -*hCaM*-PDE1A ($K_d = 0.28 \mu\text{M}$) than for Ca^{2+} -*hCaM*-MLCK ($K_d = 0.55 \mu\text{M}$). On the other hand, as compared with **29**, CPZ showed slightly less affinity for the two complexes ($K_d = 1.1$ and $0.61 \mu\text{M}$, respectively).⁴³ The disruption of the complex Ca^{2+} -*hCaM*-MLCK induced by **29** could also account for its vasorelaxant effect. Moreover, the differential affinity of **29** and CPZ for the two *hCaM* complexes could be relevant for designing specific drugs where a particular Ca^{2+} -*hCaM* target protein complex is involved.⁴³

Polyketide-Type Compounds from Selected Fungal Species. The new marine *Emericella* sp. strain MEXU 25379 (Trichocomaceae), isolated from the coral *Pacificorgia rutilia*, collected in the Marietas Islands on the Mexican Pacific coast, biosynthesizes the prenylated xanthenes **33**–**41** (Chart 3). Most of these secondary metabolites have a pyran ring fused at C-6/C-7 of the xanthone core and a prenylated chain at C-4 with different oxidation levels.^{25,44} When tested with the *hCaM* L39C-*mBBr*/V91C-*mBBr* biosensor, all compounds but **38** were found to bind to the protein with K_d values in the nM range, which is unusual for CaM inhibitors.²⁵ Xanthenes **34**, **40**, and **33** showed the best affinity to the biosensor ($K_d = 3.7$, 6.8 , and 28.7 nM, respectively). The results revealed also that small structural differences of these ligands greatly affect the affinity to *hCaM*. Thus, comparing the K_d values of compounds **40** and **41** (124.7 nM), as well as those of **33** and **40**, showed that the presence of an isoprenyl chain at C-4 and opening of the pyran ring increased the affinity for the protein. On the other hand, contrasting the K_d values of **34**, **35** (235.1 nM), and **36** (93.0 nM) showed that the presence of any substituent at C-14, as in compound **35**, or opening of an epoxy functionality, as in **36**,

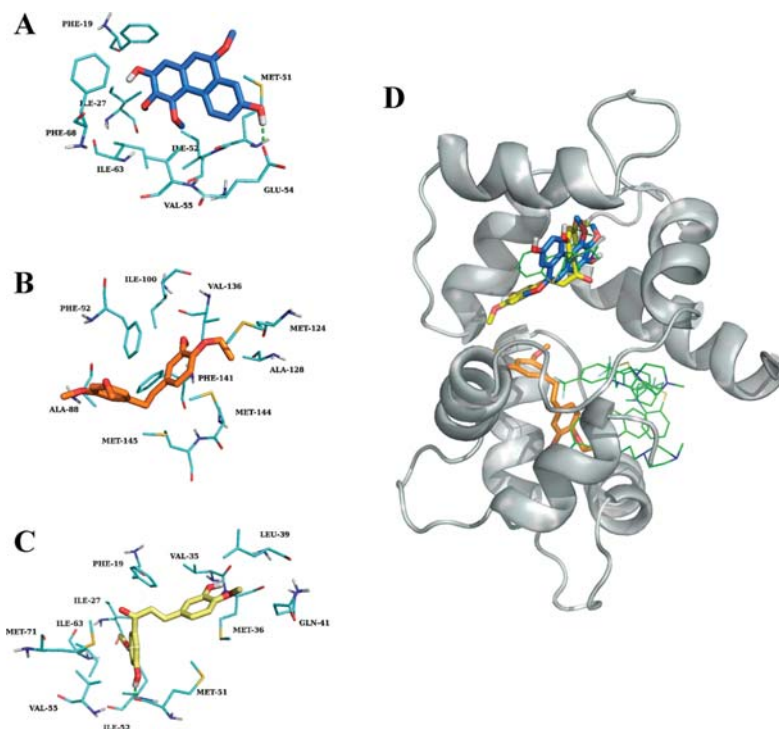
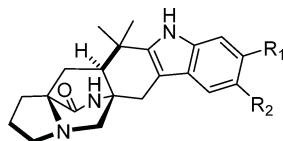


Figure 2. Predicted binding mode of (A) gymnopusin (**8**, blue sticks) and gigantol synthetic analogues, (B) **10** (orange sticks), and (C) **20** (yellow sticks), into Ca^{2+} -*hCaM* (hydrogen bonds are shown as green dashed lines). (D) Structural model of Ca^{2+} -*hCaM*-inhibitor complexes represented as gray cartoon (TFP, green lines). Amino acids involved in the interactions are shown as cyan sticks.

Chart 2



- 29** $R_1 = R_2 = \text{Cl}$
30 $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{H}$
31 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Cl}$
32 $R_1 = R_2 = \text{H}$

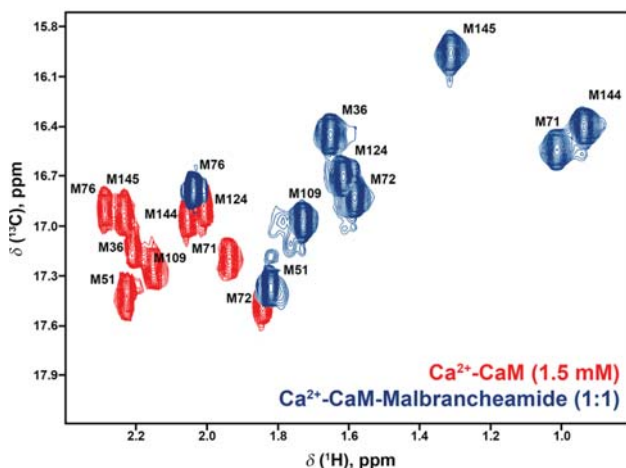


Figure 3. HSQC experiments of $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ double-labeled Ca^{2+} -*hCaM* and after titration with malbrancheamide (**29**).

decreased the affinity to the Ca^{2+} -*hCaM* complex. Moreover, replacement of the OH group at C-16 for a chlorine group, as in **38** ($K_d = 7.3 \mu\text{M}$), decreased the affinity toward the complex. Finally, docking studies predicted all xanthenes but **38** and **40** bind to *hCaM* like TFP does, having hydrogen bonds and hydrophobic interactions that stabilized the Ca^{2+} -*hCaM*-ligand complexes.²⁵

Other fungal compounds binding to Ca^{2+} -*hCaM* in the nM range were acremoxanthone C (**42**) and acremonidin A (**43**) (Chart 3), which were isolated recently from the PDB culture of *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson (Ophiocordycipitaceae), a saprobic filamentous fungus isolated from the soil and some insects.²⁸ These two xanthone-anthraquinone heterodimers bind to *hCaM* M124C-*mBBR* with K_d values of 18.3 and 19.4 nM, respectively, 70-fold lower than that of CPZ. Docking analysis predicted that **42** binds to Ca^{2+} -*hCaM* at a similar site to the vinblastine analogue KAR-2, which is uncommon.^{28,45} The higher percentage of quenching and fluorescence maximum displacement caused by **42**, when tested with *hCaM* T110C-*mBBR*, supported the unusual binding site predicted by the docking study. As in the case of KAR-2, compound **42** might not inhibit most of the modulatory properties of *hCaM*. The cytotoxic effects displayed by **42** and **43** may be related to their anti-*CaM* properties.⁴⁶

The next example refers to an interesting water-soluble polyketide characterized as vermelhotin (**44**) (Chart 3), which was isolated from a new endophytic fungal strain, MEXU 26343 (Pleosporales), associated with *Hintonia latiflora* (Sessé et Moc. ex DC.) Bull. (Rubiaceae).⁴⁷ This compound undergoes an interconversion between the *E/Z* isomers, forming an equilibrium with a ratio of 1:1. The affinity of **44** ($K_d = 0.25 \mu\text{M}$) with Ca^{2+} -*hCaM* in solution was measured using the

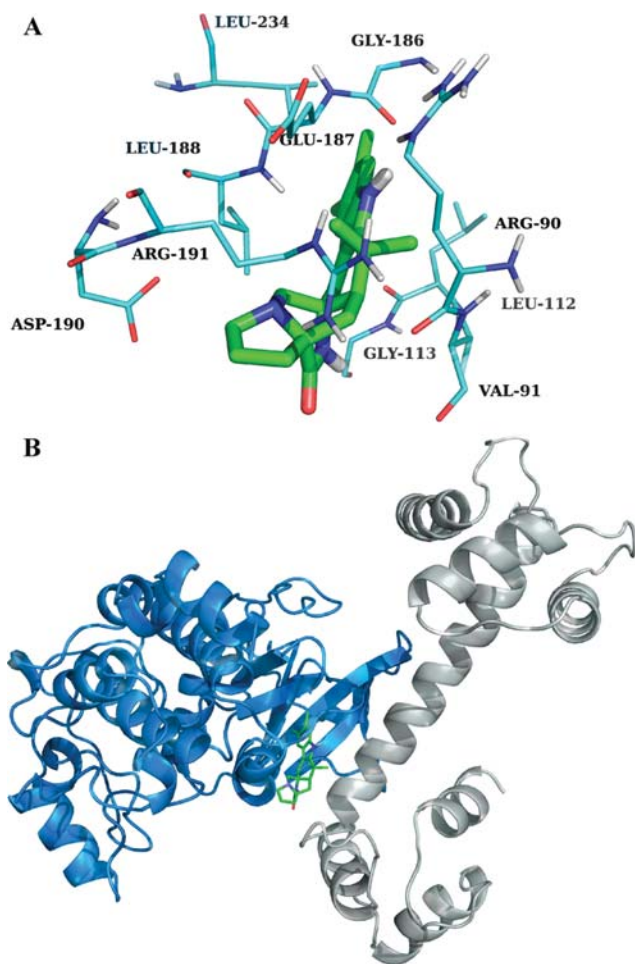


Figure 4. Predicted binding mode of (A) malbranchueamide (**29**) (green sticks) into Ca^{2+} -*hCaM*-MLCK. (B) Structural model of Ca^{2+} -*hCaM*-MLCK-**29**. Ca^{2+} -*hCaM* is represented as gray cartoon and MLCK in orange. Amino acids involved in the interactions are shown as cyan sticks.

hCaM M124C-*mBBR* biosensor. The docking analysis predicted that both the *E* and *Z* isomers interacted with Ca^{2+} -*hCaM* at the same site as TFP, displaying mainly hydrophobic interactions with Phe92, Met109, Met124, Glu127, Ala128, and Met144 and one hydrogen bond with Glu127.⁴⁷

According to the Lorke test,⁴⁸ compound **44** was nontoxic to mice when given orally up to 5 g/kg and exhibited a significant phytogrowth inhibitory effect when tested against *Amaranthus hypochondriacus* (IC_{50} = 141 μM vs 223 μM for Rival), *Echinochloa crusgalli* (IC_{50} = 50 μM vs 12.28 μM for Rival), *Medicago sativa* (IC_{50} = 358 μM vs 914 μM for Rival), and *Ipomea purpurea* (IC_{50} = 361 μM vs 202 μM for Rival). Whether or not this effect is related to its anti-*CaM* action, as has been demonstrated for ophiobolin A, remains an open question.

Another endophyte isolated from *H. latiflora* was *Sporormiella minimoides* S.I. Ahmed & Cain (Sporormiaceae) [= *Preussia minimoides* (S.I. Ahmed & Cain) Valldos. & Guarro]. This fungus, also cultured in rice, yielded several new polyketides of the corymbiferone family.²⁷ All compounds were tested as potential Ca^{2+} -*hCaM* inhibitors, but only the naphthoquinone **45** (Chart 3) quenched significantly the extrinsic fluorescence of the *hCaM* V91C-*mBBR* biosensor,

with a K_d value of 1.6 μM . Refined docking analysis predicted that it binds to Ca^{2+} -*hCaM* at the classical site, displaying hydrophobic interactions with several amino acids.²⁷

Bioassay-guided fractionation of an active extract of the marine-derived fungus *Aspergillus stromatoides* Raper & Fennell (Trichocomaceae) led to the isolation of the anti-*CaM* anthraquinones emodin (**46**) and ω -hydroxyemodin (**47**) (Chart 3), along with citrinin, methyl 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylate, and coniochaetone A.⁴⁹ Compounds **46** and **47** quenched the fluorescence of *hCaM* M124C-*mBBR* in a concentration-dependent manner with K_d values of 0.33 and 0.76 μM , respectively. Docking analysis revealed that both compounds bind to the same pocket of CPZ.⁴⁹ The *hCaM* inhibitory property of these compounds could be correlated with their widely described antineoplastic and anti-inflammatory activities, as well as their effect on several *CaM*-dependent enzymes such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase C (PKC), and MLCK.⁵⁰

From the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix* M.C. González, Hanlin & Ulloa (Chaetomiaceae), a number of phytotoxic naphthopyranones (**48–53**) (Chart 3) were obtained.^{51–53} The anti-*CaM* properties of these compounds have been explored using different procedures. More recently, their ability to quench the extrinsic fluorescence of *hCaM* M124C-*AF*₃₅₀ was assessed. The results indicated that compounds **48–50** and **52** bind to the protein with K_d values at the μM level, with compounds **49** and **50** having the strongest affinities (K_d = 0.39 and 2.2 μM , respectively). Molecular docking analysis of all active compounds (**48–50** and **52**), using a crystal structure of *hCaM* (Ca^{2+} -*hCaM*-2TFP, PDB code 1A29), showed that all bind to the same site as TFP, with hydrophobic interactions stabilizing the complexes.

Epipolythiodioxopiperazine and Peptides. Bioassay-guided fractionation of an active organic extract of *Chaetomium globosum* Kunze & Schmidt (Chaetomiaceae), a maize pathogenic fungus, led to the separation of the epipolythiodioxopiperazine chaetomine (**54**) (Chart 4). Compound **54** binds to the *hCaM* M124C-*AF*₃₅₀ biosensor with a K_d value of 57 nM, 11-fold higher than TFP. Molecular docking predicted that **54** interacted with Ca^{2+} -*hCaM* in a similar manner to KAR-2 (Figure 5).

