



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INHIBIDORES DE α -GLUCOSIDASAS DE LA ESPECIE FÚNGICA
Sporormiella minimoides.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. F. B. MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F., AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
VOCAL: Dr. Francisco Hernández Luis
VOCAL: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
VOCAL: Dr. Martin González Andrade
SECRETARIO: Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

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

Congresos

Los resultados obtenidos a partir de este proyecto se presentaron en el QuimiUNAM 2015:

- α -Glucosidase inhibitors from *Sporormiella minimoides*. Poster. Manuel Eduardo Rangel Grimaldo, Abraham Madariaga M., Isabel Rivero C., Mario Figueroa S., Rachel Mata E. QuimiUNAM 2015, (22-24 de Abril, 2015), Ciudad Universitaria, D.F., México.

Q.F.B. Manuel Eduardo Rangel Grimaldo
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Químicas, a la Facultad de Química y la UNAM por brindarme la oportunidad de superarme y ampliar mi formación académica.
- Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (Becario: 294309) y por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto (CONACyT 219765).
- A la Dra. Rachel Mata por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por toda la ayuda y consejos otorgados para el desarrollo del presente trabajo. Muchísimas Gracias.
- A la Dra. Isabel Rivero y al Dr. Abraham Madariaga, por brindarme sus conocimientos, su apoyo y sobretodo su invaluable amistad en los momentos difíciles, tanto académicos como personales. Muchas gracias.
- A la M. en C. Laura Flores por el apoyo en la realización de los ensayos biológicos.
- Al Dr. Abraham Madariaga por el apoyo en la realización de los cálculos de acoplamiento molecular.
- Al personal técnico de la USAI, por el registro de los espectros utilizados en el presente trabajo.
- A los miembros del jurado, por las revisiones y observaciones realizadas, las cuales enriquecieron el presente trabajo.
- A todos mis compañeros del Laboratorio 124, Paulina del Valle, Laura Flores, Berenice Ovalle, Ana Laura, Krutzkaya Juárez, Martha Leyte, Abraham Madariaga, José Alberto Rivera, Gerardo Anaya, gracias a todos.

DEDICATORIA

A Dios por estar conmigo en todo momento, a mi papá Manuel Rangel, a mi mamá María Elena Grimaldo y a mi hermana Dulce Elena Rangel, por todo el amor y el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, este logro también es suyo. Gracias por confiar en mí.

¡Gracias!

“Entonces lo comprendí... el miedo no es real. El único lugar donde existe es nuestras ideas sobre el futuro. Es un producto de nuestra imaginación que nos hace temer a cosas que no hay en el presente y que tal vez jamás existan. No me malinterpretes, el peligro es muy real, pero el miedo es una elección”.

Will Smith.

ÍNDICE

Lista de figuras	III
Lista de cuadros	IV
Lista de tablas.....	IV
Lista de esquemas.....	IV
Lista de abreviaturas.....	V
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Diabetes mellitus (DM).	5
2.2. Tratamiento de la diabetes mellitus.	7
2.3. Inhibidores de la enzima α -glucosidasa utilizados en el tratamiento de la diabetes.	10
2.4. Inhibidores selectos de la enzima α -glucosidasa obtenidos a partir de fuentes naturales.....	14
2.5. Hongos endófitos como fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos.	17
2.6. Antecedentes del genero <i>Sporormiella</i>	27
2.7. Antecedentes de las especie endófito <i>Sporormiella minimoides</i> (Pleosporales).	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
4.1. Hipótesis.	34
4.2. Objetivo.....	34
4.3. Objetivos Particulares.	34
5. PARTE EXPERIMENTAL	36
5.1. Material fúngico.....	36
5.2. Procedimientos generales.....	36

5.2.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	36
5.2.2. Análisis cromatográficos.....	37
5.3. Fermentación de la especie fúngica objeto de estudio.....	38
5.4. Estudio químico de las especies fúngicas.....	39
5.4.1. Preparación del extracto orgánico.....	39
5.4.2. Fraccionamiento de extracto orgánico.....	39
5.4.3. Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en <i>S. minimoides</i>	41
5.5. Ensayos biológicos.....	43
5.5.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
5.6. Estudio de acoplamiento molecular.....	45
5.6.1. Acoplamiento molecular.....	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1. Estudio químico de la especie <i>Sporormiella minimoides</i>	47
6.1.1. 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51).....	48
6.1.2. Preusocromona C (52).....	54
6.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura.....	59
6.2.1. Evaluación del efecto de la fracción primaria (MeCN/MeOH) sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura.....	59
6.2.3. Ensayos de Cinética enzimática.....	62
6.3. Estudios de Acoplamiento Molecular.....	65
7. CONCLUSIONES	71
8. BIBLIOGRAFÍA	72
9. ANEXO	88

Lista de figuras

Figura		Página
1	Número de personas con DM2 por región (IDF Atlas, 6 ed. 2014).	6
2	Principales complicaciones de la diabetes.	7
3	Ubicación de las enzimas α -glucosidasas.	11
4	<i>Sporormiella minimoides</i> .	27
5	Estructuras de los compuestos aislados.	48
6	Elucidación estructural del compuesto 51 , fragmentos identificados (A-F) mediante los experimentos HMBC y NOESY.	50
7	Estructura de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1' <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,6' <i>H</i> -espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51).	51
8	Correlaciones HMBC selectas para 51 (a); Correlaciones NOESY para 51 (b).	51
9	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del compuesto 51 .	53
10	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del compuesto 51 .	53
11	Espectro NOESY del compuesto 51 mostrando las principales interacciones.	54
12	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la preusocromona C (52).	55
13	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la preusocromona C (52).	56
14	Correlaciones HMBC selectas (a) y correlaciones NOESY (b) para la preusocromona C (52).	57
15	Espectro NOESY de la preusocromona C mostrando las principales interacciones.	57
16	Curva de inhibición enzimática de la fracción MeCN/MeOH.	59
17	Curva de inhibición enzimática de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1' <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,6' <i>H</i> -espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51).	61
18	Curva de inhibición enzimática de la Preusocromona C (52).	61
19	Curva de inhibición enzimática de la Corimbiferona (44).	62
20	Gráfica de Lineweaver-Burk del compuesto 51 .	63
21	Gráfica de Lineweaver-Burk del compuesto 44 .	64
22	Gráfica de Lineweaver-Burk de la preusocromona C (52).	64
23	Resultados del análisis por Docking, en azul el sitio catalítico donde se une la acarbosa (6) y el isomero 51-S , rojo el sitio alostérico de unión de la corimbiferona (44) y la presusocromona C (52) y en amarillo el sitio alostérico del isomero 51-R .	67
24	Análisis de las interacciones enzima-ligando en 2D y 3D de la acarbosa (6 , A), isomero 51-S (B), isomero 51-R (C), preusocromona C (52 , D) y corimbiferona (44 , E).	68

Lista de cuadros

Cuadro		Página
1	Principales agentes utilizados en la terapia de la diabetes.	9
2	Productos naturales selectos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.	14
3	Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos.	19
4	Metabolitos reportados para la especie <i>S. minimoides</i> .	30

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Plantas hospederas de hongos endófitos que producen taxol (26).	23
2	Plantas hospederas de hongos endófitos que producen podofilotoxina (27).	25
3	Plantas hospederas de hongos endófitos que producen camptotecina (28).	26
4	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1' <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,6' <i>H</i> -espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona en CDCl ₃ (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).	52
5	Datos espectroscópicos de la preusocromona C (52) en CDCl ₃ (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).	58
6	Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa.	60
7	Resultados del ensayo de acoplamiento molecular.	66
8	Principales interacciones entre los metabolitos aislados y la enzima α -glucosidasa.	68

Lista de esquemas

Esquema		Página
1	Preparación del extracto orgánico y fraccionamiento preliminar del cultivo obtenido a partir de la especie fúngica <i>S. minimoides</i> .	40

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
MeCN	Acetonitrilo
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
PDA	Agar papa-dextrosa
H ₂ O	Agua
PDB	Caldo papa-dextrosa
cm	Centímetro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CCF	Cromatografía en capa fina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DC	Dicroísmo circular
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Hz	Hertz

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
L	Litros
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
msnm	Metros sobre nivel del mar
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
μ m	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear protónica
UV	Espectroscopía en el ultravioleta
TMS	Tetrametilsilano

1. RESUMEN

El presente trabajo forma parte de un proyecto enfocado al descubrimiento de inhibidores de la enzima α -glucosidasa a partir de especies fúngicas, potencialmente útiles para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la diabetes. La especie *Sporormiella minimoides* objeto de estudio fue aislada a partir de las hojas de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae), planta medicinal empleada ampliamente para el tratamiento de la diabetes en México.

El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico del medio de cultivo de *S. minimoides* derivó en el aislamiento del compuesto novedoso 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**), el cual fue caracterizado por métodos espectroscópicos y espectrométricos, obtenido como una mezcla racémica. De manera adicional, se aislaron la preusocromona C (**52**), la corimbiferona (**44**) y la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**50**), siendo el primer reporte del metabolito **52** en la especie.

La evaluación del efecto del extracto, fracciones y productos aislados sobre la enzima α -glucosidasa tipo I de *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó mediante un ensayo espectrocolorimétrico, empleando como sustrato para la reacción enzimática el α -D-glucopiranosido 4-nitrofenilo. Los compuestos **51**, **52** y **44** presentaron una actividad inhibitoria significativa frente a la enzima, reflejado en los valores calculados de concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 2.9, 66.5 y 155.5 μ M, respectivamente; en los tres casos, la actividad fue mejor que la del fármaco control, la acarbosa (CI_{50} = 876.9 μ M). De acuerdo a los estudios de cinética enzimática, los productos aislados muestran un comportamiento de inhibición de tipo mixto, con constantes de inhibición (k_i) de 2.78 μ M y α de 0.36 para el compuesto **51**, k_i =52.15 μ M, α =1.746 para la preusocromona C y k_i =163.8 μ M y α =1.624 para la corimbiferona.