Seven lipophilic and neutral cyclotetrapeptides, namely, beauverolipid C (**55**), F (**56**), I (**57**), J_a (**58**), L (**59**), M (**60**), and N (**61**) (Chart 4), were obtained from *Isaria fumosorosea* Wize (Ascomycota) [syn: *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm.], an entomopathogenic fungus isolated from the whitefly.²⁶ These peptides showed prominent anti-*CaM* activity as revealed in testing with *hCaM* M124C-*AF*₃₅₀; their K_d values ranged from 0.08 to 3.4 μM . The most active compound, **58**, was almost 10-fold more active than CPZ. It is noteworthy that **58** is the only compound in the series with a tryptophan moiety in its structure.²⁶

Docking of beauverolides **55–61** into Ca^{2+} -*hCaM* suggested that, in all cases, they bind in the same pocket as CPZ. The residues involved in the interactions comprise Glu14, Ala15, Leu18, Phe92, Ile100, Leu105, Leu109, Glu114, Met124, Ile125, Glu127, Ala128, Phe141, and Met144. The binding forces in all cases were mainly hydrophobic in nature, since non-hydrogen bond formation was detected.²⁶

During the course of the investigations described above, many other secondary metabolites from fungi were tested as Ca^{2+} -*hCaM* inhibitors, but they failed to quench the fluorescence of the different biosensors. These compounds

Chart 3

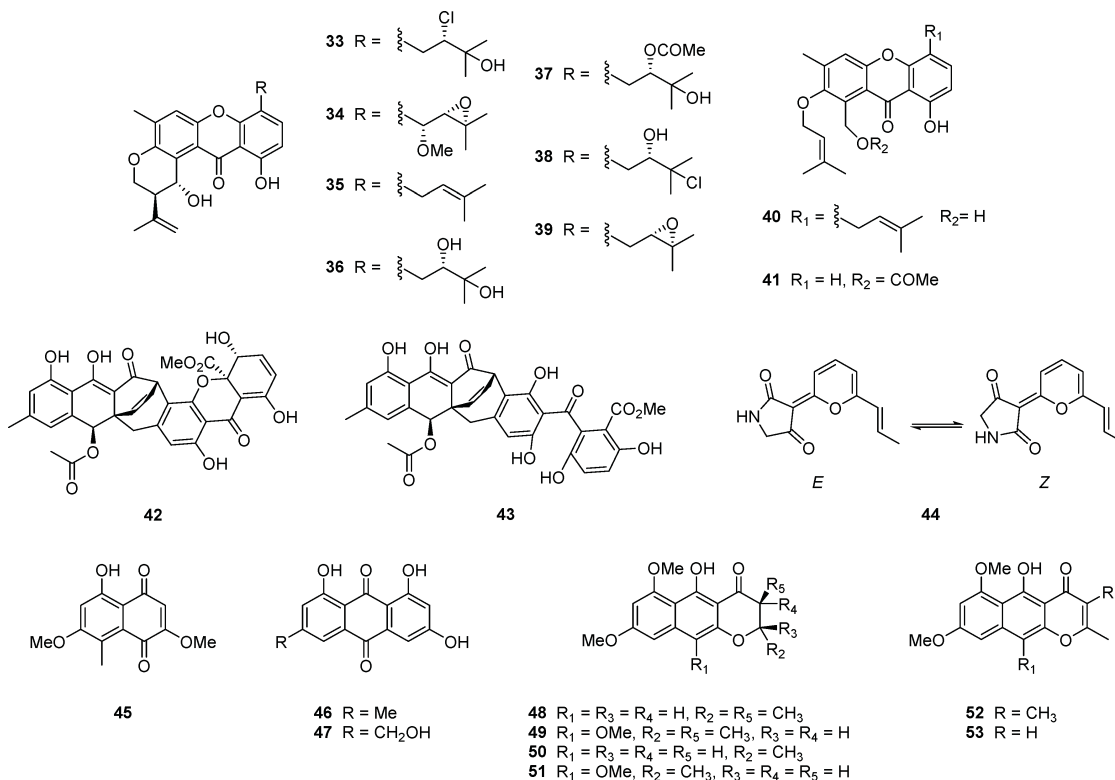
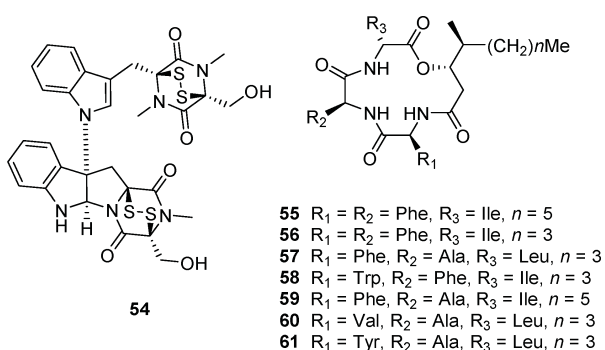


Chart 4



included the indole alkaloid brevianamide A from *Penicillium brevicompactum*, which has been proposed as a biosynthetic precursor of the malbrancheamides; the polyketides mycophenolic acid, brefeldin A, citrinin, griseofulvin, and fimetarone A from *P. brevicompactum*, *Curvularia pallescens*, *A. stromatoides*, *P. raistrickii*, and *Chaetomium* sp., respectively; and, finally, aphidicolin, a tetracyclic diterpene from *Nigrospora oryzae*.

SELECTED ALKALOIDS FROM PLANTS

Berberine. The isoquinoline alkaloid berberine (**62**) (Chart 5), isolated from various plant species, possesses a number of biological activities including antibacterial, anti-inflammatory, and antineoplastic effects.⁵⁴ Several mechanisms have been proposed to explain the potential anticancer activity of **62** such as direct interaction with DNA or RNA, regulation of gene

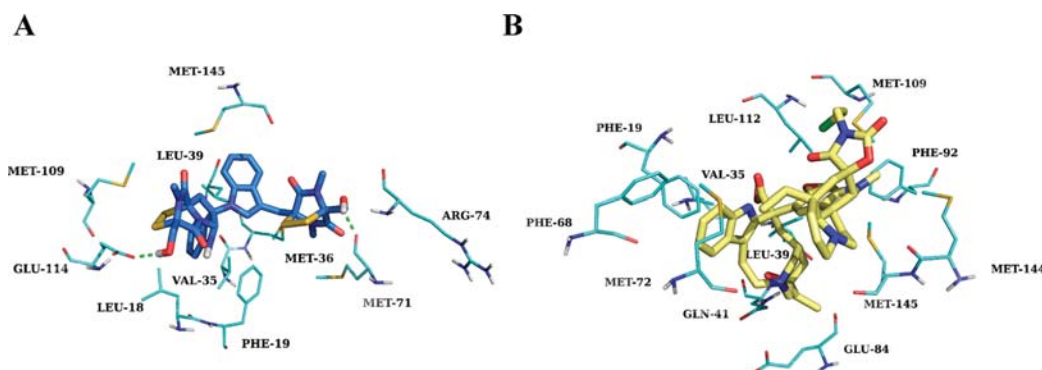
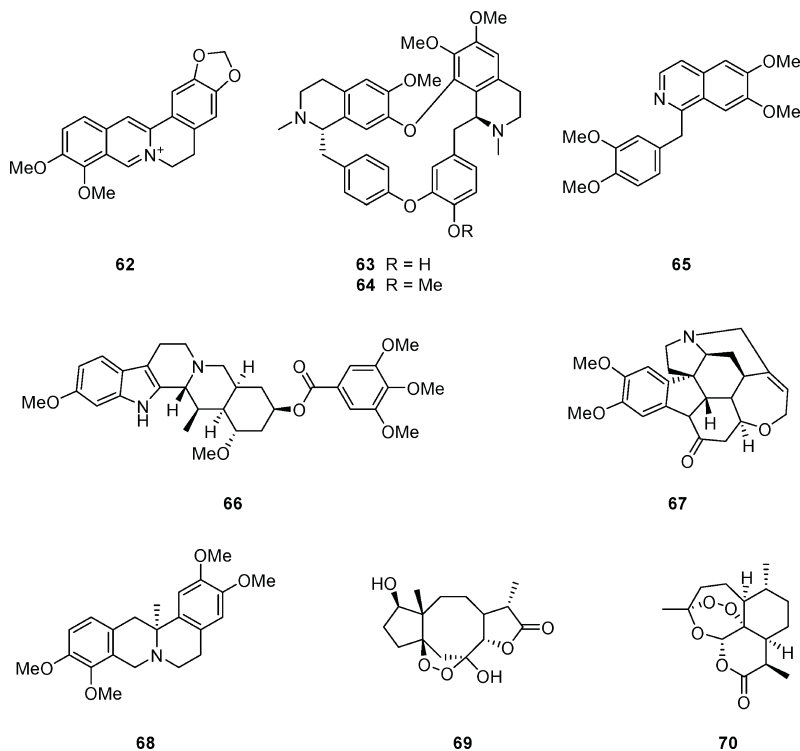


Figure 5. Predicted binding mode of (A) chaetomine (**54**) (blue sticks) and (B) KAR-2 (yellow sticks) into Ca²⁺-hCaM (hydrogen bonds are shown as green dashed lines). Amino acids involved in the interactions are shown as cyan sticks.

Chart 5



expression, and augmentation of reactive oxygen species.⁵⁴ Recently, it was demonstrated that CaM, cytochrome P450 3A4, sex hormone-binding globulin, and carbonic anhydrase II are potential targets of **62**. The investigation was initially conducted with a computational pipeline based on a ligand–protein inverse docking program (INVDOCK) and mining of the Connectivity MAP data. INVDOCK is a ligand–protein inverse docking algorithm, which could predict potential target proteins of a small molecule by attempting to dock it to known ligand-binding pockets of each of the protein entries in the PDB database. The anti-CaM property predicted for **62** was then confirmed with an FEA with PDE1 as reporter enzyme ($IC_{50} = 39.7 \mu M$). In addition, flow cytometric analysis revealed that the berberine-induced G1 cell cycle arrest in Bel7402 cells was enhanced by cotreatment with CaM inhibitors such as TFP. Western blotting data indicated that **62** decreased phosphorylation of CaM kinase II and blocked subsequent MEK1 activation as well as p27 protein degradation. These results suggested that CaM might play a crucial role in the induction of cell cycle arrest in cancer cells.⁵⁴

Brucine and Tetrahydropalmatine. A rapid and sensitive method to detect Ca^{2+} -CaM ligands was described by Ma and co-workers²⁰ based on IF-MALDI mass spectrometry, which is a powerful tool to detect the formation of protein–organic compounds and protein–nucleic acids, as well as discover ligands in biological extracts for the screening of protein ligands. The method is based on a selective decrease (fading) of the ion abundance of specific ligands after the addition of the target protein, in this case Ca^{2+} -CaM. Testing of berbamine (**63**), tetrandrine (**64**), papaverine (**65**), reserpine (**66**), brucine (**67**), and tetrahydropalmatine (**68**) (Chart 5) resulted in a relative intensity fading (IF) after the addition of bovine Ca^{2+} -CaM, indicating that they bind to the protein. The relative IF was determined by comparison with the nonbinding drug

propranolol. On the other hand, strychnine and piperine had either no or a weak interaction with Ca^{2+} -CaM using the same procedure. Competitive experiments were also performed with the IF-MALDI mass spectrometry method. It is important to point out that this is the first report of the anti-CaM properties of alkaloids **67** and **68**.²⁰

SELECTED FLAVONOIDS

A few structurally related flavonoids (flavone, 3-hydroxyflavone, 6-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, chrysin, quercetin, naringenin, and 6-hydroxykaempferol 3,7-dimethyl ether) showed CaM inhibitory activities in the Ca^{2+} -CaM-PDE1 assay (IC_{50} values from 5.2 to 102.3 μM).⁵⁵ These flavonoids displayed also an important vasorelaxant effect, indicating that their mode of action could involve an anti-CaM activity or an interference with contractile proteins modulated by CaM, as in the case of malbrancheamide (**29**).

SESQUITERPENE LACTONES

The antineoplastic sesquiterpene lactones tehranolide (**69**) and artemisinin (**70**) (Chart 5), isolated from *Artemisia diffusa* Krasch. ex Poljak (Asteraceae) and other *Artemisia* species, revealed their important anti-CaM effects through the change on fluorescence emission spectra of the protein and CaM-mediated activation of PDE1.⁵⁶ It was found that **69** has a higher inhibition constant ($K_i = 6.1 \mu M$) than **70** ($K_i = 10 \mu M$). In addition, **69** significantly reduces cell proliferation in a time- and dose-dependent manner in K562 cells, without affecting the growth of peripheral lymphocytes, as indicated in a cytotoxic assay.⁵⁶

NATURAL ANTIMITOTIC DRUGS

The interaction of Ca^{2+} -CaM with the alkaloidal antimitotic drugs vinblastine and vincristine has been demonstrated by

using different spectroscopic techniques, including circular dichroism and fluorescence-based methods.³⁸ However, the direct effect on Ca²⁺-hCaM of other antimitotic drugs such as paclitaxel (Taxol), griseofulvin, and colchicine has not been demonstrated yet. When vinblastine, vincristine, and colchicine were tested with the Ca²⁺-Ca²⁺-hCaM M124C-mBBr biosensor, they quenched, in a concentration-dependent manner, the fluorescence of the device ($K_d = 1.7, 0.80,$ and $0.50 \mu\text{M}$, respectively). On the other hand, paclitaxel and griseofulvin, which share the same antimitotic mechanism, including increase of microtubule polymerization, did not induce quenching of Ca²⁺-hCaM M124C-mBBr.^{57,58} The implications of these results remain to be determined.

CONCLUDING REMARKS

The recent literature concerning anti-CaM natural products has been updated in this review. In most cases, the activity observed correlated well with the known pharmacological properties of the compounds. A few inhibitors in the nanomolar potency range were detected using recently designed fluorescent biosensors. These tools are important technological developments and represent the state of the art for detecting new and potent CaM inhibitors in a very sensitive and specific fashion. The most active compounds were isolated from the fungal kingdom, which thus represent a valuable source of new and potent CaM antagonists in comparison to plant constituents. Therefore, these compounds represent leads for the development of new drugs as well as valuable research tools for understanding anti-CaM mechanisms.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +52-555-622-5289. Fax: +52-555-622-5329. E-mail: rachel@unam.mx.

Notes

[#]Adapted from a Norman R. Farnsworth Research Achievement Award address, 55th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Oxford, Mississippi, August 2–6, 2014.

The authors declare no competing financial interest.

DEDICATION

Dedicated to Dr. William Fenical of Scripps Institution of Oceanography, University of California—San Diego, for his pioneering work on bioactive natural products.

REFERENCES

- (1) Chin, D.; Means, A. R. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 322–328 and references therein.
- (2) Berchtold, M. W.; Villalobo, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 398–435 and references therein.
- (3) Martínez-Luis, S.; Pérez-Vásquez, A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1882–1903.
- (4) Mata, R.; Figueroa, M.; Rivero-Cruz, I.; González-Andrade, M. In *Bioactive Compounds from Natural Sources*; Tringali, C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2012; Chapter 13, pp 451–496.
- (5) Sharma, R. K.; Wang, J. H. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* **1979**, *10*, 187–198.
- (6) Leung, P. C.; Taylor, W. A.; Wang, J. H.; Tipton, C. L. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2742–2747.
- (7) Ovadi, J. *Prog. Drug Res.* **1989**, *33*, 353–395.
- (8) Molnar, A.; Liliom, K.; Orosz, F.; Vertessy, B. G.; Ovadi, J. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *291*, 73–82.
- (9) Au, T. K.; Leung, P. C. *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 965–973.