Para determinar el probable sitio de interacción de los compuestos con la enzima α -glucosidasa se realizaron estudios teóricos de acoplamiento molecular, los cuales permitieron proponer que el isómero **51-S** se une en el sitio catalítico de la enzima formando enlaces de hidrógeno con Ser-240, His-280 y Gln-353, mientras que el **51-R** se une en un sitio alostérico formando enlaces de hidrógeno con los aminoácidos Lys-373 y Lys-568. Por otra parte, la corimbiferona (**44**) y la preusocromona C (**52**) se podrían unir de manera alostérica, cerca del sitio catalítico.

En síntesis, los compuestos obtenidos de la especie endófito *S. minimoides* representan nuevos prototipos de inhibidores de α -glucosidasas y, por ende, nuevos agentes para el desarrollo de fármacos enfocados al tratamiento de la diabetes tipo 2.

ABSTRACT

This work is part of a project focused on the discovery of new inhibitors of α -glycosidases from fungal species obtained useful for the development of new antidiabetic drugs. The species *Sporormiella minimoides* was isolated from *Hintonia latiflora* leaves, a medicinal plant widely used for the treatment of diabetes in Mexico.

Bioassay-guided fractionation of an organic extract from the culture medium of the fungi resulted in the isolation of the novel compound 5,7'-dihydroxy-2,4',7,9'-tetramethoxy-1'*H*,4*H*,6'*H*-spiro[naphthalene-1,2'-phenalene]-4,6'-dione (**51**), which was characterized by spectroscopic and spectrometric techniques. In addition, preussochromone C (**52**), corymbferone (**44**) and 5-hydroxy-2,7-dimethoxy-8-methylnaphthoquinone (**50**) were isolated, being the first report of **52** in the species.

The effect of the isolated products on α -glycosidase from *Saccharomyces cerevisiae* was performed using a spectrocoulometric assay using as substrate α -D-glucopyranoside 4-nitrophenyl. Compounds **51**, **52** and **44** showed significant inhibitory activity against the enzyme according to the calculated values of half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), which were 2.9, 66.5 and 155.5 μ M, respectively. The products were more active than acarbose ($IC_{50} = 876.9 \mu$ M). According to kinetics studies the products behaved as mixed type inhibitors, with inhibition constant values (k_i) of 2.78 μ M, 52.15 and 163.8 μ M, respectively.

In order to determine the interaction of the isolated metabolites with yeast α -glycosidase, molecular docking studies were performed; the results suggested that the **51-S** isomer bind to the catalytic site of the enzyme forming hydrogen bonds with Ser-240, His-280 and Gln-353, while **51-R** bind in a different location forming hydrogen bonds with Lys-373 and Lys-568. On the other hand, corymbiferone (**44**) and preussochromone C (**52**) could bind in a place close to the catalytic center.

The metabolites from *S. minimoides* represent new leads for the development of novel antidiabetic drugs with α -glucosidase inhibitor properties.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que provoca una serie de trastornos crónico-degenerativos, asociados a un estado de hiperglucemia crónica. Este desorden metabólico es de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria, poligénico y con participación de diversos factores ambientales. La hiperglucemia crónica resulta de un déficit en la producción o acción de la insulina, lo cual afecta directamente el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (NOM-015-SSA2-2010).

Se conocen varios tipos de diabetes, pero los más comunes son la tipo 1 (DM1) y la tipo 2 (DM2). De estas dos, la de menor prevalencia es la DM1, que anteriormente se conocía como diabetes juvenil o insulino dependiente. La DM1 es un desorden autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células beta del páncreas, y en consecuencia la producción de insulina es muy baja o nula; entonces su tratamiento consiste de la administración diaria de esta hormona. Los síntomas característicos de la DM1 son poliuria, polifagia, polidipsia y una disminución importante de peso (OMS-2012, NOM-015-SSA2-2010).

La DM2 es la forma más común y se estima que cerca del 90% de los individuos con diabetes mellitus padecen esta variedad. Los pacientes que padecen DM2 son resistentes a la acción de la insulina y, además en muchos casos producen poca cantidad de la hormona. La falta de sensibilidad a la acción de la insulina principalmente por el tejido adiposo, músculo e hígado origina altos niveles de glucosa en sangre.

La DM2 ha sido considerada como uno de los problemas de salud pública más importantes del Siglo XXI, ya que provoca complicaciones graves como enfermedades cardiovasculares y vasculares periféricas, neuropatía diabética, falla renal y amputaciones, entre otras, lo que resulta en aumento de la discapacidad y la reducción de la esperanza de vida de los pacientes (Scully *et al.*, 2012). Tan solo en México se estima que el número de personas con DM2 es cercano a los 8.2 millones de personas y se espera que para el año 2035 la prevalencia de la enfermedad sea de 15.7 millones de personas. De acuerdo con la International Diabetes Federation (IDF) hasta el año 2014 cerca de 387 millones de personas padecen diabetes a nivel mundial y se estima que esta cifra llegue a superar los 592 millones de personas en menos de 25 años (Guariguata *et al.*, 2014).

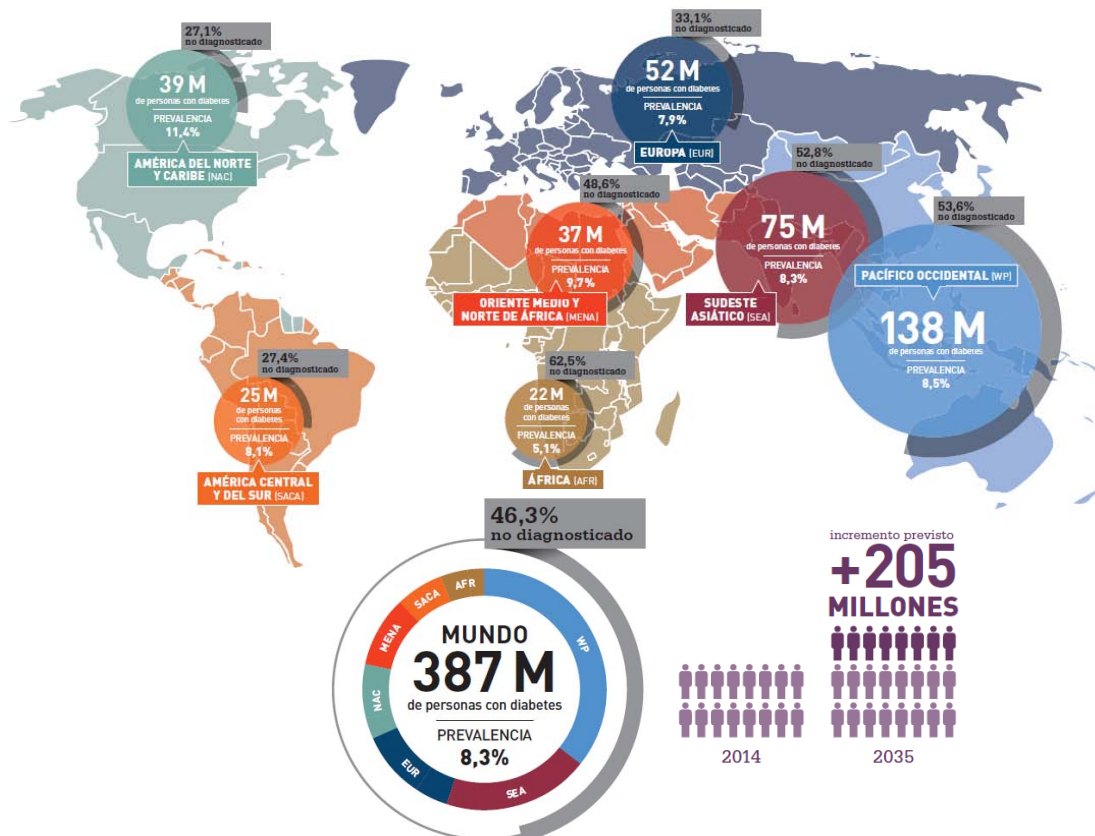


Figura 1. Número de personas con DM2 por región (IDF Atlas, 6 ed. 2014).

2.2. Tratamiento de la diabetes mellitus

Los tratamientos empleados para controlar este desorden están encaminados a disminuir los niveles de glucosa en sangre y mantenerlos dentro de los parámetros normales, así como también mantener el control metabólico, aliviar los síntomas, prevenir complicaciones agudas o crónicas (desórdenes microvasculares y/o neuropáticos), mejorar la calidad de vida y disminuir la tasa de mortalidad a causa de este padecimiento (Israili *et al.*, 2011; NOM-015-SSA2-2010).

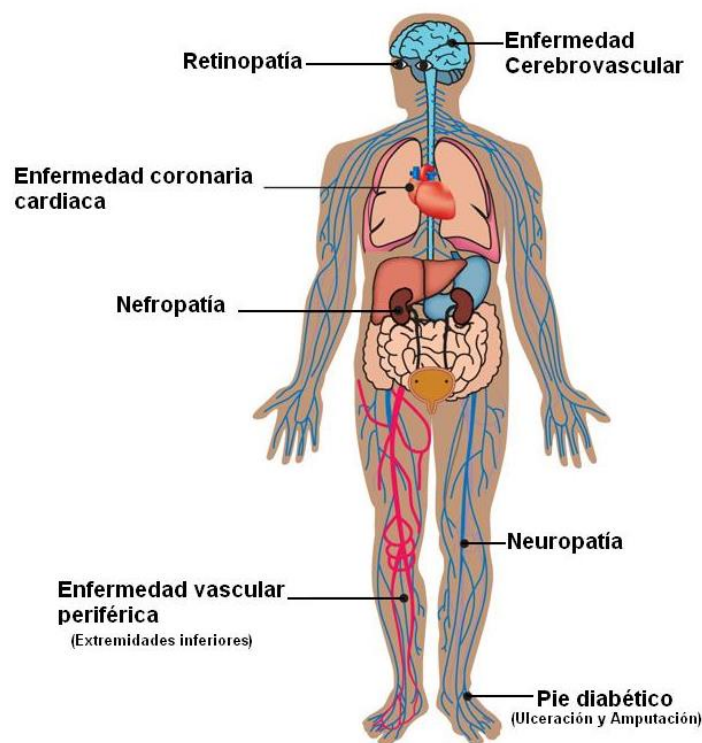


Figura 2. Principales complicaciones de la diabetes.