- (10) Vertessy, B. G.; Harmat, V.; Bocskei, Z.; Naray-Szabo, G.; Orosz, F.; Ovadi, J. *Biochemistry* **1998**, *37*, 15300–15310.
- (11) Horvath, I.; Harmat, V.; Perczel, A.; Palfi, V.; Nyitray, L.; Nagy, A.; Hlavanda, E.; Naray-Szabo, G.; Ovadi, J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8266–8274.
- (12) Ishima, R.; Torchia, D. A. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 740–743.
- (13) Pelton, J. T.; McLean, L. R. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167–176.
- (14) Uzawa, T.; Akiyama, S.; Kimura, T.; Takahashi, S.; Ishimori, K.; Morishima, I.; Fujisawa, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 1171–1176.
- (15) Lipfert, J.; Doniach, S. *Annu. Rev. Biophys. Biomed.* **2007**, *36*, 307–327.
- (16) Gilli, R.; Lafitte, D.; Lopez, C.; Kilhoffer, M.; Makarov, A.; Briand, C.; Haiech, J. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5450–5456.
- (17) Broxk, R. D.; Lopez, M. M.; Vogel, H. J.; Makhatadze, G. I. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14083–14091.
- (18) Hall, W. P.; Modica, J.; Anker, J.; Lin, Y.; Mrksich, M.; Van Duyne, R. P. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 1098–1105.
- (19) Coan, K. E.; Swann, M. J.; Ottl, J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1586–1591.
- (20) Ma, L.; Wang, Z.; Liu, S.; Song, F.; Liu, Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1527–1534.
- (21) Truong, K.; Ikura, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 573–578.
- (22) Heyduk, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 292–296.
- (23) Axelrod, D. *Traffic* **2001**, *2*, 764–774.
- (24) González-Andrade, M.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R.; Sosa-Peinado, A. *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 64–70.
- (25) González-Andrade, M.; Rivera-Chávez, J.; Sosa-Peinado, A.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3875–3884.
- (26) Madariaga-Mazón, A.; González-Andrade, M.; Toriello, C.; Navarro-Barranco, H.; Mata, R. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, in press.
- (27) Leyte-Lugo, M.; Figueroa, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; González-Andrade, M.; Mata, R. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 273–278.
- (28) Madariaga-Mazón, A.; González-Andrade, M.; González, M. D.; Glenn, A. E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1454–1460.
- (29) Estrada, S.; Rojas, A.; Mathison, Y.; Israel, A.; Mata, R. *Planta Med.* **1999**, *65*, 109–114.
- (30) Estrada, S.; Toscano, R. A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1175–1178.
- (31) Hernández, Y.; Rojas, J. I.; Castillo, R.; Rojas, A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 160–167.
- (32) Estrada, S.; López-Guerrero, J. J.; Villalobos-Molina, R.; Mata, R. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 690–695.
- (33) Rendón-Vallejo, P.; Hernández-Abreu, O.; Vergara-Galicia, J.; Ibarra-Barajas, M.; Estrada-Soto, S. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2241–2245.
- (34) Webb, R. C. *Adv. Physiol. Educ.* **2003**, *27*, 201–206.
- (35) Reyes-Ramírez, A.; Leyte, M.; Figueroa, M.; Serrano, T.; González-Andrade, M.; Mata, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2699–2708.
- (36) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (37) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–1152.
- (38) Harmat, V.; Böcskei, Z.; Náray-Szabó, G.; Bata, I.; Csutor, A. S.; Hermecz, I.; Arányi, P.; Szabó, B.; Liliom, K.; Vértessy, B. G.; Ovadi, J. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 747–755.
- (39) Martínez-Luis, S.; Rodríguez, R.; Acevedo, L.; González, M. C.; Lira-Rocha, A.; Mata, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1817–1822.
- (40) Figueroa, M.; González, M. C.; Mata, R. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 709–714.
- (41) Figueroa, M.; González-Andrade, M.; Sosa-Peinado, A.; Madariaga-Mazón, A.; Del Río-Portilla, F.; González, M. C.; Mata, R. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 378–385.
- (42) Madariaga-Mazón, A.; Hernández-Abreu, O.; Estrada-Soto, S.; Mata, R. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, in press.

- (43) González-Andrade, M.; Mata, R.; Madariaga-Mazán, A.; Rodríguez-Sotres, R.; Del Pozo-Yauner, L.; Sosa-Peinado, A. *J. Mol. Recognit.* **2013**, *26*, 165–174.
- (44) Figueroa, M.; Del Carmen González, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Sosa-Peinado, A.; González-Andrade, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2167–2174.
- (45) Horvath, L.; Harmat, V.; Perczel, A.; Palfi, V.; Nyitray, L.; Nagy, A.; Hlavanda, E.; Naray-Szabo, G.; Ovadi, J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8266–8274.
- (46) Ayers, S.; Graf, T. N.; Adcock, A. F.; Kroll, D. J.; Shen, Q.; Swanson, S. M.; Matthew, S.; Carcache de Blanco, E. J.; Wani, M. C.; Darveaux, B. A.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 3–8.
- (47) Leyte-Lugo, M.; González-Andrade, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1571–1577.
- (48) Lorke, D. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.
- (49) González-Andrade, M.; Del Valle, P. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 328–337.
- (50) Shrimali, D.; Shanmugam, M. K.; Kumar, A. P.; Zhang, J.; Tan, B. K. H.; Ahn, K. S.; Sethi, G. *Cancer Lett.* **2013**, *341*, 139–149.
- (51) Macías, M.; Ulloa, M.; Gamboa, A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 757–761.
- (52) Macías, M.; Gamboa, A.; Ulloa, M.; Toscano, R. A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 751–758.
- (53) Mata, R.; Gamboa, A.; Macías, M.; Santillán, S.; Ulloa, M.; González, M. C. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4559–4562.
- (54) Ma, C.; Tang, K.; Liu, Q.; Zhu, R.; Cao, Z. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 775–783.
- (55) Torres-Piedra, M.; Figueroa, M.; Hernández-Abreu, O.; Ibarra-Barajas, M.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 542–546.
- (56) Noori, S.; Hassan, Z. M. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 257–264.
- (57) Panda, D.; Rathinasamy, H.; Santra, M. K.; Wilson, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 9878–9883.
- (58) Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943–2971.

α -Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* Associated with *Hintonia latiflora*

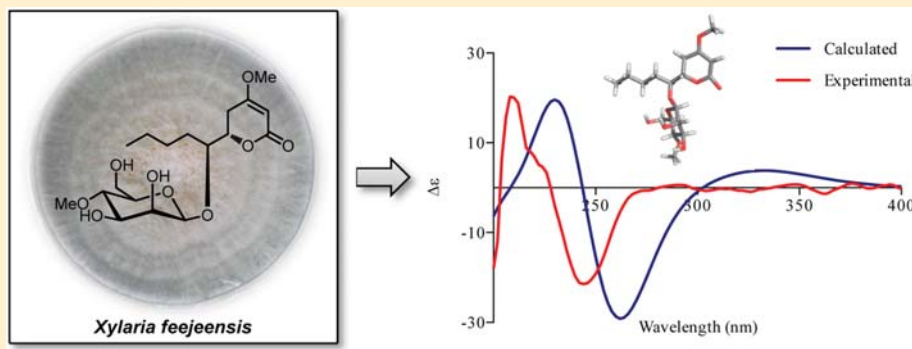
José Rivera-Chávez,^{†,‡} Mario Figueroa,[†] María del Carmen González,[§] Anthony E. Glenn,[⊥] and Rachel Mata^{*,†}

[†]Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

[§]Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

[⊥]Toxicology & Mycotoxin Research Unit, Richard B. Russell Research Center, USDA, ARS, 950 College Station Road, Athens, Georgia 30605, United States

S Supporting Information



ABSTRACT: Two new compounds, pestalotin 4'-O-methyl- β -mannopyranoside (1) and 3S,4R-(+)-4-hydroxymellein (2), were isolated from an organic extract of a *Xylaria feejeensis*, which was isolated as an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. In addition, the known compounds 3S,4S-(+)-4-hydroxymellein (3), 3S-(+)-8-methoxymellein (4), and the quinone derivatives 2-hydroxy-5-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (5), 4S,5S,6S-4-hydroxy-3-methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one (6), and 4R,5R-dihydroxy-3-methoxy-5-methylcyclohexen-2-en-1-one (7) were obtained. The structures of 1 and 2 were elucidated using a set of spectroscopic and spectrometric techniques. The absolute configuration of the stereogenic centers of 1 and 2 was determined using ECD spectroscopy combined with time-dependent density functional theory calculations. In the case of 1, comparison of the experimental and theoretical $^3J_{6-7}$ coupling constants provided further evidence for the stereochemical assignments. Compounds 2 and 3 inhibited *Saccharomyces cerevisiae* α -glucosidase (α GHY), with IC_{50} values of 441 ± 23 and $549 \pm 2.5 \mu\text{M}$, respectively. Their activity was comparable to that of acarbose ($IC_{50} = 545 \pm 19 \mu\text{M}$), used as positive control. Molecular docking predicted that both compounds bind to α GHY in a site different from the catalytic domain, which could imply an allosteric type of inhibition.

Members of the genus *Xylaria* (Xylariaceae), with more than 300 species, are ubiquitous as endophytes in vascular plants.¹ *Xylaria* have received special attention due to their potential as a source of novel secondary metabolites; a recent review showed that more than 180 compounds, including sesquiterpenoids, diterpenoids, diterpene glycosides, triterpene glycosides, steroids, N-containing compounds, pyrone derivatives, and polyketides, have been isolated from this genus.² Specifically, from *Xylaria feejeensis*, integric acid,¹ xylaropyrone,¹ and the nonenolide xylide³ have been isolated.

The current study was undertaken to address the need for new treatments for type II diabetes mellitus (TIIDM), which according to the International Diabetes Federation is a huge growing health problem worldwide.^{4,5} Thus, as part of our continuing search for new α -glucosidase inhibitors useful for the treatment of TIIDM, we evaluated products 1–7 isolated

from *X. feejeensis* associated with *Hintonia latiflora* (Sessé et Moc. ex DC.) Bull. (Rubiaceae), a plant widely used as an antidiabetic herbal drug in the context of alternative and complementary medicine in Mexico and Europe.⁶

RESULTS AND DISCUSSION

An organic extract from *X. feejeensis* showed moderate inhibition (40% at 250 ppm) when it was tested against α -glucosidase (α GHY). Bioassay-guided fractionation of this extract using different chromatographic procedures led to the isolation of two new natural products, namely, pestalotin 4'-O-methyl- β -mannopyranoside (1) and 3S,4R-(+)-4-hydroxymel-

Received: November 11, 2014

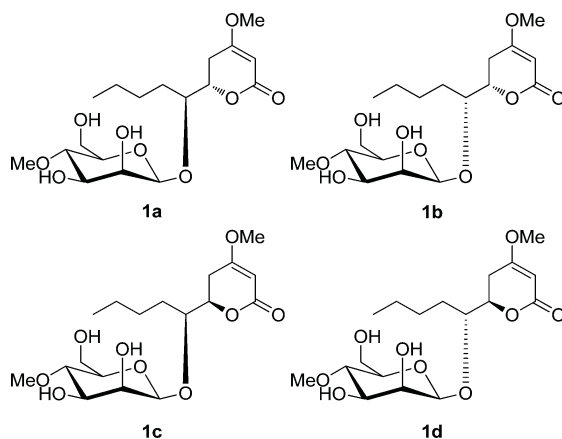
lein (2), along with several known compounds, which were identified as 3*S*,4*S*-(+)-4-hydroxymellein (3), 3*S*-(+)-8-methoxymellein (4), 2-hydroxy-5-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (5), 4*S*,5*S*,6*S*-4-hydroxy-3-methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one (6), and 4*R*,5*R*-dihydroxy-3-methoxy-5-methylcyclohexen-2-en-1-one (7).^{7–10}

Compound 1 was isolated as a glassy, brown solid. Its molecular formula was deduced to be C₁₈H₃₀O₉ by HRESIMS. The IR spectrum displayed absorptions bands for hydroxyl (3399 cm⁻¹) and unsaturated δ -lactone (1691 cm⁻¹) groups. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1) were very similar to

Table 1. NMR Data of 1 in MeOH-*d*₄ (¹H 500 MHz, ¹³C 125 MHz)

position	δ_C		δ_H (J in Hz)	HMBC	COSY	ROESY
2	170.0	C				
3	90.1	CH	5.14 d (1.4)	2, 4, 5		
4	176.2	C				
5	30.0	CH ₂	a 2.35 dd (3.8, 17.1) b 2.67 ddd (1.0, 12.5, 16.7)	3, 4 4, 6, 7	6	
6	79.3	CH	4.45 ddd (3.9, 5.5, 12.7)	7		5, 7
7	80.5	CH	3.84 m	5a, 1'	6	
8	31.5	CH ₂	1.58 m	7	7	
9	28.1	CH ₂	1.44 tdd (6.9, 14.8, 19.4)			8
10	23.7	CH ₂	1.27 m		9	
11	14.3	CH ₃	0.89 t (7.3)	9, 10	10	
4-OMe	57.1	CH ₃	3.75 s	4		
1'	102.1	CH	4.64 d (1.0)	7, 2'		2', 3', 5'
2'	72.9	CH	3.84 dd (1.0, 3.5)			3'
3'	75.3	CH	3.53 dd (3.3, 9.4)			2', 4' 2', 5'
4'	78.0	CH	3.31 t (9.5)			3', 5'
5'	77.2	CH	3.12 ddd (2.0, 4.3, 9.6)			4', 6' 3', 5'
6'	62.5	CH ₂	a 3.67 dd (4.4, 11.7) b 3.78 dd (2.0, 11.9)			
4'-OMe	61.0	CH ₃	3.50 s			

those reported for pestalotin analogues^{11,12} except for the presence of signals attributed to a methyl-hexose moiety (δ_H/δ_C 4.64/102.1 H-1'/C-1'; 3.84/72.9 H-2'/C-2'; 3.53/75.3 H-3'/C-3'; 3.31/78.0 H-4'/C-4'; 3.12/77.2 H-5'/C-5'; and 3.67, 3.78/62.5 H-6a', H6b'/C-6'). This sugar was characterized as 4-*O*-methyl- β -mannopyranosyl on the basis of the coupling pattern observed for H-1' (δ_H 4.64, d, J = 1.0 Hz), H-2' (δ_H 3.84, dd, J = 1.0, 3.5 Hz), and H-3' (δ_H 3.53, dd, J = 3.3 and 9.4 Hz). In addition, the ROESY experiment revealed strong interactions between H-1', H-2', H-3', and H-5' and between H-3', H-5', and H-2' and the methyl group at C-4', which were expected for a 4-*O*-methyl- β -mannopyranosyl residue. On the other hand, the strong HMBC interaction between H-1' (δ_H 4.64) and C-7 (δ_C 80.5) revealed that the sugar unit was attached to the hydroxy group at C-7 through an *O*-glycosidic linkage. Finally, the loss of 176 units from the $[M + H]^+$ ion in the HRESIMS spectrum further supports the presence of a 4-*O*-methyl- β -mannopyranosyl moiety (Figure S2, Supporting Information).