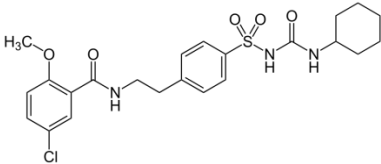
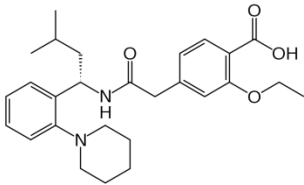
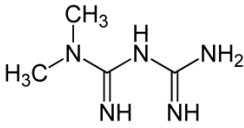
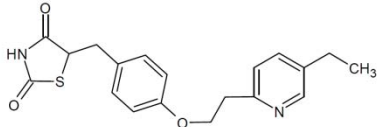
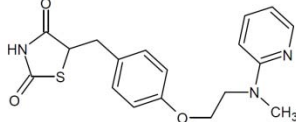
Existen diversas terapias farmacológicas que combinadas con el control del peso corporal y actividad física regular, aportan resultados eficaces en el control de la DM2. Las terapias utilizadas actualmente para el control de la hiperglucemia se pueden clasificar en tres grandes grupos principales según la acción fisiológica que ejercen para controlar la hiperglucemia (Israili *et al.*, 2011):

1. **Fármacos que aumentan los niveles de insulina en sangre.** Son agentes orales que promuevan la secreción de insulina; se llaman comúnmente secretagogos (Ej. Las sulfonilureas). Alternativamente se puede administrar insulina.
2. **Fármacos sensibilizadores de la insulina.** Estos aumentan la sensibilidad a la insulina en sus órganos blanco (Ej. biguanidas y tiazolidinedionas), es decir favorecen la acción de la insulina en músculo, tejido adiposo e hígado.
3. **Fármacos inhibidores de α -glucosidasas.** Estos disminuyen la absorción intestinal de carbohidratos mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas (Ej. acarbosa). Este tipo de fármacos son de particular interés para el presente trabajo y posteriormente se discutirá con mayor detalle.

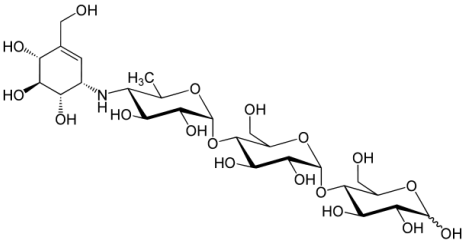
Los mecanismos y sitios de acción de los principales agentes terapéuticos usados actualmente para el tratamiento clínico de la diabetes se resumen en el **Cuadro 1**. Frecuentemente, estos fármacos son empleados en combinación con la finalidad de mejorar la eficacia de los tratamientos debido a la sinergia entre ellos; la metformina es el fármaco de administración oral de mayor importancia para el tratamiento inicial de la diabetes mellitus de tipo 2 (Nathan *et al.*, 2007).

A pesar de la gran variedad de terapias existentes, la comunidad farmacéutica continúa buscando nuevos agentes que permitan tener un mejor control de la hiperglucemia y sus complicaciones crónicas, con la finalidad de mejorar la calidad de vida y disminuir las tasas de mortalidad a razón de este padecimiento.

Cuadro 1. Principales agentes utilizados en la terapia de la diabetes (Jara *et al.*, 2011).

Tipo de Agente	Ejemplo	Sitio de acción	Mecanismo de acción
Sulfonilureas	<p style="text-align: center;">glibenclamida (1)</p> 	Páncreas	Aumentan la secreción de insulina endógena por el páncreas
Meglitinidas	<p style="text-align: center;">repaglinida (2)</p> 	Páncreas	Aumentan la secreción de insulina y aportan un mejor control de la glucemia
Biguanidas	<p style="text-align: center;">metformina (3)</p> 	Hígado	Aumentan la sensibilidad a la insulina e inhiben la gluconéogenesis
Tiazolidinedionas	<p style="text-align: center;">pioglitazona (4)</p>  <p style="text-align: center;">rosiglitazona (5)</p> 	Músculo	Aumentan la sensibilidad a la insulina y mejoran el aprovechamiento de glucosa en sangre

Cuadro 1. Principales agentes utilizados en la terapia de la diabetes (Jara *et al.*, 2011) (continuación).

Tipo de Agente	Ejemplo	Sitio de acción	Mecanismo de acción
Inhibidores de α -glucosidasas	<p style="text-align: center;">acarbosea (6)</p> 	Intestino	Evitan o disminuye la absorción de glucosa en el intestino delgado
Análogos de las incretinas	<p style="text-align: center;">exenatida (agonista del receptor GLP-1) (7)</p> <p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p>	Intestino y páncreas	Controlan la liberación de insulina y glucagón por el páncreas en respuesta a los alimentos

2.3. Inhibidores de la enzima α -glucosidasa utilizados en el tratamiento de la diabetes

Las glucosidasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de carbohidratos complejos como oligosacáridos y polisacáridos a glucosa y sus respectivos carbohidratos (Chiba, 1997). Este tipo de enzimas también puede romper enlaces O-, N- y S-glicosídicos. En esta familia hay enzimas que pueden hidrolizar enlaces α y β y son del tipo glucotransferasas, manosidasas, y galactosidasas, entre otras (Borges de Melo *et al.*, 2006).

Las α -glucosidasas se encuentran en la luz del intestino delgado sobre la membrana de los enterocitos (**Figura 3**), lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos. Estas enzimas hidrolizan oligosacáridos que poseen α -D-glucosa terminal no reductora con enlaces (1→4)-glicosídicos y liberan α -D-glucosa, y con menor afinidad también hidrolizan polisacáridos con enlaces (1→6)-glicosídicos (Borges de Melo *et al.*, 2006).

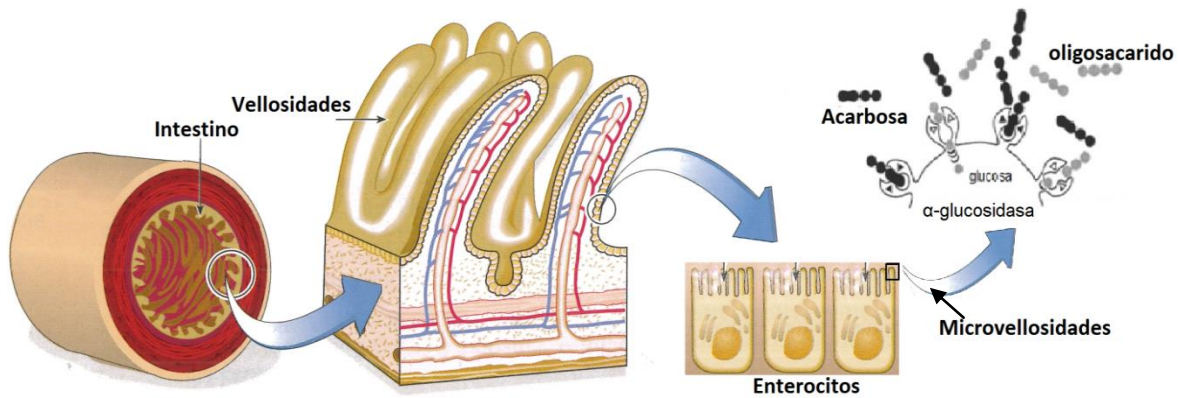
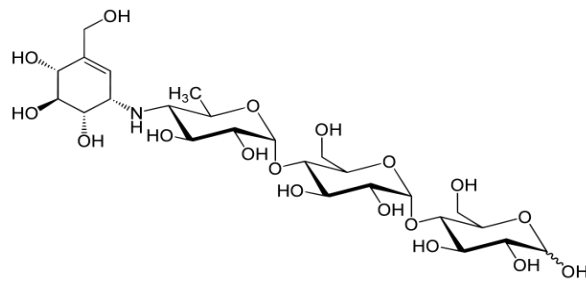


Figura 3. Ubicación de las enzimas α -glucosidasas.

Las enzimas α -glucosidasas 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 se encuentran en bacterias, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) o insectos y se caracterizan por mostrar una mayor actividad hacia sustratos heterogéneos como la sacarosa y el *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) y muy poca actividad hacia los oligosacáridos de maltosa y almidón, lo que implica que estas enzimas reconocen a la estructura de la glucosa presente en sus sustratos. Las de tipo II se encuentran en organismos fúngicos e hidrolizan con mayor facilidad sustratos homogéneos y poliméricos que sustratos heterogéneos. Las de tipo III se encuentran con mayor frecuencia en plantas y animales, estas muestran una elevada actividad contra sustratos homogéneos y poliméricos como la maltosa o los α -glucanos, incluyendo al almidón soluble y glucógeno, y casi no muestran actividad frente a sustratos heterogéneos (Nakai, 2005). Finalmente, las enzimas de tipo IV se aíslan a partir de bacterias y muestran mayor especificidad por sustratos homogéneos tales como maltosa. La liberación de α -D-glucosa en el intestino delgado es de vital importancia para continuar con el metabolismo de los carbohidratos. La actividad de estas enzimas intestinales es muy importante para diversos procesos bioquímicos, tales como el metabolismo lisosomal de glicoconjugados, el procesamiento de glicoproteínas, así como también la biosíntesis de glicolípidos y glicoproteínas (Moorthy *et. al.*, 2012).

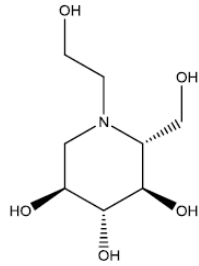
Los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas son ampliamente utilizados como tratamiento inicial de pacientes con DM2, o con una condición prediabética, debido a que inhiben de forma competitiva y reversible a una serie de enzimas α -glucosidasas intestinales retrasando y, en parte, impidiendo la absorción de los hidratos de carbono en el intestino. En consecuencia, su acción principal consiste en disminuir la hiperglucemia posprandial (Campbell *et al.*, 1996).

Los inhibidores de las enzimas α -glucosidasa mejor conocidos son la acarbosa (**6**), el miglitol (**7**) y la voglibosa (**10**). La acarbosa (**6**) se obtuvo inicialmente de *Actinoplanes* cepa SE 50. La administración de este fármaco reduce la glucemia posprandial e incrementa la secreción de insulina, fue introducido comercialmente con el nombre de Precose[®] (Asano *et al.*, 2003).