In order to establish the absolute configuration at C-6, the ECD spectrum of 1 was recorded and compared with density functional theory (DFT)-calculated spectra for diastereoisomers 6*S*,7*S*, 6*S*,7*R*, 6*R*,7*S*, and 6*R*,7*R* of 1 (1a–1d, respectively). Initially the structure of each diastereoisomer was minimized; subsequently, a conformational search was performed using a Monte Carlo protocol. All conformers for each diastereoisomer, within a 3 kcal/mol window, were selected and reoptimized using DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level. After optimization, theoretical ECD spectra of each conformer of 1a–1d were calculated using time-dependent density functional theory (TDDFT) at the same level.¹³ The calculated ECD spectrum for distereoisomer 1a showed an excellent fit with the experimental plot of 1, which displayed positive and negative Cotton effects at 230 and 260 nm, respectively (Figure 1). Considering these results,

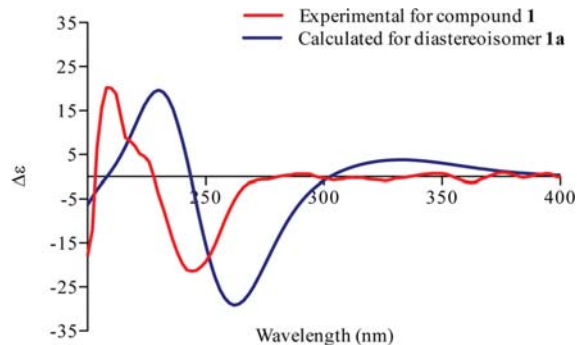


Figure 1. Comparison of experimental and calculated ECD spectra of 1 (red line) and 1a (blue line).

diastereoisomers 1c and 1d were automatically ruled out. The calculated ECD for 1b showed two positive Cotton effects, leaving diastereoisomer 1a as the best structural candidate for compound 1. Hence, the absolute configuration at C-6 was established as *S*. Next, to ensure the absolute configuration at C-7, the calculated $^3J_{6-7}$, $^3J_{\text{SproR-6}}$ and $^3J_{\text{SproS-6}}$ (obtained from theoretical calculations using DFT at the B3LYP/DGDZVP level)^{14a,b} vs the experimental (obtained from the ¹H NMR using double resonance experiments by selective irradiation at δ_H 2.35 and 2.67 ppm) values were compared. The analysis was undertaken only for diastereoisomers 1a and 1b, which possesses an *S* configuration at C-6. The smallest rmsd (0.64) between calculated and experimental $^3J_{6-7}$ values (Table 2) obtained for diastereoisomer 1a confirmed the *S*

Table 2. DFT-Calculated and Experimental ^1H – ^1H Coupling Constants of **1**

$^3J_{\text{H-H}}$	experimental	calculated coupling constants ^a	
		1a	1b
J_{6-7}	5.5	6.5 ^b	7.0 ^b
$J_{\text{SproR-6}}$	3.8	3.5	5.9
$J_{\text{SproS-6}}$	12.6	13.0	4.3
rmsd		0.64	5.03

^aCoupling constants are expressed in Hz. Theoretical coupling constants were calculated at the B3LYP/DGTZVP level of theory. Coupling constants were Boltzman-weighted using $\sum_j J^j \times P^j$, where J^j is the coupling constant value for each conformer and P^j is the population of the conformation. ^bThe averaged coupling constants were scaled with the factor $f_{\text{H(sp}^3\text{)}-\text{H(sp}^3\text{)}} = 0.910$.^{14b}

absolute configuration at C-7. For **1b**, the calculated $^3J_{6-7}$ showed noticeable differences (rmsd = 5.03) from the experimental values, ruling out this structure. The coexistence of **1** and D-mannitol suggests that the methyl- β -mannopyranoside residue belongs to the D-series. Unfortunately, the lack of a suitable standard precludes unambiguous assignment of the sugar configuration. Thus, compound **1** was characterized as 6S,7S-(–)-pestalotin 4'-O-methyl- β -mannopyranoside.

Compound **2** was obtained as an optically active, yellow powder ($[\alpha]_{\text{D}} = +32$). Its UV and NMR (Table 3) spectra

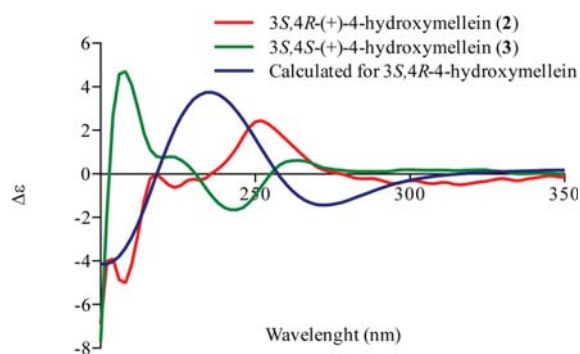
Table 3. NMR Data of **2** in MeOH- d_4 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz)

position	δ_{C}		δ_{H} (J in Hz)	HMBC	COSY
1	171.0	C			
3	79.9	CH	4.72 qd (2.1, 6.6)		4
4	67.6	CH	4.55 d (2.1)	4a, 5, 8a	3
4a	143.1	C			
5	119.8	CH	6.96 d (8.4)	4, 6	
6	137.7	CH	7.56 dd (7.4, 8.5)	5, 7	
7	118.5	CH	6.99 d (7.4)	6, 8	
8	162.9	C			
8a	108.4	C			
9	16.4	CH ₃	1.52 d (6.6)	3, 4	

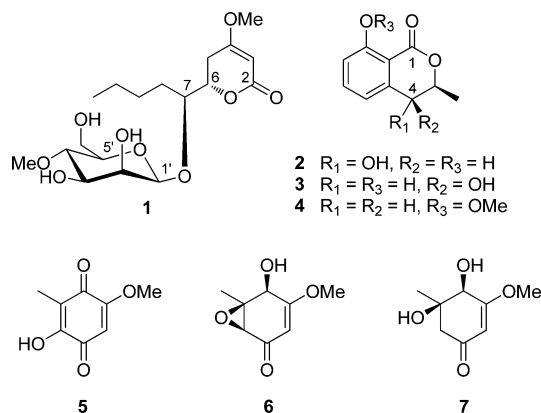
showed close relationship with those of 3S,4S-(+)-4-hydroxymellein (**3**).⁷ Key differences between **2** and **3** were the chemical shift values and splitting patterns of H-3 and H-4. The signals of the oxygenated methines at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4.72, qd, $J = 2.1, 6.6$ Hz, H-3/79.9 and $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4.55, d, $J = 2.1$ Hz, H-4/67.6 in **2** were replaced by a multiplet centered at δ_{H} 4.56 (δ_{C} 81.6, C-3 and 69.5, C-4) in **3**. This information revealed that these compounds differed in the absolute configuration at C-3 and/or C-4 (Figures S11,12 and S16,17).

The absolute configuration at the stereogenic centers of **2** and **3** was established by comparing experimentally measured ECD spectra and those calculated by TDDFT using the same protocol described for compound **1**. The chiroptical properties of the dihydroisocoumarin benzoic ester chromophore were systematically investigated; it was shown that the sign of the Cotton effect of the ester $n \rightarrow \pi^*$ transition at 260 nm, which is independent of the substitution pattern of the aromatic ring, can be used to establish the absolute configuration at C-3.¹⁵ The ECD-calculated spectrum obtained for diastereoisomer 3S,4R-**2** (**2c**) (Figure S21) was in agreement with the experimental data. In both cases one negative (316 nm) and

a positive Cotton effect (255 nm), assignable to the $n \rightarrow \pi^*$ transition, were observed (Figure 2). Thus, the absolute

**Figure 2.** Comparison of experimental ECD spectra of **2** (red line) and **3** (green line) and the calculated ECD spectrum for diastereoisomer 3S,4R-4-hydroxymellein (blue line).

configuration at C-3 was established as S. On the other hand, the absolute configuration at C-4 was determined by comparison of the experimental ECD spectra of **2** and **3**, which are mirror images of each other between 200 and 260 nm, confirming the opposite configuration of the hydroxy group at this position (Figure 2).



The isolates **1**–**7** were tested to determine their effect against αGHY using a well-known spectrophotometric procedure.^{16,17} Only compounds **2** and **3** inhibited the activity of the enzyme in a concentration-dependent manner, with IC_{50} values of 441 ± 23 and $549 \pm 2.5 \mu\text{M}$, respectively. The inhibitory action of these compounds was similar to that of acarbose ($\text{IC}_{50} = 545 \pm 19 \mu\text{M}$), used as positive control. Therefore, on the basis of our previous experiences, these isocoumarins might exert anti-hyperglycemic action *in vivo*.^{6,17} The results also indicated that the absolute configuration at C-4 has little impact on the enzymatic inhibitory activity.

To assess the putative binding mode of compounds **2** and **3** with αGHY , a molecular docking study was carried out using the crystal structure of αGHY (PDB code: 3A4A) in complex with its competitive inhibitor maltose.^{18,19} The docking protocol was validated reproducing the binding mode of natural ligands maltose and isomaltose into the enzyme.¹⁷ The docking results predicted that **2** and **3** bind in a different place to the catalytic domain of αGHY . The binding site for these compounds was found to be composed by Leu-561, Glu-562, Phe-563, Gly-564, Tyr-566, Pro-567, Lys-568, and Val-571. The main interactions were π -cationic, hydrophobic, and hydrogen

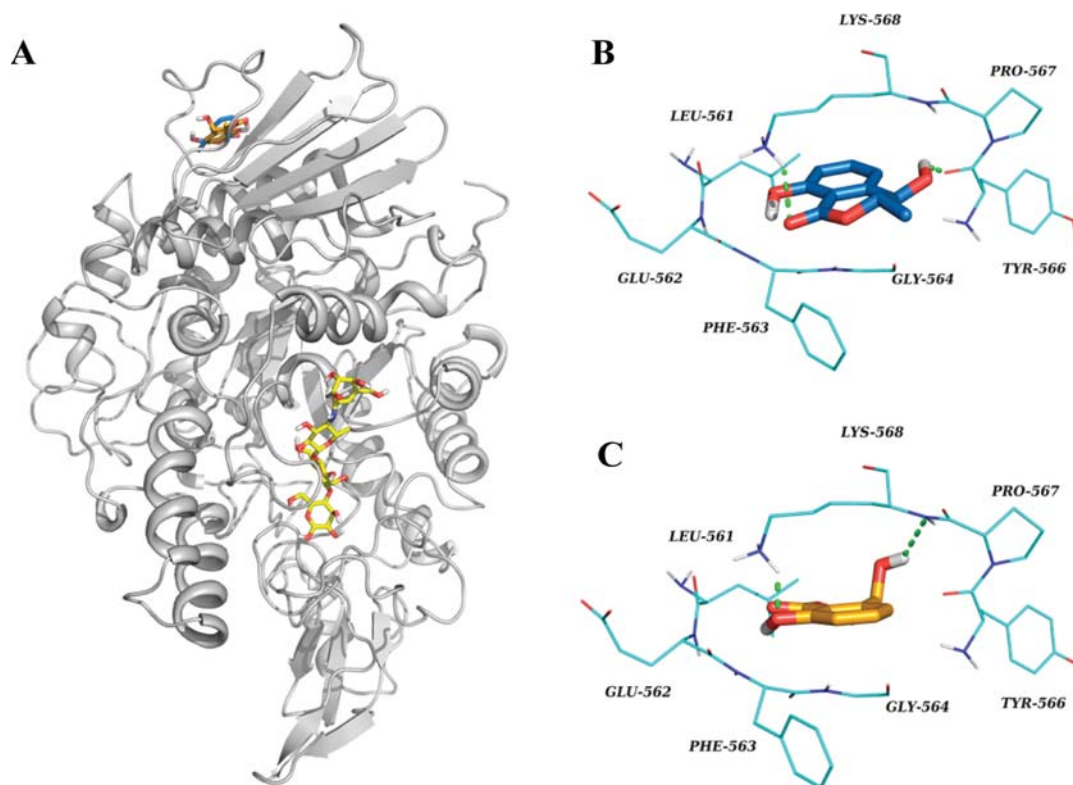


Figure 3. (A) Structural model of the complex 3S,4R-(+)-4-hydroxymellein (**2**) (blue sticks)- α GHY, 3S,4S-(+)-4-hydroxymellein (**3**) (orange sticks)- α GHY, and acarbose (yellow sticks)- α GHY. 3D representation of the interaction between (B) **2** and (C) **3** and α GHY, in the binding site predicted. Graphics generated with PyMol.

bonds between Pro-567 and the hydroxy group at C-4 in **2** and **3** and between Lys-568 and the hydroxy group at C-8 in **2** and the carbonyl group at C-1 in **3** (Figure 3B and C). The results for acarbose are also included for comparative purposes (Figure 3A).

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. IR spectra were obtained using a PerkinElmer 400 FT-IR spectrophotometer. NMR spectra including HSQC, HMBC, COSY, and ROESY were recorded in MeOH- d_4 in a JEOL-ECA 500 spectrometer at 500 (^1H) and 125 MHz (^{13}C) or a Varian Inova 300 at 300 (^1H) and 75 MHz (^{13}C); chemical shifts were recorded as δ values. ECD spectra were recorded on an Aviv 202-01 spectrophotometer in MeOH. HRESIMS were recorded on a Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS (Fourier transform mass spectrometer). Data were collected in both positive and negative ionization modes via a liquid chromatographic/autosampler system that consisted of an Acquity UPLC system. Analytical and preparative HPLC analyses were performed in a Waters system equipped with a 2535 pump and a 2998 photodiode array detector. Control of equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic output were performed by the Empower 3 software (Waters). For analytical, semipreparative, and preparative HPLC, Gemini (C_{18} , 5 μm , 4.6 \times 250 mm, Phenomenex), Symmetry (C_{18} , 5 μm , 7.8 \times 300 mm, Waters), and Gemini (C_{18} , 5 μm , 21.1 \times 250 mm) columns, respectively, were used. Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich-Fluka) or silica gel 60 (70–230 mesh, Merck). Thin-layer chromatography analysis was carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using ceric sulfate (10%) solution in H₂SO₄ as color reagent.

Plant Material. *Hintonia latiflora* leaves were collected and identified by Sol Cristiana-Niizawa in Huetamo (18°31.709' N, 101°4.692' W; 221 masl), State of Michoacán, México, in July 2010. A

voucher specimen (131,316) was deposited at the Herbarium of the School of Sciences (FCME), UNAM, Mexico City.

Fungus Isolation and Identification. The endophytic fungus *X. feejeensis* was isolated from selected mature leaves of *H. latiflora*. To kill the epiphytic fungi, an efficient protocol for surface sterilization was applied.²⁰ Complete intact leaves were immersed in 75% EtOH (1 min), 3.4% aqueous sodium hypochlorite solution (10 min), and 75% EtOH (1 min); afterward the sterilized leaves were rinsed with sterilized distilled H₂O and dried with sterile absorbent paper. Sterilized leaves were cut into 5 \times 5 mm segments and deposited on a Petri dish (3 to 5 pieces per plate) containing PDA (potato-dextrose agar; Difco), streptomycin sulfate (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and cyclosporine A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The pure fungal strain was obtained after serial transfers on PDA and was deposited in the fungal collections of the Herbario Nacional de Mexico (MEXU) and GenBank [28S rRNA/internal transcribed spacer (ITS) region] under the accession numbers MEXU 27555 and KM192122/KM192123, respectively. Nucleotide BLAST analysis of the 28S rRNA gene sequence from the *H. latiflora* endophyte identified *X. feejeensis* (accession JQ862606) among the top matches, having high coverage (94%) and percent identity (99%) (Figure S22). On the other hand, BLAST analysis of the ITS region was very supportive of it being an isolate of *X. feejeensis*. Most accessions among the top matches were from this species, with accession HM992808 having 94% coverage and 100% identity (Figure S23).

Fermentation, Extraction, and Isolation. The endophytic fungus *X. feejeensis* was cultured at room temperature in two Fernbach flasks containing 200 g of rice and 400 mL of water, which were inoculated using seed cultures grown in the PDB media and incubated at room temperature for 8 days at 200 rpm. After 30 days of fungal growth, the culture media was extracted exhaustively with 1:1 CH₂Cl₂–MeOH (3 \times 2 L), and the resulting extract was evaporated *in vacuo* to yield 4.0 g of a brown solid residue. Part of this extract (3.5 g) was resuspended in a 1:1 mix of MeCN–MeOH and subjected to a

CONACyT to pursue graduate studies. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the Mizli System.

■ REFERENCES

- (1) Ainsworth, G. C. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*; CABI, 2008.
- (2) Song, F.; Wu, S.-H.; Zhai, Y.-Z.; Xuan, Q.-C.; Wang, T. *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 673–694.
- (3) Baraban, E. G.; Morin, J. B.; Phillips, G. M.; Phillips, A. J.; Strobel, S. A.; Handelsman, J. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (31), 4058–4060.
- (4) Aguirre, F.; Brown, A.; Cho, N. H.; Dahlquist, G.; Dodd, S. *IDF Diabetes Atlas*, 6th ed.; International Diabetes Federation, 2013; pp 11–49.
- (5) Israili, Z. H. *Am. J. Ther.* **2011**, *18*, 117–152.
- (6) Mata, R.; Cristians, S.; Escandón-Rivera, S.; Juárez-Reyes, K.; Rivero-Cruz, I. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 468–483.
- (7) Devys, M.; Barbier, M.; Bousquet, J. F.; Kollmann, A. *Z. Naturforsch.* **1992**, 779–781.
- (8) Tansuwan, S.; Pornpakakul, S.; Roengsumran, S.; Petsom, A.; Muangsin, N.; Sihanonta, P.; Chaichit, N. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1620–1623.
- (9) Tansuwan, S.; Chanaprat, P.; Teerawatananond, T.; Muangsin, N.; Pornpakakul, S. *Acta Crystallogr.* **2010**, *E66* (2263), 1–8.
- (10) He, J.; Wijeratne, E. M. K.; Bashyal, B. P.; Zhan, J.; Seliga, C. J.; Liu, M. X.; Pierson, E. E.; Pierson, L. S.; VanEtten, H. D.; Gunatilaka, A. A. L. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1985–1991.
- (11) Kimura, Y.; Tamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1972**, *36*, 1925–1930.
- (12) Akay, Ş.; Ekiz, G.; Kocabaş, F.; Hameş-Kocabaş, E. E.; Korkmaz, K. S.; Bedir, E. *Phytochem. Lett.* **2014**, *7*, 93–96.
- (13) Acuña, U. M.; Figueroa, M.; Kavalier, A.; Jancovski, N.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1775–1779.
- (14) (a) Mendoza-Espinoza, J. A.; López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R.; Cerda-García-Rojas, C. M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 700–708. (b) López-Vallejo, F.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A. C.; Cerda García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6057–6066.
- (15) Krohn, K.; Bahramsari, R.; Flörke, U.; Ludewig, K.; Kliche-Spory, C.; Michel, A.; Aust, H. J.; Draeger, S.; Schulz, B.; Antus, S. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 313–320.
- (16) Oki, T.; Matsui, T.; Osajima, Y. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 550–553.
- (17) Rivera-Chávez, J.; González-Andrade, M.; González, M. D. C.; Glenn, A. E.; Mata, R. *Phytochemistry* **2013**, *94*, 198–205.
- (18) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (19) Rudnitskaya, A.; Török, B.; Török, M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2010**, *38*, 261–265.
- (20) Rodriguez, R. J.; White, J. F., Jr.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. *New Phytol.* **2009**, *182*, 314–330.
- (21) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH, 2000.
- (22) Rudnitskaya, A.; Török, B.; Török, M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2010**, *38*, 261–265.
- (23) Çifci, G.; Aveyente, V.; Akten, E. D. *Mol. Inf.* **2012**, *31*, 459–471.
- (24) *PyMOL*; DeLano Scientific, 2002.

■ NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

This paper was published ASAP on February 23, 2015, with errors to Table 1, Results and Discussion, and the Supporting Information paragraph. The corrected version was reposted on February 24, 2015.



Research Paper

Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt[☆]

Gerardo D. Anaya-Eugenio, Isabel Rivero-Cruz, José Rivera-Chávez, Rachel Mata*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2014

Received in revised form

22 May 2014

Accepted 23 May 2014

Available online 2 June 2014

Keywords:

Artemisia ludoviciana

Hypoglycemic

Antihyperglycemic

Arglanin

Eupatilin

Salvinine

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Artemisia ludoviciana*, commonly known as “estafiate”, plays an important role in contemporary Mexico for treating several diseases including diabetes. To establish the preclinical efficacy of *Artemisia ludoviciana* as hypoglycemic and/or antihyperglycemic agent using well-known animal models.

Materials and methods: Acute hypoglycemic as well as oral glucose (OGTT) and sucrose (OSTT) tolerance tests were used to demonstrate the value of the plant for treating diabetes. An essential oil (EO), an organic extract (OE) and an infusion (AE) were assayed in normal and NA-STZ-treated mice. The acute toxicity of the three preparations was analyzed by the Lorke method. The infusion was subjected to conventional phytochemical study using chromatographic conventional procedures. Some of the isolates were evaluated using the same pharmacological assays as well as an enzymatic test. The latter was employed to assess their potential inhibitory effect on yeast α -glucosidase.

Results: Oral administration of OE to normal mice significantly decreased blood glucose level only at the dose of 100 mg/kg; in NA-STZ-mice the hypoglycemic effect was observed at the three doses tested (31.6, 100, and 316 mg/kg). The infusion reduced significantly, blood sugar levels only in diabetic mice; the best effect was observed at the dose of 316 mg/kg. The EO was inactive when evaluated in normal mice. Regarding to the antihyperglycemic effect, the best effect was observed with the OE, during the OGTT and OSTT in diabetic mice. The infusion (AE) showed better effects during the OGTT in both normal and diabetic animals at the dose of 100 mg/kg. Finally, the EO was inactive during an OGTT at the three doses tested (31.6, 100, and 316 mg/kg) in diabetic mice. In addition, the results of AE on the enzymatic test using yeast α -glucosidase revealed an inhibition of 45%; this finding was consistent with the results obtained with the same preparation *in vivo* during an OSTT. Conventional phytochemical analysis of the active AE led to the isolation and characterization of eupatilin (**1**), jaceosidin (**2**), arglanin (**3**), salvinine (**4**), and 3,5-dicaffeoylquinic acid (**5**). Biological testing of **1** and **3** revealed their hypoglycemic effect. The hypoglycemic effect of arglanin (**3**) was attenuated in the presence of nicorandil, which suggested that the lactone behaved as an ATP-K⁺-channel blocker as glibenclamide. Salvinine (**4**) turned out to be a mixed α -glucosidase inhibitor, while **3** was inactive.

Conclusions: *Artemisia ludoviciana* preparations showed hypoglycemic and antihyperglycemic effects, which could explain its effectiveness for treating diabetes in contemporary Mexico. Some of the active principles of the plant included compounds **1–5**. These compounds seem to be acting synergistically on different molecular targets which involved glucose absorption and insulin liberation.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type-2 Diabetes mellitus (T2DM) is a complex metabolic disorder characterized by two major defects, which result in impaired glucose uptake: decreased secretion of insulin by the pancreas and resistance to the action of insulin in various tissues

(muscle, liver and adipose). This disease is found worldwide, and according to the International Diabetes Federation (IDF) around 382 million people were affected in 2012; the prevalence is expected to rise beyond 592 million in less than 25 years (Guariguata et al., 2014). The best treatment for T2DM involves hyperglycemic control using appropriate therapies and a healthy lifestyle. Although metformin remains the most important oral agent for the initial management of T2DM, the current therapies include also sulfonylureas, α -glucosidase inhibitors, thiazolidinediones, and dipeptidyl peptidase-4-inhibitors. Frequently, these drugs are combined to make the treatment more efficient (Irons

[☆]Taken in part from the Ph.D. Thesis of G. Anaya-Eugenio.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5289; fax: +52 55 5622 5329.

E-mail address: rachel@unam.mx (R. Mata).

and Minze, 2014). In addition, herbal medicine has played an important role in treating diabetes worldwide for centuries (Simmonds and Howes, 2006).

As elsewhere, the incidence of diabetes in Mexico is very high, with the number of cases increasing rapidly; in 2013 the number of people with T2DM approached 8.2 million, and the prevalence is expected to rise to 15.7 million by 2035 (Guariguata et al., 2014). A large segment of Mexican population believes that treatment with plants is safer and less expensive than with allopathic prescription. This situation is not unusual in a country like Mexico that is rich in medicinal plants strongly attached to the cultural values of the population. Furthermore, some patients stop their conventional treatments and begin using plants (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). According to recent reviews, in Mexico there are at least 383 plant species employed for the treatment of T2DM, but only a few of these have been investigated for their preclinical or clinical efficacy (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Mata et al., 2013). Therefore, it is important to pursue the pharmacological research of a few of these species to support their rational use, and to discover new herbal-based therapies for the treatment of diabetes; the latter issue is more relevant for those long-term diabetic patients who being treated ineffectively suffers from complications of retinopathy, nephropathy, neuropathy coma and cardiovascular diseases.

Artemisia ludoviciana, commonly known as “estafiate”, has been used in Mexico since Pre-Hispanic times (Argueta et al., 1994; Heinrich, 2002). The oldest record that points the medicinal uses of *Artemisia ludoviciana* is found in the Badiano Codex which was written in the XVI century by Martin de la Cruz; in this ancient text this species, under the name of Iztahuyatl, is regarded as useful for treating weak hands, hurt feet, hemorrhoids, madness, and head lice (De la Cruz, 1991). According to Argueta et al. (1994), in the Florentin Codex the species was considered valuable for treating pain, fever, and cough. Later, Francisco Hernández documented its use for hemorrhoids, upset stomach, colics, bronchitis, indigestion, flatulence, dandruff, and inflammation. In the XVIII century, Esteyneffer (1732) first described the efficacy of the plant as anthelmintic. From then to date, most of these uses have persisted, although new uses have emerged and documented in several publications (Argueta et al., 1994; Heinrich, 2002). Thus, in modern Mexico, the infusion prepared from the aerial parts of *Artemisia ludoviciana* plays an important role in traditional healthcare practices for treating parasitic diseases, upset stomach, diarrhea, painful complaints, malfunction of the gall bladder, and diabetes (Argueta et al., 1994; Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). This plant has been also investigated thoroughly in terms of phytochemistry and pharmacology. As a result numerous secondary metabolites are now known to occur being monoterpenoids, sesquiterpenes lactones, and flavonoids the most relevant (Liu and Mabry, 1982; Mata et al., 1984; Ruiz-Cancino et al., 1993; Heinrich, 2002; Bora and Sharma, 2010). A significant number of publications exists concerning its biological activities; these studies have documented its *in vitro* cytotoxic (Vahdati-Mashhadian et al., 2009), antiprotozoal (Calzada et al., 2006) and antibacterial effects (García et al., 2006), including anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Jiménez-Arellanes et al., 2003) and anti-*Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez et al., 2009). Other studies have shown its anti-diarrheal (Zavala-Sánchez et al., 2002) and anti-inflammatory (Bork et al., 1997). Finally, Alarcón-Aguilar et al. (1998) reported that the decoction of the plant was not effective for inhibiting the post-prandial peak during a glucose tolerance test (OGTT) in healthy rabbits, concluding that the plant has not potential as hypoglycemic agent.

On the basis of the above considerations, the present work was undertaken to establish the hypoglycemic and antihyperglycemic effects of preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae), using normal and NA-STZ-treated mice.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Streptozotocin (STZ), nicotinamide (NA), glibenclamide (GLI), acarbose (ACA), glucose, sucrose, nicorandil, and nifedipine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All solvents used were analytical grade and obtained from Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, NJ, USA).

2.2. Animals

ICR male mice, weighting between 20 and 25 g, selected for this study were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.) and kept in an environmentally controlled room maintained at 22 ± 1 °C with alternating 12 h light/dark natural cycle, with free access to standard rodent pellet diet and water *ad libitum*. All studies were conducted according to the principles and guidelines of the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) with the approval of the Institutional Ethical Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/021/11).

2.3. Plant material

Aerial parts of *Artemisia ludoviciana* were collected in San Nicolás Tetelco, Mexico City, on October 2009 by Gerardo Anaya. The plant was authenticated at the Science School Herbarium (FCME), UNAM and a voucher specimen no. 119871 was deposited.

2.4. Samples preparation

The material was air-dried and ground into powder and extracted exhaustively by maceration using dichloromethane-methanol (1:1) at room temperature. After filtration, the organic extract was evaporated to dryness using a vacuum rotary evaporator to yield 30 g of crude extract (OE; 11.1%). The essential oil (EO) was made from 300 g of the dry plant material subjected to hydrodistillation using a modified Clevenger type apparatus for 1.5 h; anhydrous sodium sulphate was used to eliminate water after extraction. The EO was concentrated *in vacuo* to yield a yellow residue (0.56 g; 0.2%). Finally, *Artemisia ludoviciana* infusion (AE) was prepared pouring 1 L of boiling water on 40 g of crude drug; after 30 min, the aqueous extract was filtered and evaporated *in vacuo* to give 4.3 g of a brown residue (yield 10.1%). This process was repeated as necessary to yield 80 g of AE.

2.5. Phytochemical study

2.5.1. General procedures

Electron impact (EI) mass spectra (MS) were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. IR spectra were acquired using KBr disks in a Perkin-Elmer FT 59913 spectrophotometer. The experimental optical rotations at the sodium D-line wavelength of salvinine (4) were recorded in methanol solution on a Perkin-Elmer 243 polarimeter at 23 °C. NMR spectra, including COSY, NOESY, HMBC, and HSQC experiments, were recorded in CDCl₃ or methanol-*d*₄ on a Varian Unity Plus 400 spectrometer operating at either 400 MHz (¹H) or 100 MHz (¹³C), using TMS as an internal standard. Open column chromatography: Silica gel 60 (0.063–0.200 mm), 70–230 mesh (Merck). TLC analyses were carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using a ceric sulphate (10%, p/v) solution in H₂SO₄ as color reagent.