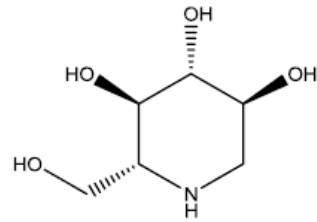


acarbosa (**6**)

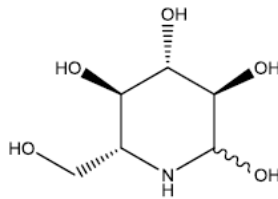
El miglitol (**7**) es el análogo *N*-hidroxietilado de la 1-desoxinojirimicina (**8**), la cual es un análogo de la nojirimicina (**9**) un compuesto producido por *Streptomyces roseochromogenes* cepa R-468, *S. lavendulae* cepa SF-425 y algunas especies vegetales. El miglitol entró al mercado con el nombre de Glycet[®] y a diferencia de la acarbosa se absorbe en mayor cantidad, lo que ofrece efectos a nivel sistémico además de los efectos a nivel del intestino delgado. El fármaco puede utilizarse solo o en combinación con sulfonilureas, biguanidas o insulina (Asano *et al.*, 2003; Israili *et al.*, 2011).



miglitol (7)

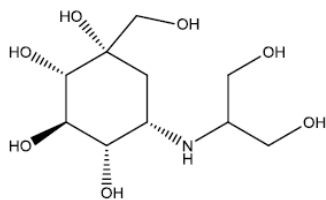


1-desoxinojirimicina (8)

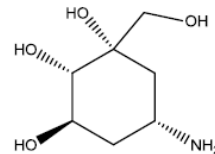


nojirimicina (9)

La voglibosa (10) también es un derivado de un compuesto de origen natural conocido como valiolumina (11). Después de demostrar su eficacia como agente oral antidiabético fue incorporado al mercado con el nombre de Basen[®] (Asano *et al.*, 2003).



voglibosa (10)



valiolumina (11)

Los productos descritos en el párrafo anterior presentan efectos adversos tales como: flatulencias, meteorismo y distensión abdominal, lo que ha propiciado una búsqueda continua de nuevos inhibidores de α -glucosidasas.

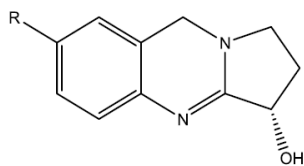
De acuerdo a estudios de relación estructura actividad los inhibidores de estas enzimas tienen características comunes como son: presentar estructuras similares a la de los azúcares y la capacidad de formar enlaces iónicos con catalizadores de carácter nucleofílico y/o enlaces de hidrógeno con catalizadores ácidos, y/o interacciones iónicas e hidrofóbicas, y/o enlaces covalentes (Moorthy *et al.*, 2012).

2.4. Inhibidores selectos de la enzima α -glucosidasa obtenidos a partir de fuentes naturales

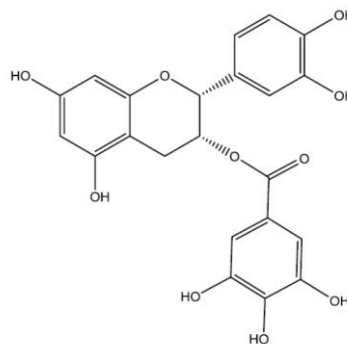
Los estudios farmacológicos de diversas plantas medicinales con propiedades antidiabéticas y otras fuentes naturales alternativas, han conducido al descubrimiento de una gran variedad de moléculas activas como inhibidores de α -glucosidasas. El descubrimiento de estos compuestos ha sido de vital importancia, ya que algunos de ellos han servido como precursores para la obtención de fármacos muy efectivos usados en la terapéutica actual, por lo que la investigación farmacológica de compuestos naturales es muy importante porque puede conducir al descubrimiento de fármacos más efectivos. Los compuestos activos encontrados son de naturaleza química muy variada, entre ellos destacan flavonoides, alcaloides, triterpenoides, antocianidinas, compuestos glicosídicos y compuestos fenólicos, entre otros (Benalla *et al.*, 2010).

En el **Cuadro 2**, se muestran los ejemplos más importantes (Borges de Melo *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2009 y Mata *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Productos naturales selectos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

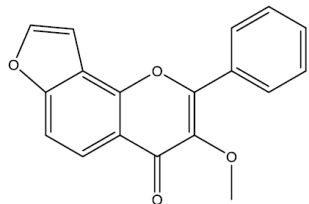


vacisina (**12**): R=H; Cl_{50} = 125 μ M
 vacisicinol (**13**): R=OH; Cl_{50} = 250 μ M
Adhatoda vasica (Acanthaceae)

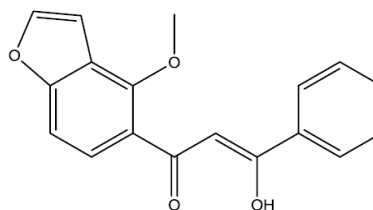


(-)-3-O-galoilepicatequina (**14**);
 Cl_{50} = 560 μ M
Bergenia ciliate (Saxifragaceae)

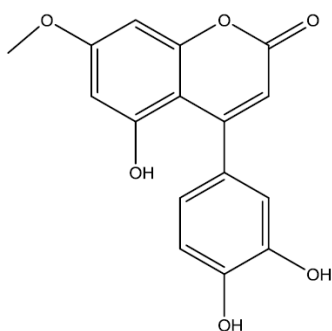
Cuadro 2. Productos naturales selectos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas
(continuación).



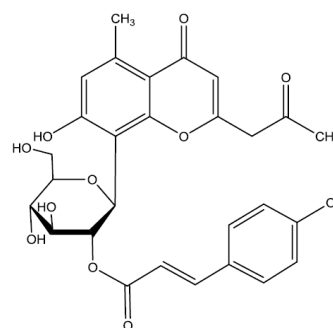
kiranjina (**15**); CI_{50} = 26.3 μ M
Derris indica (Fabaceae)



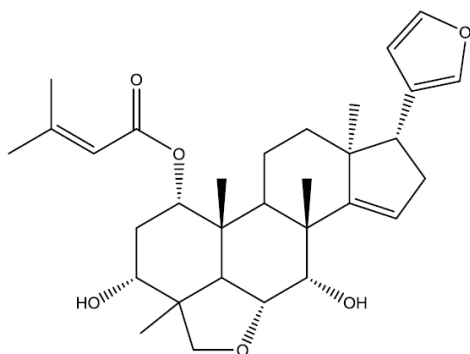
pongamol (**16**); CI_{50} = 58.2 μ M
Derris indica (Fabaceae)



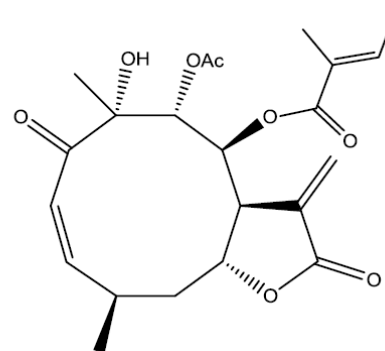
3',4',5-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina
(**17**); CI_{50} = 62 μ M
Hintonia latiflora (Rubiaceae)



aloesina A (**18**); CI_{50} = 11.9 μ M
Chinese aloe (Asphodelaceae)

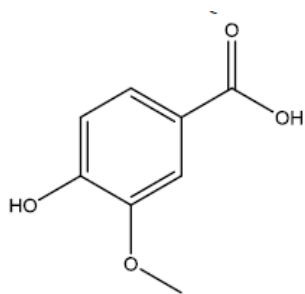


meliacinolina (**19**); CI_{50} = 2.35 μ M
Azadirachta indica (Meliaceae)

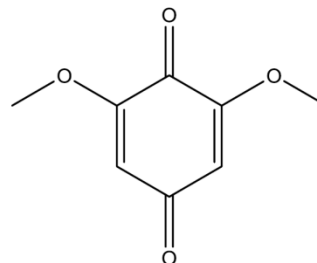


caleína C (**20**); CI_{50} = 0.28 μ M
Brickellia cavanillesii (Asteraceae)

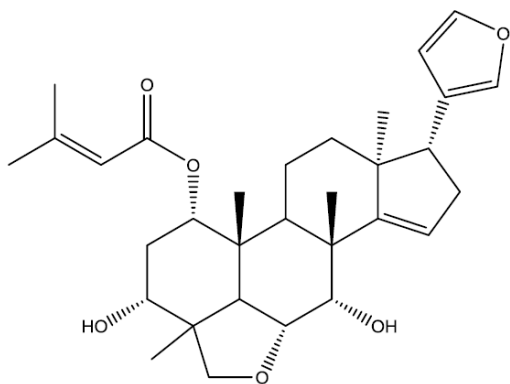
Cuadro 2. Productos naturales selectos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas
(continuación).



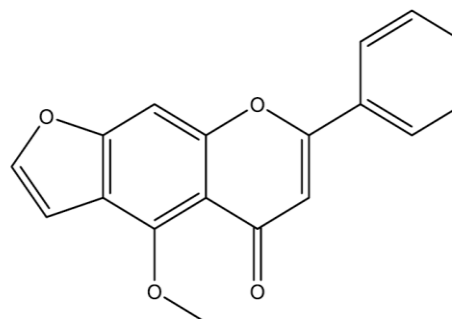
ácido vainíllinico (**21**); CI_{50} = 69.4 μ M
Fagara tessmenii (Rutaceae)



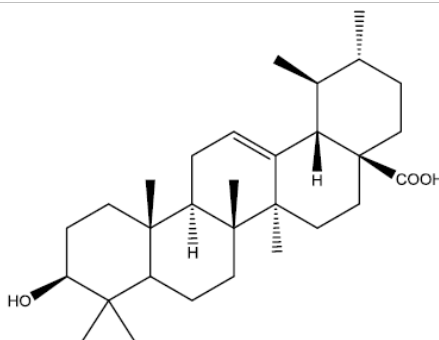
2,4-dimetoxi-1,4-benzoquinona (**22**)
 CI_{50} =900 μ M
Fagara tessmenii (Rutaceae)



meliacinolina (**23**); CI_{50} = 2.35 μ M
Azadirachta indica (Meliceae)



pinnatina (**24**) CI_{50} =56.5 μ M
Derris indica (Fabaceae)



ácido ursólico (**25**); CI_{50} = 12.5 μ M
Luculia pinceana (Rutaceae)

2.5. Hongos endófitos como fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos

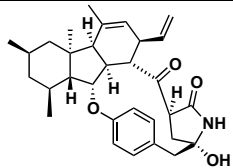
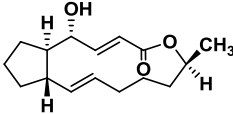
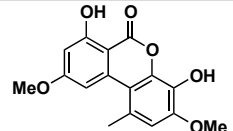
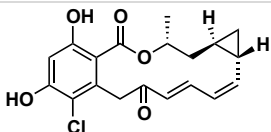
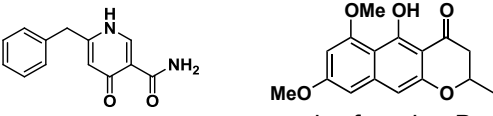
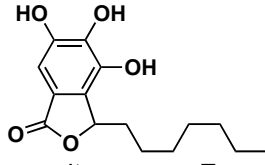
Debido a los avances en las técnicas para el aislamiento y caracterización de nuevos metabolitos secundarios, el número de compuestos descubiertos se ha incrementado de manera exponencial durante el siglo XXI cifra que se aproxima al millón. De éstos, se estima que el 16% son de origen animal, alrededor del 29% son de origen vegetal, y un 55% se obtienen a partir de microorganismos. Cabe destacar que del total de productos naturales reportados en la literatura, alrededor del 25% muestran alguna actividad biológica, de los cuales el 17% se han aislado de bacterias (*Bacillus* y *Pseudomonas* las más frecuentes), 45% de actinomicetos y 38% de hongos (Bérdy *et al.*, 2005). Entonces, desde el descubrimiento de la penicilina a mediados del siglo XX, los microorganismos siguen representando una fuente invaluable de metabolitos biodinámicos, estructuralmente diversos y han contribuido al descubrimiento de una gran variedad de agentes antibióticos, inmunosupresores (ciclosporina y rapamicina), hipocolesterolemiantes (lovastatina, mevastatina), antiparasitarios (ivermectina), antidiabéticos (acarbose) y anticancerígenos (pentostatina y epirubicina) entre otros (Newman *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2005; Sneader *et al.*, 2005).

Recientemente, los hongos endófitos han cobrado un gran interés como fuente de principios biodinámicos con potencial en las industrias agrícola, farmacéutica y alimenticia. Estos microorganismos, estrechamente relacionados con la planta hospedera de manera simbiótica, crecen entre los espacios intercelulares de los tejidos de una planta cuyas infecciones son discretas y asintomáticas (Stone *et al.*, 2000). Así, la planta suministra nutrientes y espacio físico necesarios para la supervivencia de los endófitos, en tanto que algunos de éstos producen una serie de metabolitos secundarios bioactivos, distintos o similares a los de las plantas hospederas para ayudar a éstas a resistir las tensiones bióticas y abióticas (Tan y Zou *et al.*, 2001; Strobel y Daisy, 2003).

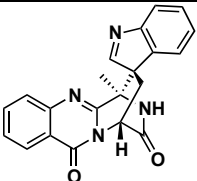

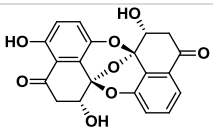
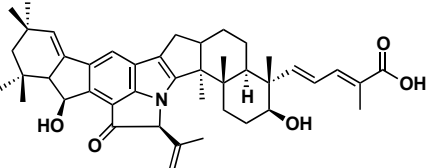
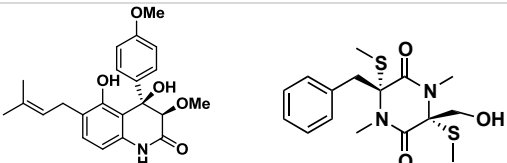
Existen alrededor de 300 000 especies de plantas terrestres en el planeta, lo cual nos da la posibilidad de encontrar un número significativo de microorganismos endófitos en las mismas (Petrini *et al.*, 1991).

Los metabolitos activos aislados a la fecha de los hongos endófitos son farmacológicamente y estructuralmente diversos. De tal forma que se han encontrado compuestos con propiedades antimicrobiana, citotóxica, e inhibitoria de enzimas implicadas en procesos patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer, algunos tipos de cáncer y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre otros (Strobel *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Selim *et al.*, 2012). Asimismo muchos otros productos biosintetizados por estos hongos presentan actividades insecticidas y herbicidas notables (Wang *et al.*, 2002; Hensens *et al.*, 1999). En el **Cuadro 3** se muestran ejemplos selectos de metabolitos biodinámicos producidos por hongos endófitos.

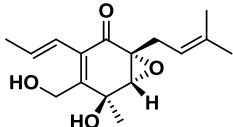
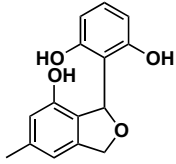
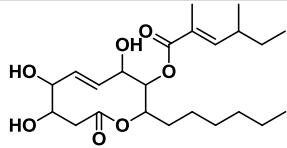
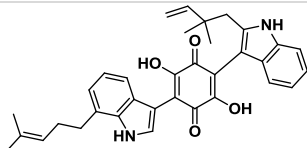
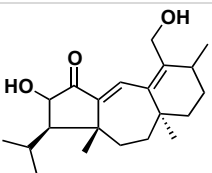
Cuadro 3. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos.

Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 pirrocidina A	Antibacteriano Antifúngico	<i>Acremonium zeae</i> (NRRL 13540)	<i>Zea mays</i> (Poaceae)	Wicklow <i>et al.</i> , 2002
 brefeldina A	Antifúngico Antiviral Citotóxico Herbicida	<i>Aspergillus clavatus</i> (H-037)	<i>Taxus mairei</i> <i>Torreya grandis</i> (Taxaceae)	Wang <i>et al.</i> , 2002
 grafislactona A	Antioxidante	<i>Cephalosporium</i> sp. (IFB-E001)	<i>Trachelospermum</i> <i>Jasminoides</i> (Apocynaceae)	Song <i>et al.</i> , 2005
 radicol	Citotóxico Inhibidor de Hsp90	<i>Chaetomium chiversii</i>	<i>Ephedra fasciculata</i> A. Nels (Ephedraceae)	Turbyville <i>et al.</i> , 2006
 aspernigrina A rubrofusarina B	Citotóxico Inhibidor de xantina oxidasa	<i>Cladosporium herbarum</i> (IFB-E002)	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae)	Ye <i>et al.</i> , 2005 Hiort <i>et al.</i> , 2004
 citosporona E	Antibacteriano	<i>Cytospora</i> sp. (CR 200)	<i>Conocarpus erecta</i> L. (Combretaceae)	Brady <i>et al.</i> , 2000

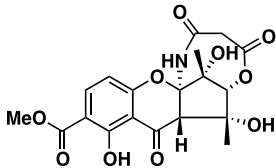
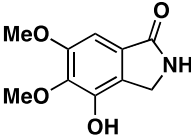
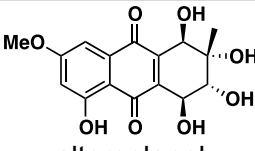
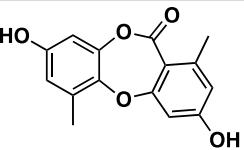
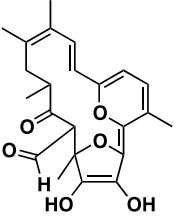
Cuadro 3. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos (continuación).

Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 alantripinona	Citotóxico	<i>Eupenicillium</i> sp.	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack (Rutaceae)	Barros y Rodríguez-Filho, 2005
 enalin ulocladol	Inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE)	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	<i>Pilgerodendron uviferum</i> (Cupressaceae)	Hormazahal <i>et al.</i> , 2005
 preussomerina L	Antibacteriano Antifúngico	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Atropa belladonna</i> L. (Solanaceae)	Krohn <i>et al.</i> , 2001
 ácido nodulisporico A	Insecticida	<i>Nodulisporium</i> sp MF 5954	<i>Bontia daphnoides</i> L. (Scrophulariaceae)	Hensens <i>et al.</i> , 1999
 peniprequinolona gliovictina	Nematicida Acelerador del crecimiento radicular Citotóxico	<i>Penicillium janczewskii</i>	<i>Prumnopitys andina</i> (Endl.) Laubenf. (Podocarpaceae)	Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 2005 He <i>et al.</i> , 2005

Cuadro 3. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos (continuación).

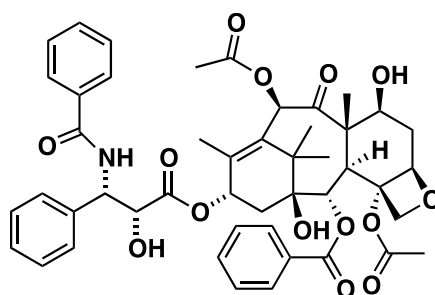
Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 jesterona	Antifúngico Antimicótico	<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	<i>Fragraea bodenii</i> Thunb. (Gentianaceae)	Li y Strobel, 2001
 pestacina	Antimicótico Antioxidante	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i> L. (Combretaceae)	Harper <i>et al.</i> , 2003
 fomol	Antibacteriano Antifúngico Antiinflamatorio Citotóxico	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Erythrina crista-galli</i> L. (Fabaceae)	Weber <i>et al.</i> , 2004
 demetilasterriquinona B1	Activador de receptores de insulina	<i>Pseudomassaria</i> sp.	No identificada	Salituro <i>et al.</i> , 2001
 guanacastepeno B	Antibacteriano	No identificado (CR115)	<i>Daphnopsis americana</i> (Miller) J. S. Johnson (Thymelaeaceae)	Brady <i>et al.</i> , 2000

Cuadro 3. Metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos (continuación).