2.5.2. Isolation of eupatilin (1), jaceosidin (2), arglanin (3), salvinine (4), and 3,5-dicaffeoylquinic acid (5)

Sixty three grams of AE were partitioned between ethyl acetate and water (4×1 L); the organic phase was dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The resulting residue (16 g) was chromatographed on silica gel (320 g) using a gradient system of *n*-hexane–ethyl acetate (10:0→0:10) as eluents; this process gave 10 secondary fractions (AE₁–AE₁₀). From fraction AE₅, eluted with *n*-hexane–ethyl acetate (8:2), crystallized 35 mg of a yellow solid identified as eupatilin (1; m.p. 231–232 °C). From fraction AE₆, eluted with *n*-hexane–ethyl acetate (7:3), 25 mg of a yellow powder identified as jaceosidin (2; m.p. 223–224 °C) precipitated. From fraction AE₇, eluted with *n*-hexane–ethyl acetate (7:3), 30 mg of arglanin (3) crystallized spontaneously, m.p. 207–208 °C. Column chromatography of the mother liquors of fraction AE₇ on a silica gel, eluting with a gradient of *n*-hexane–dichloromethane (10:0→0:10) afforded twelve tertiary fractions (AE₇₋₁–AE_{7-XII}), from fraction AE_{7-X} 23 mg of salvinine (4) were obtained as a glassy solid. Preparative TLC on silica gel [EtOAc–CH₂Cl₂–HCOOH–CH₃COOH–H₂O (100:25:10:10:11)] of fraction AE₁₀ (1 g) yielded 300 mg of 3,5 dicaffeoylquinic acid (5). All isolates (Fig. 1) were analyzed by NMR and identified by comparison of their spectral data with those reported in the literature (Mata et al., 1984; Ruiz-Cancino et al., 1993; Cheng-Bi et al., 2009; Csapi et al., 2010; Khan et al., 2012).

2.6. Acute oral toxicity study

The acute oral toxicity of *Artemisia ludoviciana* preparations (OE, AE, EO) was conducted according the Lorke procedure in mice (Lorke, 1983). ICR male mice were divided into four groups of three animals. The control group received vehicle (NaCl 0.9%; 0.2 mL/10 g) and other three groups received the treatments in two phases; in the first one, mice were treated with doses of 10, 100, and 1000 mg/kg of each preparation in separated experiments. In the second phase, the animals received doses of 1600, 2900, and 5000 mg/kg; in both stages, the animals were kept under observation and the body weight was recorded for consecutive 14 days. After this period of time, the toxic effects or macroscopic injuries were observed in the lungs, heart, stomach coma and intestines removed under dissection.

2.7. Pharmacological evaluations

2.7.1. Nicotinamide-streptozotocin (NA-STZ) induced experimental type II diabetes in mice

The animal model for diabetes mellitus type-II study was based on a single intraperitoneal injection of 50 mg/kg of nicotinamide (NA) followed by 120 mg/kg of streptozotocin (STZ) in 100 mM citrate buffer (pH 4.5) 15 min later; afterward food and water was supplied (Escandón-Rivera et al., 2012). The control group only received the vehicle. After seven days, blood glucose level was determined using a glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, CA, USA); mice having blood glucose ≥ 190 mg/dL were considered hyperglycemic and selected for the study.

2.7.2. Acute hypoglycemic study

Acute hypoglycemic activity was evaluated in normal and NA-STZ-treated mice randomly divided into five groups containing eight animals each. In each case, control groups (I and II) were orally administered with vehicle and glibenclamide (GLI; 15 mg/kg), respectively. Groups III–V were treated either with OE, AE, EO, 1 or 3 at the doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg for the preparations, and 5.6, 17.7, and 31.6 mg/kg for the pure compounds. Blood samples were taken from the tail vein at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after to the administration by a small incision at the end of the tail.

2.7.3. Oral glucose (OGTT) and sucrose (OSTT) tolerance tests

Normal or NA-STZ-treated mice were divided also into five groups (I–V) of eight mice each. After four hours fasting, the animals of groups I and II (control) as well as those of groups III–V were administered orally with the treatments (OE, AE or EO) at the doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg. Thirty min after administering the treatments (samples or controls), an oral glucose (1.5 g/kg) or sucrose (3 g/kg) load was given to each animal. Blood glucose levels were determined at 30, 60, 90, and 120 min post-administration of the carbohydrate load. The positive controls employed for the OGTT and OSTT were glibenclamide (GLI, 15 mg/kg) and acarbose (ACA, 5 mg/kg), respectively. The % of glycemic variation was determined as previously described (Escandón-Rivera et al., 2012).

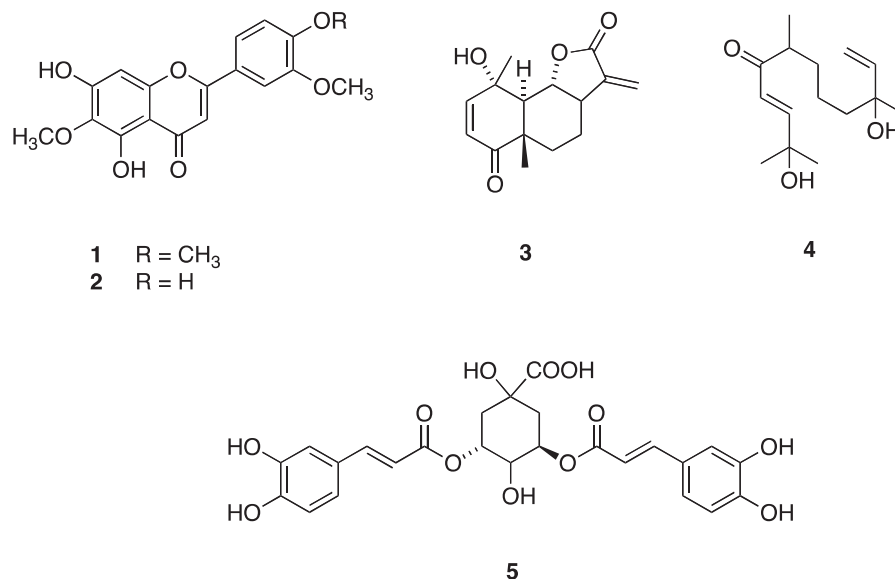


Fig. 1. Metabolites isolated from the infusion of *Artemisia ludoviciana*.

2.7.4. Co-treatment of compounds **1** and **3** with Ca^{2+} and K^{+} ion channels regulators

NA-STZ-treated mice were randomly divided into seven groups of six mice each. Control group was administrated with vehicle (Group I). Groups II–IV were treated orally with glibenclamide (15 mg/kg), eupatilin (**1**) and arglanin (**3**) the last two at the dose of 17.7 mg/kg. Groups V–VII were administered with

glibenclamide (15 mg/kg), eupatilin (**1**, 17.7 mg/kg) and arglanin (**3**, 17.7 mg/kg), respectively plus nifedipine (13.6 mg/kg). The last three groups VIII–X were given glibenclamide (15 mg/kg), eupatilin (**1**, 17.7 mg/kg) and arglanin (**3**, 17.7 mg/kg) respectively plus nicorandil (6.8 mg/kg). Blood samples were collected from tail veins at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h post-treatment (Wu et al., 2011).

2.7.5. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error. Statistical significance differences were ascertained by means of *post-hoc* Dunnett's test using GraphPad Prism 5.0 software. A value of $p \leq 0.05$ indicates significant differences between groups.

2.8. Assay for α -glucosidase inhibitors

The aqueous extract (AE), compounds **2–4** and ACA (positive control) were dissolved in MeOH or phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH 7). Aliquots of 0–10 μ L of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20 μ L of enzyme stock solution [0.125 units of yeast α -glucosidase (α GHY) in PBS]. After incubation, 10 μ L of substrate [4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG), 5 mM] was added and incubated for 20 min at 37 $^{\circ}$ C. Absorbance at 405 nm was then determined (Escandón-Rivera et al., 2012).

The inhibitory activity of the extract was calculated as a percentage in comparison to a blank according with the following equation:

$$\% \alpha\text{-GHY of inhibition} = 1 - (A_{405t_n} - A_{405t_0}) \times 100$$

where $\% \alpha$ -GHY is the percentage of inhibition, A_{405t_n} is the corrected absorbance of AE or compound testing and A_{405t_0} is the absorbance of blank. The concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50% (IC_{50}) was calculated by regression analysis, using the

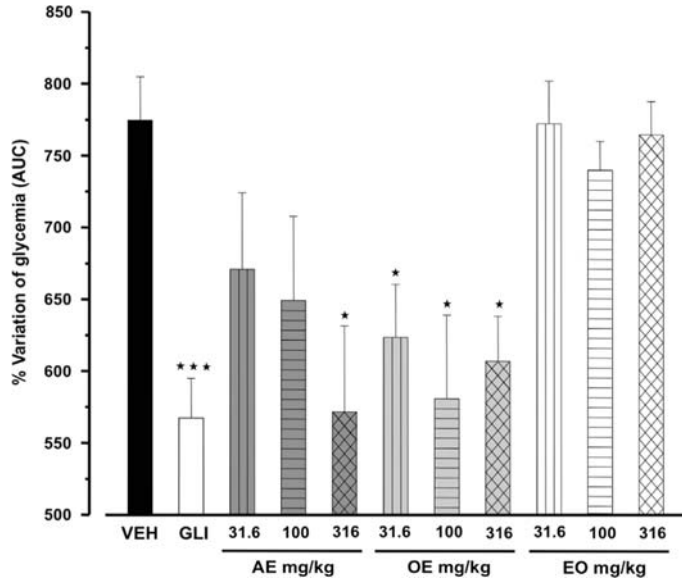


Fig. 2. Hypoglycemic activity of *Artemisia ludoviciana* preparations: aqueous (AE) and organic extracts (OE), and essential oil (EO) in NA-STZ-treated mice. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

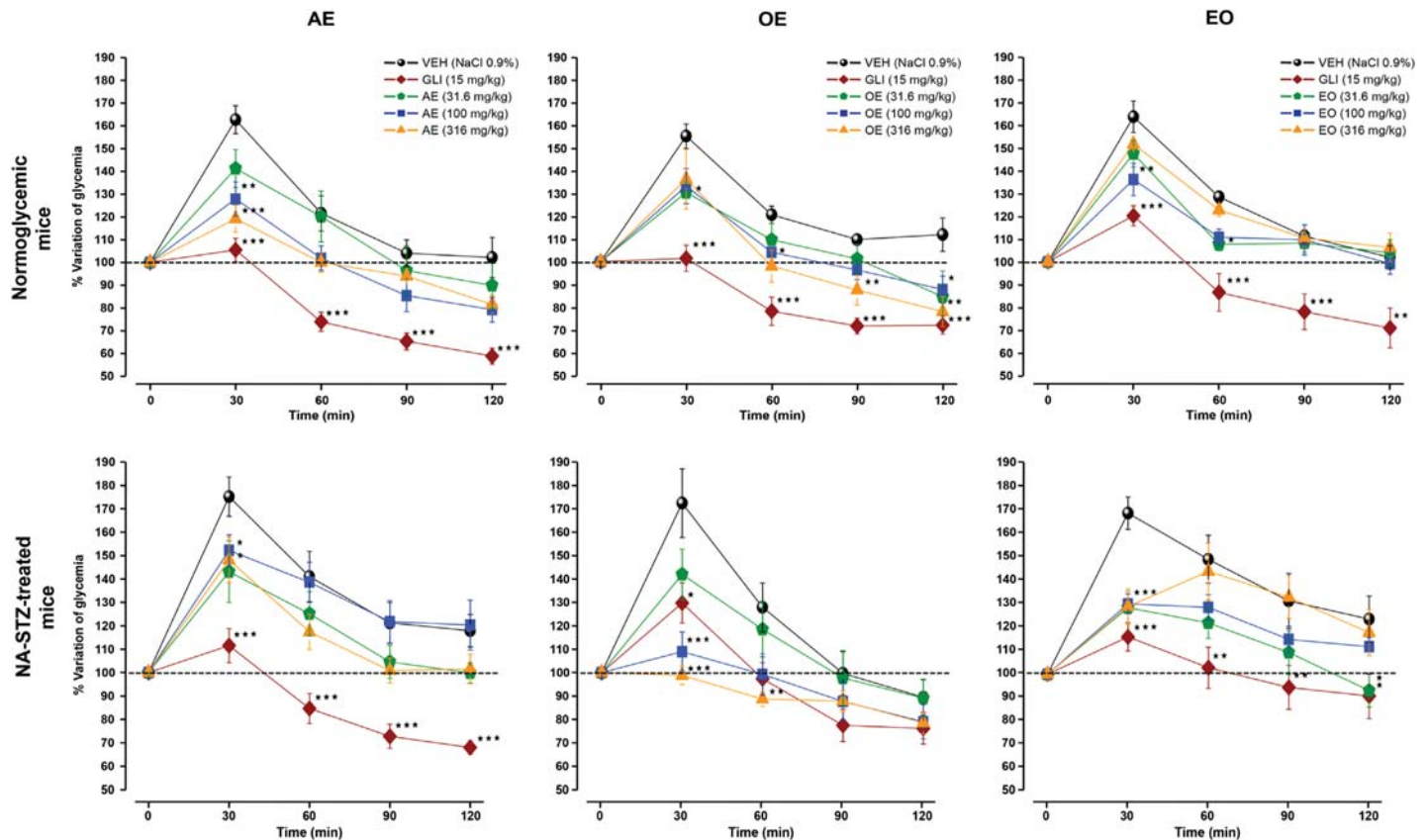


Fig. 3. Effect of AE, OE and EO from *Artemisia ludoviciana* on blood glucose levels in normal and NA-STZ treated mice during an OGTT. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

following equation:

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{A_{100}}{1 + (I/IC_{50})^s}$$

where A_{100} is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC_{50} is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and s is the cooperative degree (Copeland, 2000).

The mode of inhibition of α -glucosidase was determined by a double reciprocal Lineweaver–Burk plots. Nonlinear least regression was used to determine the inhibitory constants. The inhibition is described by the following equation:

$$v = \frac{V_{\max}S}{k_m(1 + [I]/k_i) + S(1 + [I]/\alpha k_i)}$$

where v is the initial velocity in the absence and presence of the inhibitor; S and I , are the concentration of substrate and inhibitor, respectively; V_{\max} is the maximum velocity; k_m is the Michaelis–Menten constant; k_i is the competitive inhibition constant, and αk_i is the uncompetitive inhibition constant. The kinetic data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software.

2.9. Docking of salvinine (4)

First yeast isomaltase (α -GHY) crystallographic structure was downloaded from the Protein Data Bank site (PDB:3A4A).

Subsequently all hydrogen and Kollman charges were assigned using AutoDockTools 1.5.4. The starting conformation of the ligand was an energy-minimized form with geometric optimization using the program HyperChem 8.0. ACA and salvinine (4) were prepared by assigning the Gasteiger–Marsilli atomic charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.4 (<http://mglttools.scripps.edu/>). Blind docking was carried out with AutoDock4 software (<http://autodock.scripps.edu/>) using the default parameters, except for the number of GA runs (100) and the Lamarckian genetic algorithm with local search and 25 million energy evaluations (Long. Evals.) per run. The protein was held rigid during the docking process while the ligands were allowed to be flexible. The grid box size was $126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA}$ in the x , y and z dimensions, with the center of the grid corresponding to the protein.