Compuesto	Actividad Biológica	Endófito (cepa)	Planta Hospedera	Referencia
 criptosporioptido	Inhibidor de lipooxigenasas	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	<i>Zanthoxylum leprieurii</i>	Saleem <i>et al.</i> , 2013
 emerimidina A	Antiviral (H1N1)	<i>Emericella</i> sp. (HK-ZJ)	<i>Aegiceras corniculatum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
 altersolanol	Angiogénico	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Erythrina variegata</i>	Pompenga <i>et al.</i> , 2013
 corinesidona A	Inhibidor de la actividad aromatasa	<i>Corynespora cassiicola</i> (L36)	<i>Lindenbergia Philippensis</i> (Scrophulariaceae)	Chomcheon <i>et al.</i> , 2009
 chaetoglobosina X	Citotóxico	<i>Chaetomium globosum</i> (L18)	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen & C. Ling	Wang <i>et al.</i> , 2012

Como se indicó anteriormente, algunos endófitos biosintetizan los mismos metabolitos que la planta hospedera. Entre los metabolitos producidos por el endófito y la planta destacan por su importancia en la terapéutica, el taxol (**26**), la podofilotoxina (**27**), la camptotecina (**28**), la vinblastina (**29**) y la vincristina (**30**).

El taxol (**26**) es un diterpenoide que fue aislado por primera vez de la especie *Taxus brevifolia* (Taxaceae) en 1971. Este compuesto antimitótico muestra acción eficaz contra varios tipos de cáncer, incluyendo de próstata, ovario, mama y pulmón. Este compuesto es biosintetizado por varias especies *Taxus* que contienen endófitos que también sintetizan este importante diterpenoide (**Tabla 1**). Cabe destacar que endófitos asociados a otras plantas también producen taxol. (**Tabla 1**).



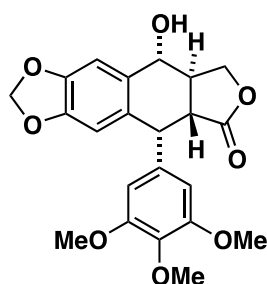
taxol (**26**)

Tabla 1. Plantas hospederas de hongos endófitos que producen taxol (**26**).

Endófito	Planta Hospedera	Referencia
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>Taxi</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1996
<i>Fusarium arthrosporioides</i>	<i>Taxus cuspidata</i>	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	Tian <i>et al.</i> , 2006
<i>Ectostroma sp.</i>		Hu <i>et al.</i> , 2006
<i>Botrytis sp.</i>		Guo <i>et al.</i> , 2006
<i>Fusarium mairei</i>		Cheng <i>et al.</i> , 2007
<i>Ozonium sp.</i>		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Podocarpus sp.</i>	Sun <i>et al.</i> , 2008
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Taxus baccata</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1996
<i>Fusarium lateritium</i>		Venkatachalam <i>et al.</i> , 2008
<i>Monochaetia sp.</i>		
<i>Pestalotia bicilia</i>		

Tabla 1. Plantas hospederas de hongos endófitos que producen taxol (26) (continuación).

Endófito	Planta Hospedera	Referencia
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Taxus media</i>	Zhang et al., 2009
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>	Chakravarthi et al., 2008
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Taxus chinensis</i>	Liu et al., 2009
<i>Mucor rouxianus</i>		Miao et al., 2009
<i>Periconia sp.</i>	<i>Torreya grandifolia</i>	Li et al., 1998
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	Strobel et al., 1997
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallachiana</i>	Strobel et al., 1996
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	Gangadevi et al., 2008
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Terminalia arjuna</i>	Gangadevi et al., 2009
<i>Phyllosticta dioscoreae</i>	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Kumaran et al., 2009
<i>Phyllosticta spinarum</i>	<i>Cupressus sp.</i>	Kumaran et al., 2008
<i>Pithomyces sp.</i>	<i>Taxus sumatrana</i>	Strobel et al., 1996
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Stierle et al., 1993



podofilotoxina (27)

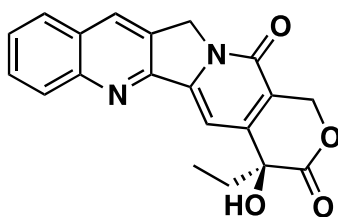
La podofilotoxina (27) es un lignano del tipo ariltetralina aislado de vegetales de los géneros *Diphyllia* (Berberidaceae), *Dysosma* (Berberidaceae), *Sabina* (*Juniperus*) [Cupressaceae] y *Sinopodophyllum* (*Podophyllum*) [Berberidaceae]. Este lignano tiene propiedades antivirales, anticancerígenas, antioxidantes, antibacterianas, inmunoestimulantes y antirreumáticas.

De manera adicional, la podofilotoxina es un precursor para la síntesis de fármacos anticancerígenos de suma importancia como el etopósido y el tenipósido. Recientemente, varios investigadores reportaron el aislamiento del lignano a partir de varios hongos endófitos, todos obtenidos de los vegetales productores del lignano (**Tabla 2**).

Tabla 2. Plantas hospederas de hongos endófitos que producen podofilotoxina (**27**)

Hongo Endófito (Cepa)	Planta Hospedera	Referencia
<i>Alternaria sp.</i> (-/SC13)	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> <i>Sabina vulgaris</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003 Lu <i>et al.</i> , 2006
<i>Alternaria neesex</i> (Ty) <i>Trametes hirsuta</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Puri <i>et al.</i> , 2006 Cao <i>et al.</i> , 2007
<i>Fusarium oxysporum</i> (JRE1)	<i>Sabina recurva</i>	Kour <i>et al.</i> , 2008
<i>Monilia sp.</i>	<i>Dysosma veitchii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003
<i>Penicillium sp.</i> <i>Penicillium implicatum</i> (-/2BNO1)	<i>Diphylleia sinensis</i> <i>Dysosma veitchii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2003 Zeng <i>et al.</i> , 2004 Guo <i>et al.</i> , 2004
<i>Phialocephala fortinii</i> (PPE5/ PPE7)	<i>Sinopodophyllum peltatum</i>	Eyberger <i>et al.</i> , 2006

La camptotecina (**28**) es un alcaloide indol-monoterpenoide aislado por primera vez de la corteza de *Camptotheca acuminata* (Cornaceae) en 1966. La camptotecina y su análogo 10-hidroxicamptotecina son agentes antineoplásicos inhibidores de la topoisomerasa I, enzima necesaria para la replicación y transcripción del DNA. Estos productos además son los precursores del irinotecan, topotecan y productos similares de amplio uso en la quimioterapia del cáncer.



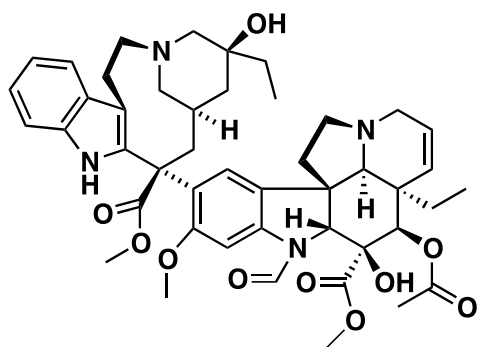
camptotecina (**28**)

En 2005, Puri y colaboradores reportaron un hongo endófito aislado de *Nothapodytes foetida* (Icacinaceae), identificado como *Entrophospora infrequens*, el cual tiene la habilidad de producir a la camptotecina. Posteriormente, se describieron varias especies endófitas que biosintetizan este metabolito (**Tabla 3**).

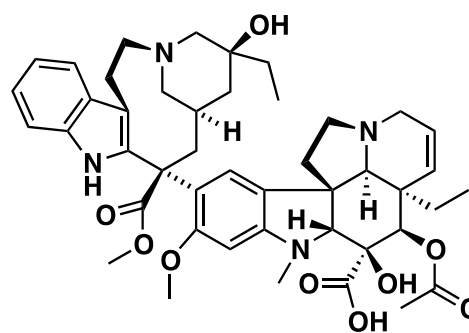
Tabla 3. Plantas hospederas de hongos endófitos que producen camptotecina (**28**)

Hongo endófito	Planta Hospedera	Referencia
<i>Entrophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	Puri <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium solani</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Kusari <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i>	Shweta <i>et al.</i> , 2010
<i>Neurospora sp.</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	Rehman <i>et al.</i> , 2008
No identificado	<i>Camptotheca acuminata</i>	Min y Wang, 2009

La vincristina (**29**) y la vinblastina (**30**) son alcaloides indólicos empleados como anticancerígenos y fueron aislados de la especie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). El mecanismo de acción primario de estos alcaloides es a través de la interferencia con la formación de los microtúbulos y la dinámica del huso mitótico. También interrumpen el transporte intracelular y disminuyen el flujo sanguíneo hacia el tumor, posiblemente debido a un efecto antiangiogénesis.



vincristina (**29**)



vinblastina (**30**)

En 1998 Guo y colaboradores reportaron el aislamiento de una especie endófitra del género *Alternaria* sp. a partir de una especie de apocinácea con la maquinaria biosintética para producir vinblastina. Por otro lado, Zhang y colaboradores en 2004 aislaron una cepa de *Fusarium oxysporum* a partir del polen de *C. roseus* también con la capacidad de biosintetizar vincristina.

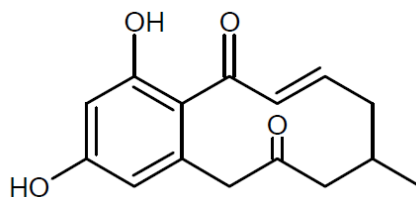
2.6. Antecedentes del género *Sporormiella*

Sporormiella es un género con aproximadamente 80 especies distribuidas en diferentes regiones del mundo. Algunas especies de este género son saprófitas, mientras otras son endófitas de hongos o plantas (Mudur *et al.*, 2006; Liang-Dong *et al.*, 2008). Los estudios químicos realizados de algunas especies han permitido el aislamiento de varios metabolitos secundarios, con una amplia variedad de estructuras químicas y actividades biológicas.



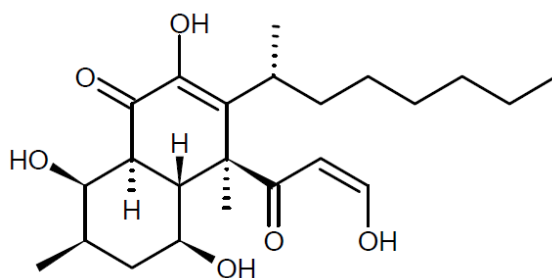
Figura 4. *Sporormiella minimoides*.

De *Sporormiella* sp. M5032 (FERM P-9506), un hongo aislado del excremento de oveja, se obtuvo el inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, esporostatina (**31**) (Kinoshita *et al.*, 1997).