3. Results and discussion

3.1. Acute oral toxicity study

Acute toxicity was first studied in mice according to the Lorke procedure. All preparations (OE, AE, and EO) of *Artemisia ludoviciana* did not provoke behavior alterations, lesions, or bleeding of the internal tissues and organs of the animals throughout the experiments; in all cases the LD_{50} must be greater than 5000 mg/kg. Therefore, according to the Lorke criteria the

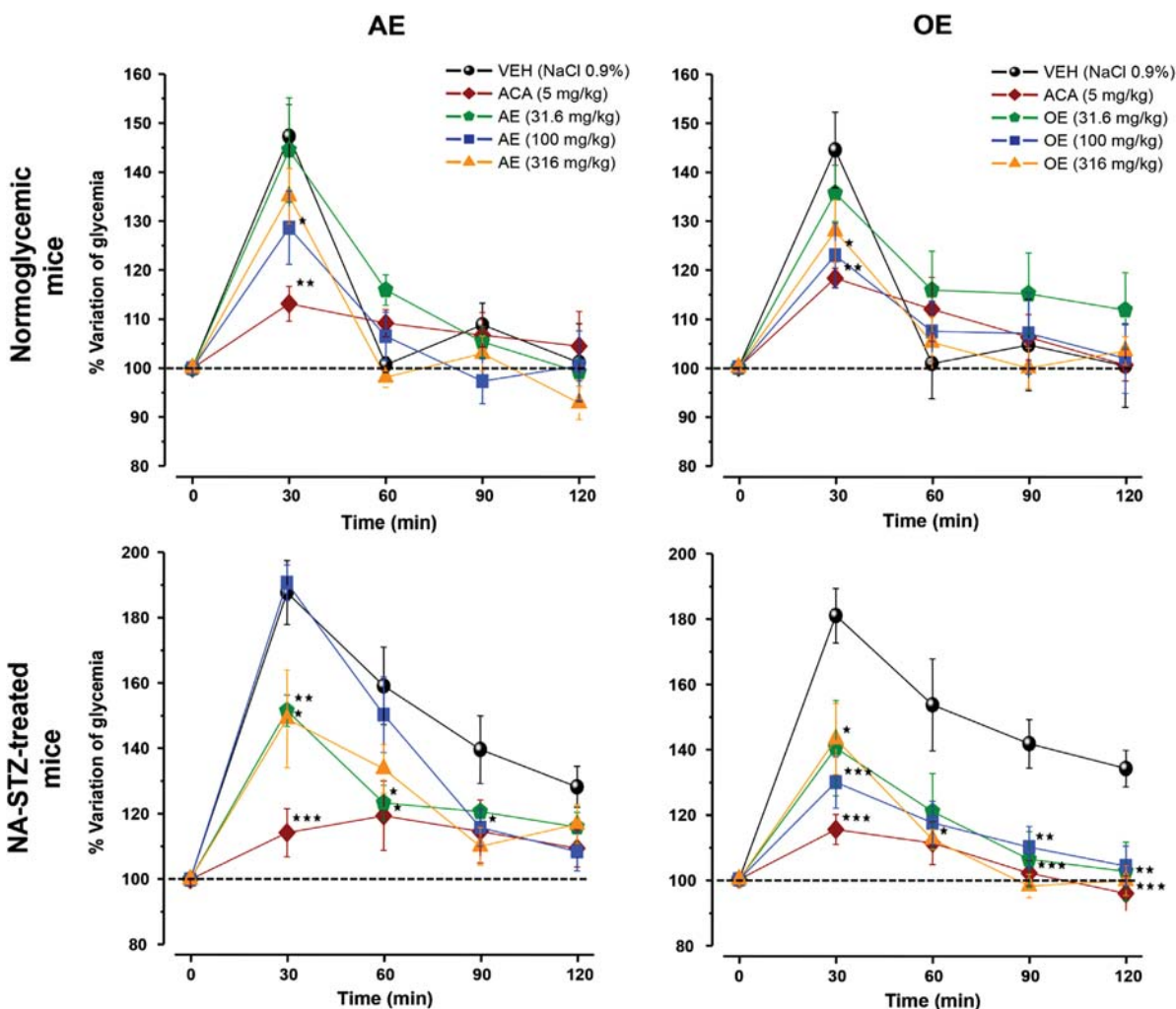


Fig. 4. Effect of AE and OE from *Artemisia ludoviciana* on blood glucose levels in normal and NA-STZ treated mice during an OSTT. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

three preparations of *Artemisia ludoviciana* tested are devoid of acute toxic effects for mice.

3.2. Hypoglycemic and antihyperglycemic activities of *Artemisia ludoviciana* preparations

Artemisia ludoviciana is widely commercialized in contemporary Mexico for the treatment of several illnesses, including diabetes. This fact encouraged us to establish its preclinical efficacy as a hypoglycemic agent using well-known animal models. Three different preparations (OE, AE and EO) were tested in both normal and NA-STZ-treated mice using logarithmic doses (31, 100, and 316 mg/kg); the doses were chosen according to a standard protocol of allometric scaling (Wojcikowski and Gobe, 2014). Oral administration of OE to normal mice (Fig. S1) significantly decreased blood glucose level at the dose of 100 mg/kg. However, in NA-STZ-treated mice, an important hypoglycemic effect was observed in the groups treated with OE at the three doses tested (Fig. 2); the effect was comparable to that of GLI (15 mg/kg). In the

OGTT (Fig. 3), the OE at 31.6 mg/kg induced a significant drop in the postprandial peak after the glucose challenge in normal mice, in diabetics, the effect was observed at the doses of 100 and 316 mg/kg. Finally, during the OSTT (Fig. 4) the preparation reduced glucose levels in blood after the administration of the disaccharide; the effect was more pronounced in diabetic mice.

The aqueous extract (AE) was also evaluated as hypoglycemic agent considering that the plant is consumed as infusion (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). Treatments of mice with AE reduced significantly, in a non-dependent dose manner, blood sugar levels in diabetic mice; the best effect was observed at the dose of 316 mg/kg. In normal mice no significant changes in blood glucose concentrations were observed at all doses tested, although, a lowering trend was observed. In the oral glucose tolerance test (OGTT), AE at the doses of 100 and 316 mg/kg provoke an important decrease of the postprandial peak (Fig. 3) in both normal and treated mice.

Next, AE was enzymatically tested to find out the presence of α -glucosidase inhibitors using a spectrophotometric assay.

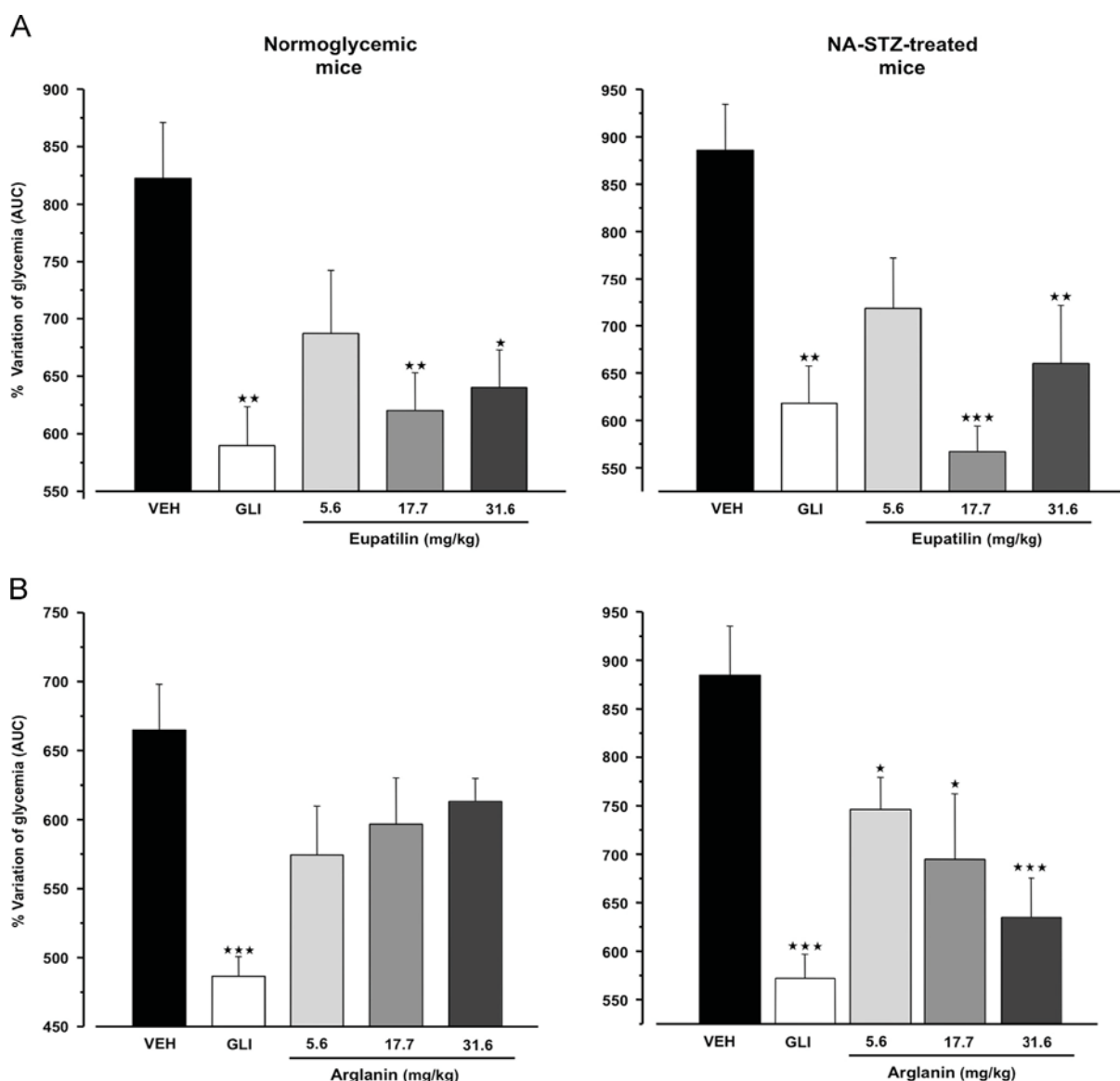


Fig. 5. Hypoglycemic activity of (A) eupatilin (1) and (B) arglanin (3) isolated from *Artemisia ludoviciana* in both normal and NA-STZ-treated mice. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

The results revealed that AE inhibited by 45% the activity of the enzyme, suggesting the presence of such inhibitors. The results of an OSTT in diabetic mice supported *in vivo* this hypothesis (Fig. 4).

Finally, EO was tested because it is commonly sold by several laboratories throughout Mexico for treating several complaints; the oil did not induce hypoglycemic action in both normal and diabetic mice (Fig. 2). As OE the essential oil was capable of promote glucose uptake or/and utilization since it induces an important lowering of the postprandial peak during the OGTT in normal and diabetic mice. This preparation, however, did not affect the postprandial peak in the OSTT.

Altogether these pharmacological results revealed the potential of *Artemisia ludoviciana* as hypoglycemic and antihyperglycemic agent. Other species of this genus have also demonstrated potential for the development of new preparations for treating diabetes, in particular *Artemisia herba-alba* (Al-Waili, 1986), *Artemisia dracunculus* (Obanda et al., 2012), *Artemisia princeps* (Jung et al., 2007), *Artemisia capillaris* (Islam et al., 2013), and *Artemisia judaica* (Nofal et al., 2009). Furthermore, from *Artemisia dracunculus*, an ethanol preparation, named Tarralin™, has been developed (Ribnicky et al., 2006); and from *Artemisia judaica*, a patent was developed concerning a novel methodology for the preparation of clinically useful extracts possessing insulin-like activity (Whittle and Skett, 2002). From *Artemisia capillaris*, a tablet and a rice cracker containing the aqueous extract were also formulated for treating diabetes (Masao et al., 2013). From *Artemisia argyi* and *Prunellae spica*, an insulin mimetic preparation was developed which inhibits the activity of protein tyrosine phosphatase 1B (PTB1B) (Gyeong et al., 2013). From *Artemisia rupestris* another preparation was developed (Qunfang et al., 2011). Finally, *Artemisia annua* can be combined with drugs and health foods for controlling postprandial blood sugar, alleviating insulin resistance, and for preventing and treating diabetes (Shuying et al., 2011).

3.3. Chemistry

Although previous chemical studies of these species revealed the presence of a number of flavonoids with antidiabetic properties *in vivo* and/or *in vitro*, chemical analysis of the infusion of *Artemisia ludoviciana* was initiated with the purpose of identify all possible active components. Thus, the application of conventional partition and chromatographic procedures allowed the isolation of eupatilin (1), jaceosidin (2), arglanin (3), \pm salvinine (4), and 3,5-dicaffeoylquinic acid (5), which is the major component of the infusion according to the chromatographic profiles. The identification and characterization of these metabolites were accomplished by means of IR, NMR and MS analyses. The last two compounds are reported for the first time in *Artemisia ludoviciana*. This is the second report of the occurrence of salvinine (4) in nature; it was previously isolated from *Salvia divaricata* as a racemic mixture (Ulubelen, 1992). The $[\alpha]_D$ value obtained in the present study as well as its spectral data is included in the supplementary information (Figs. S4 and S5). Eupatilin (1) and jaceosidin (2) has been previously reported in *Artemisia ludoviciana*.

3.4. Hypoglycemic effect of eupatilin (1) and arglanin (3)

In a previous investigation, eupatilin (1) demonstrated noted hypoglycemic action in a subchronic experiment in Db/db mice. The flavonoid also decreased HbA_{1c}, plasma glucagon levels with the simultaneous increase of insulin and adiponectin levels; in the same work it was also established that eupatilin (1) supplementation modified the activity of a few hepatic enzymes involved in glucose metabolism (Kang et al., 2008). These results could in part explain the effects of the OE and AE. Arglanin (3), however, has not been analyzed for its antidiabetic potential. Therefore its

hypoglycemic action in mice (Fig. 5) at the doses of 5.6, 17.7, and 31.6 mg/kg was assessed using 1 and GLI as positive control. The sesquiterpene lactone induced a significant dose-dependent reduction on blood glucose levels in diabetic mice. However, eupatilin (1) showed the best effect.

When plasma glucose level rises, insulin secretion is promoted by closure of K⁺-ATP and activation of voltage-dependent Ca²⁺ channels; these effects produce membrane depolarization which triggers Ca²⁺ entry and insulin release (Rorsman et al., 2011). The potential involvement of K⁺-ATP sensitive and Ca²⁺ voltage dependent channels in the hypoglycemic action of eupatilin (1) and arglanin (3) was next investigated. For that two set of experiments were carried out in the presence of nicorandil and nifedipine a K⁺-ATP channel opening drug and a Ca²⁺ channel blocker, respectively. Glibenclamide was also included in these experiments since this drug induces hypoglycemic action by a mechanism, which involves insulin liberation by closing K⁺-ATP channels in pancreatic β cells. The results revealed (Fig. 6) that co-treatment of diabetic mice (NA-STZ) with nicorandil (6.8 mg/kg) or nifedipine (13.6 mg/kg) and GLI (10 mg/kg) or 3 (17.7 mg/kg) reduced significantly the hypoglycemic action of GLI and the natural product. These data suggest that compound 3 exert its hypoglycemic activity promoting insulin secretion via a mechanism involving K⁺-ATP channel blocking as GLI does. On the other hand, with 1 (17.7 mg/kg) the hypoglycemic activity was only attenuated when co-administered with nifedipine (Fig. 6). This information was consistent with 1 being a modulator of intracellular Ca²⁺ concentration.