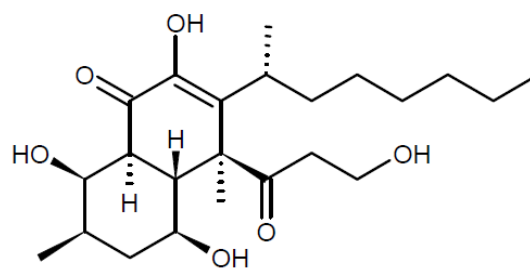


esporostatina (**31**)

De *S. australis* (Spegazzini) Ahmed & Cain, una especie aislada del excremento de alce recolectado en el Condado de Cook, Estado de Minnesota, EUA, se aislaron los policétidos australifungina (**32**) y el australifunginol (**33**). La australifungina mostró una actividad antifúngica de amplio espectro contra patógenos en humanos. Este compuesto inhibe también la ceramida sintasa, enzima involucrada en la síntesis de esfingolípidos en plantas (Mandala *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 1997).

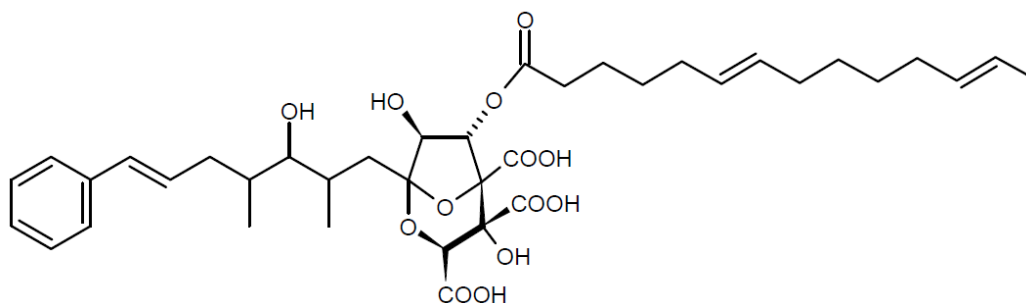


australifungina (**32**)

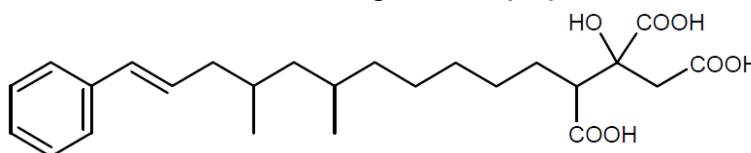


australifunginol (**33**)

S. intermedia (Auersw.) S. I. Ahmed & Cain ex Kobayasi, especie coprófila aislada del excremento de conejo en Tucson, Arizona, EUA, biosintetiza ácido zaragócico B (**34**) y el citrato de alquilo L-731,128 (**35**). Ambos compuestos inhiben la escualeno sintasa, enzima involucrada en la síntesis de colesterol, y poseen propiedades antifúngicas (Bergstrom *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1995).

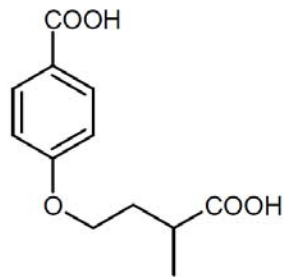


ácido zaragócico B (**34**)

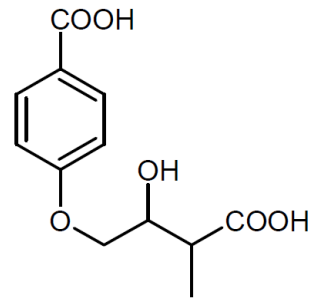


citrato de alquilo L-731,128 (**35**)

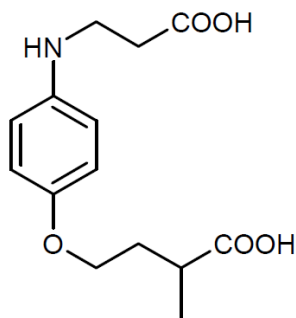
S. vexans (Auerswald) Ahmed & Cain (JS 306), otra especie coprófila aislada del excremento del puercoespín en New Brunswick, Canadá, contiene esporovexinas A-C (**36-38**), derivadas del ácido 4-hidroxibenzoico, y 3'-O-desmetil-1-epipreusomerina C (**39**) (Soman *et al.*, 1999). Tanto la esporovexina A como la 3'-O-desmetil-1-epipreusomerina C demostraron actividades antifúngica y antibacteriana.



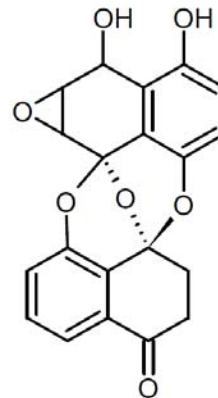
esporovexina A (**36**)



esporovexina B (**37**)



esporovexina C (**38**)



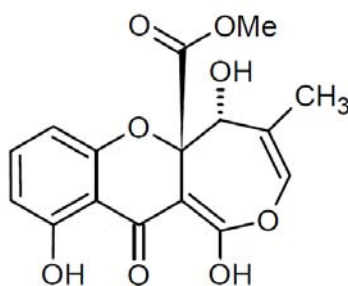
3'-O-desmetil-1-epipreusomerina C (**39**)

2.7. Antecedentes de las especie endófito *Sporormiella minimoides* (Pleosporales)

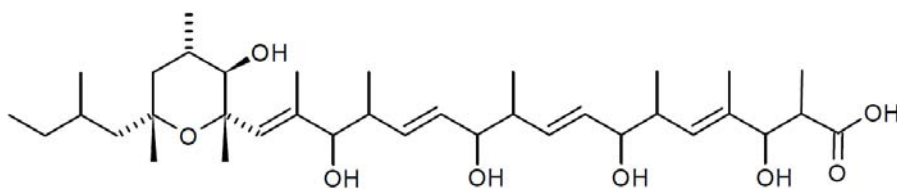
S. minimoides S. I. Ahmed & Cain, es un hongo saprófito ampliamente distribuido; se ha aislado del excremento de jirafa en la región de Namutoni, Namibia; de los tejidos de *Pinus tabuliformis*, un pino nativo del Norte de China; y de los basidiomas de *Trametes hirsutum*, recolectado de una rama de madera en un bosque subalpino seco en Hawaii (Clapp-Shapiro *et al.*, 1998; Bugni *et al.*, 2002; Yu y Liang-Dong, 2004).

La especie *S. minimoides* ha sido objeto de estudios químicos previos, estos análisis condujeron a la caracterización de varios policétidos incluyendo el brocaenol A (**40**) (Bugni *et al.*, 2002), la esporminarina A (**41**), esporminarina B (**42**) (Mudur *et al.*, 2006) y el depsipéptido **43** (Clapp-Shapiro *et al.*, 1998). Estos tres últimos productos son antifúngicos, mientras que el brocaenol A es un agente citotóxico (Mudur *et al.*, 2006). Más recientemente, se reportó la obtención de la corimbiferona (**44**), la corimbiferona C (**45**), la corimbiferan lactona E (**46**), la corimbiferan lactona D (**47**), el brocaenol B (**48**), la ziganeina (**49**) y la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**50**) de un aislamiento de las hojas de la planta medicinal *Hintonia latiflora* (Leyte-Lugo *et al.*, 2013). Las estructuras de los metabolitos obtenidos de la especie se indican en el **Cuadro 4**.

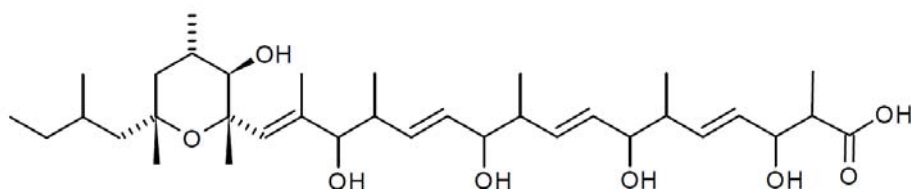
Cuadro 4. Metabolitos reportados para la especie *S. minimoides*.



brocaenol A (**40**)

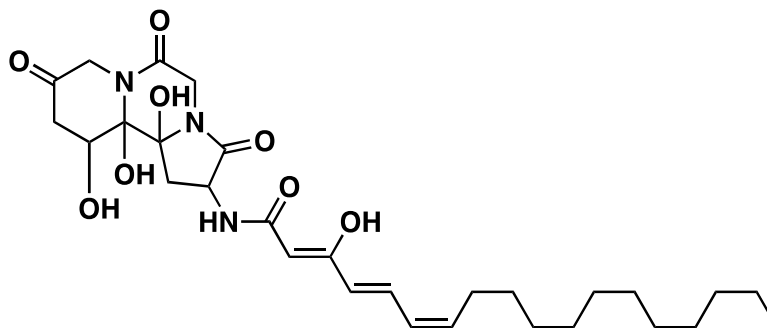


esporminarina A (**41**)

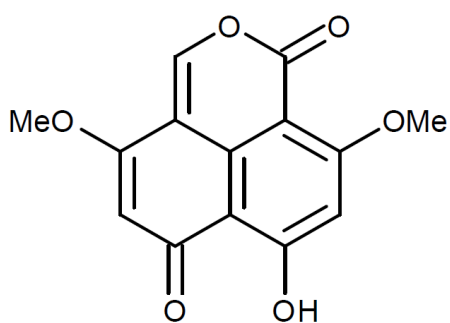


esporminarina B (**42**)

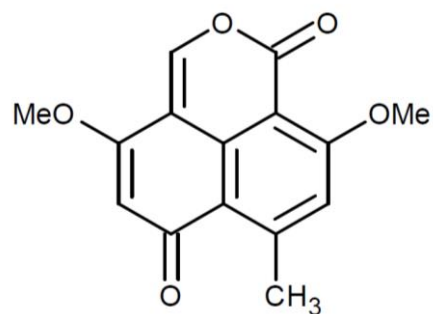
Cuadro 4. Metabolitos reportados para la especie *S. minimoides* (continuación).