In addition, to the results described above it has been reported that 1 and 2 lowered fasting blood glucose concentration in Db/db mice significantly, reduced hemoglobin HbA_{1c}, and plasma glucagon levels along with a simultaneous increase in plasma insulin and adiponectin levels, lowered hepatic glucose-6-phosphatase, and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities, and increased glucokinase activity in the liver (Kang et al., 2007, 2008). Thus, as in the case of *Artemisia princeps* the presence of 1 and 2 in *Artemisia ludoviciana* contributes highly to its hypoglycemic

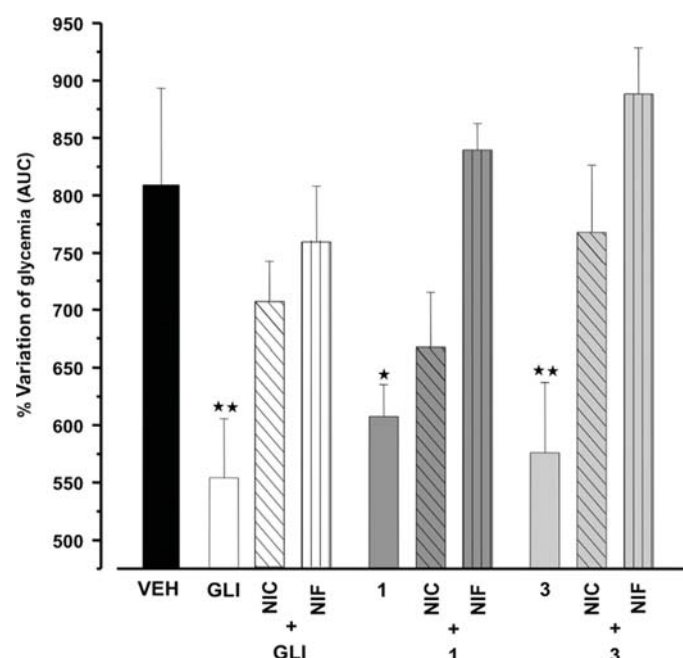


Fig. 6. Effect of nicorandil (NIC, 6.8 mg/kg), and nifedipine (NIF, 13.6 mg/kg), potassium and calcium ion channels regulators, on the hypoglycemic activity of the GLI (15 mg/kg), eupatilin (1, 17.7 mg/kg), and arglanin (3, 17.7 mg/kg) in NA-STZ-treated mice. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

properties. A preparation containing both compounds was developed from *Artemisia princeps* for preventing and treating diabetes mellitus (Myeong et al., 2009).

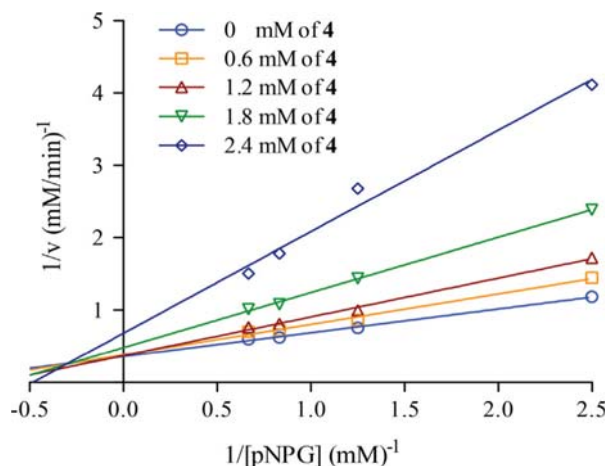


Fig. 7. Double reciprocal Lineweaver-Burk plot of α -glucosidase yeast inhibition of salvinine (**4**) at different concentrations of substrate (pNPG).

In the case of 3,5 dicaffeoylquinic acid (**5**), its antihyperglycemic potential has been reported a few times (Matsui et al., 2004).

3.5. Effect of arglanin (**3**) and salvinine (**4**) on the activity of yeast α -glucosidase

Compound **4** inhibited α GHY, a type I α -glucosidase which hydrolyzes heterogeneous substrates including sucrose and pNPG, in a concentration-dependent manner with an IC_{50} value of 1.65 mM. The effect, was however lower than that of ACA (positive control, $IC_{50}=545.4 \mu\text{M}$). Compound **3** was inactive and **1**, **2** and **5** were not evaluated because their inhibitory effect on yeast α -glucosidase has been already analyzed (Gao et al., 2010; Zhang et al., 2013). In particular, **1** was able to inhibit the activity of the enzyme with an IC_{50} of $0.49 \mu\text{M}$ vs. $5.5 \mu\text{M}$ for ACA.

In order to obtain further evidence of the nature of the interaction of **4** with α GHY a kinetic analysis was carried out; ACA was also included in the study. Double reciprocal Lineweaver-Burk plots were constructed using different concentrations of inhibitors and substrate. The results in Fig. 7 revealed that **4** behaved as a mixed type of inhibitor, with series of lines with different slopes intersecting in the first quadrant between x and y axes. The calculated k_i and α values were 1.34 and $3.19 \mu\text{M}$, respectively. These results suggested that **4** binds to α -GHY and/or

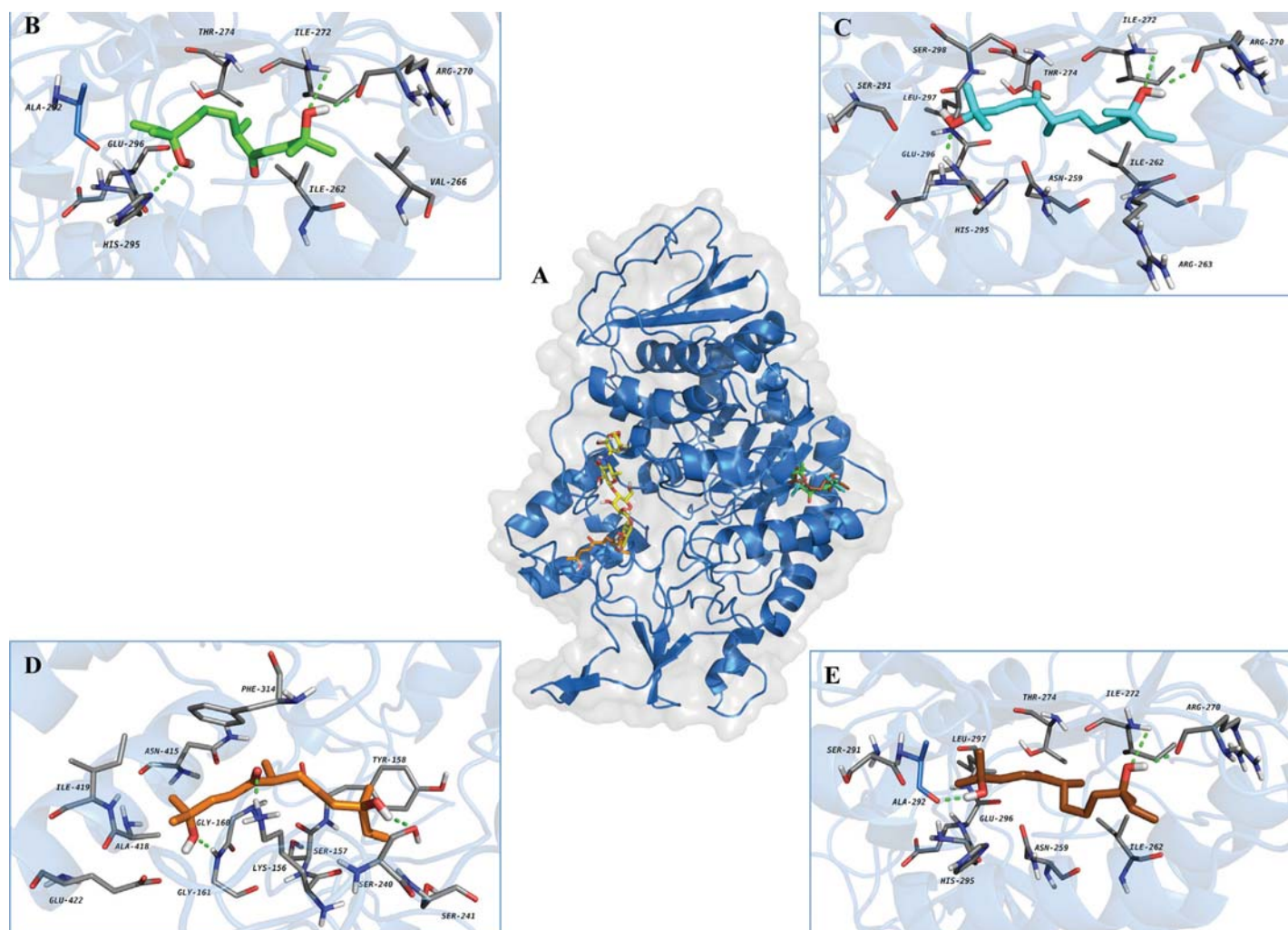


Fig. 8. (A) Structural model of diastereoisomers **4a–4d** (green, cyan, orange and brown sticks, respectively) – α -GHY and acarbose (yellow sticks) – α -GHY. 3D Representation of the interaction between α -GHY and salvinine diastereoisomers **4a** (B), **4b** (C), **4c** (D), and **4d** (E) in the binding site predicted. Graphics generated with PyMol. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

- Islam, N.Md., Jung, H.A., Sohn, H.S., Kim, H.M., Choi, J.S., 2013. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Archives of Pharmacal Research* 36, 542–552.
- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J., 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research* 17, 903–908.
- Jung, J.U., Baek, N.I., Chung, H.G., Bang, M.H., Yoo, J.S., Jeong, T.S., Lee, K.T., Kang, Y.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Yeo, J.Y., Choi, M.S., 2007. The anti-diabetic effects of ethanol extract from two variants of *Artemisia princeps* Pampanini in C57BL/KsJ-db/db mice. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2022–2029.
- Kang, Y.J., Jung, U.J., Jeon, S.M., Yeo, J.E., Kim, H.J., Kim, D.J., Lee, M.K., Baek, N.I., Chung, H.G., Choi, M.S., 2007. Antihyperglycemic and antioxidant properties of jaceosidin, a flavonoid isolated from *Artemisia princeps*, in type 2 diabetic mice. *Diabetes* 56, A667.
- Kang, Y.J., Jung, U.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Jeon, S.M., Park, Y.B., Chung, H.G., Baek, N.I., Lee, K.T., Jeong, T.S., Choi, M.S., 2008. Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic β -cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice* 82, 25–32.
- Khan, M., Yu, B., Rasul, A., Shawi, A.A., Yi, F., Yang, H., Ma, T., 2012. Jaceosidin induces apoptosis in U87 glioblastoma cells through G2/M phase arrest. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/703034>.
- Liu, Y.L., Mabry, T.J., 1982. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry* 21, 209–214.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Masao, T., Yoshihiko, N., Takashi, T., Hiroshi, H., Atsuko, Y., 2013. Adiponectin Production Promoting Compositions Containing Aqueous Extract of *Artemisia capillaris* and Cosmetics, Health Food, and Pharmaceuticals Containing the Compositions. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 2013237658A 20131128*.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products* 76, 468–483.
- Mata, R., Delgado, G., Romo del Vivar, A., 1984. Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry* 23, 1665–1668.
- Matsui, T., Ebuchi, S., Fujise, T., Abesundara, K., Doi, S., Yamada, H., Matsumoto, K., 2004. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-*o*-caffeoylquinic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1797–1803.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19, 1639–1662.
- Myeong, S.C., Yeong, J.K., Seon, M.J., 2009. Eupatilin and Jaceosidin for Preventing and Treating Diabetes Mellitus. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo. KR 2009066858A 20090624*.
- Nofal, S.M., Mahmoud, S.S., Ramadan, A., Soliman, G.A., Fawzy, R., 2009. Anti-diabetic effect of *Artemisia judaica* extracts. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 4, 42–48.
- Obanda, D.N., Hernández, A., Ribnicky, D., Yu, Y., Zhang, X.H., Wang, Z.Q., Cefalu, W.T., 2012. Bioactives of *Artemisia dracunculul* L. mitigate the role of ceramides in attenuating insulin signaling in rat skeletal muscle cells. *Diabetes* 61, 597–605.
- Qunfang, C., Meizhu, F., Xiaoning, L., Yonghong, F., Yongxing, W., Xin, X., 2011. Application of *Artemisia rupestris* Preparation in Medicine for Treating Diabetes. *Faming Zhuanli Shenqing CN 102166243A 20110831*.
- Ribnicky, D.M., Poulev, A., Watford, M., Cefalu, W.T., Raskin, I., 2006. Antihyperglycemic activity of Tarralin, an ethanolic extract of *Artemisia dracunculul* L. *Phytomedicine* 8, 550–557.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Kanno, T., Zhang, Q., Gopel, S., 2011. Electrophysiology of pancreatic β -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 224–235.
- Rudnitskaya, A., Torok, B., Torok, M., 2010. Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 38, 261–265.
- Ruiz-Cancino, A., Cano, A.E., Delgado, G., 1993. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *Mexicana*. *Phytochemistry* 33, 1113–1115.
- Shuying, H., Zhilu, W., Jianxing, W., Jinxiu, C., Hong, J., Liping, W., 2011. Process for Manufacturing Extract of *Artemisia annua* for Controlling Postprandial Blood Sugar. *Faming Zhuanli Shenqing CN 101933965A 20110105*.
- Simmonds, M.S.J., Howes, M.J.R., 2006. Plants used in the treatment of diabetes. In: Soumyanath, A. (Ed.), *Traditional Medicines for Modern Times Antidiabetic Plants*. Taylor and Francis Inc., Boca Raton, pp. 19–82.
- Ulubelen, A., 1992. New diterpenoids from *Salvia divaricata*. *Journal of Natural Products* 55, 1518–1521.
- Vahdati-Mashhadian, N., Emami, S.A., Oghazian, M.B., Vosough, R., 2009. The cytotoxicity evaluation of seven species of *Artemisia* on human tumor cell lines. *Pharmacologyonline* 1, 229–242.
- Whittle, B.A., Skett, P.G., 2002. *Artemisia judaica* Fractionation Method. *Phytotech Limited. US 6350478 B1*.
- Wojcikowski, K., Gobe, G., 2014. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytotherapy Research* 28, 22–27.
- Wu, C., Li, Y., Chen, Y., Lao, X., Sheng, L., Dai, R., 2011. Hypoglycemic effect of *Belamcanda chinensis* leaf extract in normal and STZ-induced diabetic rats and its potential active fraction. *Phytomedicine* 18, 292–297.
- Xu, H., 2010. Inhibition kinetics of flavonoids on yeast-glucosidase merged with docking simulations. *Protein and Peptide Letters* 17, 1270–1279.
- Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Sánchez-Saldivar, D., Arias-García, L., 2002. Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology* 40, 263–268.
- Zhang, Z., Luo, A., Zhong, K., Huang, Y., Gao, Y., Zhang, J., Gao, H., Xu, Z., Gao, X., 2013. α -Glucosidase inhibitory activity by the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Functional Foods* 5, 1253–1259.