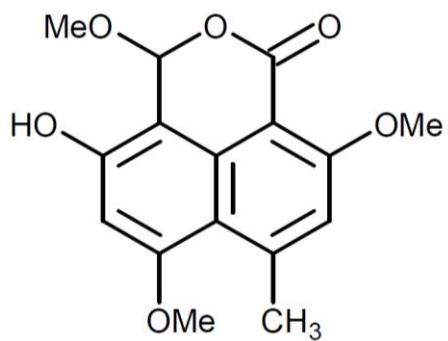
depsipéptido (43)



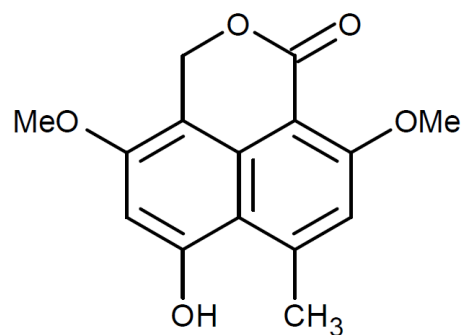
corimbiferona (44)



corimbiferona C (45)

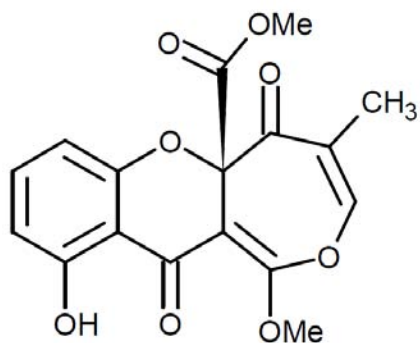


corimbiferan lactona E (46)

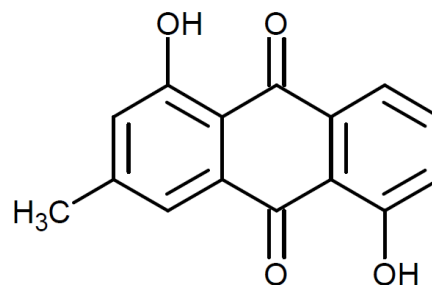


corimbiferan lactona D (47)

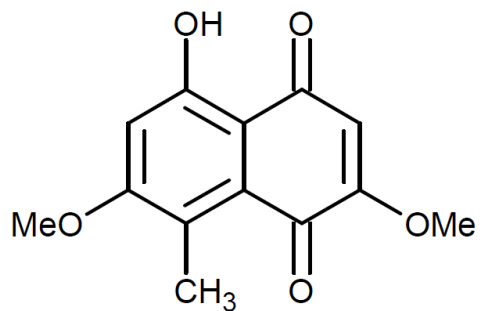
Cuadro 4. Metabolitos reportados para la especie *S. minimoides* (continuación).



brocaenol B (48)



ziganeina (49)



5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (50)

3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de compuestos de origen natural que sirvan como prototipo estructural para el desarrollo de nuevos fármacos que puedan inhibir la actividad de las α -glucosidasas ha cobrado un gran interés ante los incrementos desmedidos de la prevalencia de la diabetes a nivel mundial. Estas enzimas constituyen un blanco molecular atractivo para el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Los microorganismos fúngicos endófitos aislados a partir de las plantas medicinales biosintetizan metabolitos secundarios que pueden ser estructuralmente y farmacológicamente similares a los que presenta la planta hospedera. También pueden biosintetizar otros productos bioactivos de interés para el desarrollo de nuevos fármacos. De tal forma, que el estudio de diversas especies de hongos endófitos ha conducido al descubrimiento de entidades químicas novedosas desde el punto de vista estructural. Estos hallazgos, en conjunto con la gran biodiversidad en México, muy poco explorada aún, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo se generó como parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de inhibidores de las α -glucosidasas de origen fúngico con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos a partir de *Hintonia latiflora* y otras especies vegetales usadas popularmente para el tratamiento de la diabetes.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Considerando que la especie *Hintonia latiflora* biosintetiza metabolitos secundarios con propiedades antihiper glucémicas que inhiben a las enzimas α -glucosidasas, es factible que alguno de sus hongos endófitos produzca compuestos similares desde el punto de vista estructural y/o farmacológico.

La evaluación mediante ensayos *in vitro* de inhibición de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* permitirá la detección de principios activos con actividad antihiper glucémica.

4.2. Objetivo

Descubrir nuevos inhibidores de la enzima α -glucosidasa de utilidad para el desarrollo de fármacos innovadores y/o herramientas de investigación a partir de la especie fúngica endófito *Sporormiella minimoides* aislada de *Hintonia latiflora*.

4.3. Objetivos Particulares

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

- Cultivar en mediana escala la especie fúngica y preparar su extractos orgánicos con el fin de realizar una evaluación preliminar de su efecto sobre las enzimas α -glucosidasas.
- Obtener el extracto crudo y proceder al aislamiento y purificación de los metabolitos activos en forma pura, para la determinación de sus estructuras químicas y realización de ensayos biológicos.

- Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. El cumplimiento de este objetivo conducirá a la caracterización de sustancias que representen prototipos estructurales innovadores para el desarrollo de agentes inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.
- Evaluar la interacción de los principios activos puros con la enzima α -glucosidasa mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico *in vitro*, y determinar los parámetros cinéticos de la inhibición. Este ensayo permitirá la detección de principios activos que inhiban la actividad de la enzima α -glucosidasa.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular para establecer el sitio probable de unión de los ligantes evaluados en la enzima.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Material fúngico

El hongo *Sporormiella minimoides* Ahmed & Cain (Sporormiaceae) fue aislado a partir de las hojas de la especie medicinal *Hintonia latiflora*, recolectada en el municipio de Huetamo (18° 31.709' N, 101° 4.692' O; 221 msnm), estado de Michoacán, México, en el año 2010.

La identidad y la clasificación de la especie fúngica fue establecida por la Dra. María del Carmen González (Instituto de Biología, UNAM) y el Dr. Anthony E. Glenn (Toxicology & Mycotoxin Research Unit, USDA-ARS, Georgia, EUA). Un cultivo de referencia (*voucher*: 26355) se mantiene en la colección fúngica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, UNAM.

5.2. Procedimientos generales

5.2.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

De manera general, la determinación de la estructura molecular de los productos aislados se realizó mediante la aplicación de los métodos de espectroscopia (IR, RO, DC, RMN) y de espectrometría de masas (EMIE).

Los espectros en el infrarrojo (IR) se obtuvieron por la técnica de reflectancia (FTIR-ATR) en un espectrómetro Perkin-Elmer modelo 400. Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro digital Perkin Elmer modelo 343 a 25°C con soluciones preparadas con CHCl₃ y/o MeOH en la longitud de onda de la línea D-sodio (λ 589 nm). Los espectros de dicroísmo circular (DC) de los compuestos **51** y **52** fueron registrados en un polarímetro JASCO[®] modelo J720 en CH₂Cl₂.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en los equipos Varian Inova-500 a 500 MHz (^1H)/125 MHz (^{13}C) y Varian Unity Inova a 400 MHz (^1H)/100 MHz (^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizando CDCl_3 como disolvente.

Los análisis por espectrometría de masas de baja resolución se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia Waters Acquity UPLC H-Class[®] acoplado a un detector de masas SQD2 mediante la técnica ionización por electrospray (UHPLC-EM-ESI) en los modos positivo (ESI^+) y negativo (ESI^-).

Las condiciones de análisis y de separación fueron en una columna fase reversa Acquity[®] BEH C_{18} (2.1×100 mm i.d.; $1.7 \mu\text{m}$), utilizando como fase móvil un gradiente de MeCN (**A**) y agua (**B**; 0.1% ácido fórmico): 0 min 15% **A**; 8 min 100% **A**; 10 min 100% **A**; 10.5 min 15% **A**; Flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 μL . Detector de masas: Waters SQD2; Condiciones de análisis: ESI^+ ; Voltaje capilar: 2.0 kV; Voltaje cono: 30 V; Temperatura de solvatación: 400°C ; Gas de solvatación: nitrógeno (N_2) 650 L/hr; Gas cono: 10 L/hr.

5.2.2. Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas de gel de sílice de 0.25 mm de grosor (gel de sílice 60 F_{254} , 10-12 μm , Merck[®]) y empleando diferentes sistemas de elución. La CCF tipo preparativo se realizó en placas de vidrio de 20×20 cm de 1 mm de espesor recubiertas con gel de sílice y empleando diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (λ 254 y 356 nm), y como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal en H_2SO_4 (12 g de sulfato cérico en 22.5 mL de H_2SO_4 y 350 g de hielo).

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron empleando gel de sílice como fase estacionaria (sílica gel 60 F₂₅₄, 10-12 µm, Merck®).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), se realizó en un cromatógrafo marca Waters®, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD), un inyector automático y un módulo colector de fracciones. Los análisis se realizaron en una columna Phenomenex® Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 4.6 mm); utilizando como sistema de elución: MeCN (**A**) y agua (**B**; 0.1% ácido fórmico); gradiente de elución: 30% (**A**) → 100% (**A**); tiempo de corrida: 30 min; Flujo: 1 mL/min; longitud de onda de detección: 200-400 nm. Las condiciones de análisis del detector ELSD fueron las siguientes: Ganancia: 100; Presión de gas: 40 psi; Temperatura: 50°C. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizó utilizando el programa Empower® versión 3.0 (Waters®).

La separación y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en las fracciones analizadas, se realizó mediante el escalamiento de las condiciones de análisis utilizadas a nivel analítico en una columna preparativa Phenomenex Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 21.2 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y agua (**B**; 0.1% ácido fórmico); gradiente de elución: 30% (**A**) → 100% (**A**); tiempo de corrida: 30 min; flujo: 19 mL/min; longitud de onda de detección: 200-400 nm.

5.3. Fermentación de la especie fúngica objeto de estudio.

En primer lugar se realizó la preparación del inóculo de la especie fúngica objeto de estudio, a partir de un cultivo puro en medio agar papa dextrosa (PDA; Difco®). Para ello, el microorganismo fue cultivado en 15 mL de medio caldo papa dextrosa (PDB; Difco®), durante 8 días a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, con la finalidad de incrementar la biomasa.

La fermentación en mediana escala de la especie fúngica *S. minimoides* se realizó vertiendo el inóculo sobre un sustrato sólido de arroz [200 g de arroz en 400 mL de agua y/o 500 g de arroz en 850 mL de agua] en condiciones estáticas, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, durante 45 días.

5.4. Estudio químico de las especies fúngicas

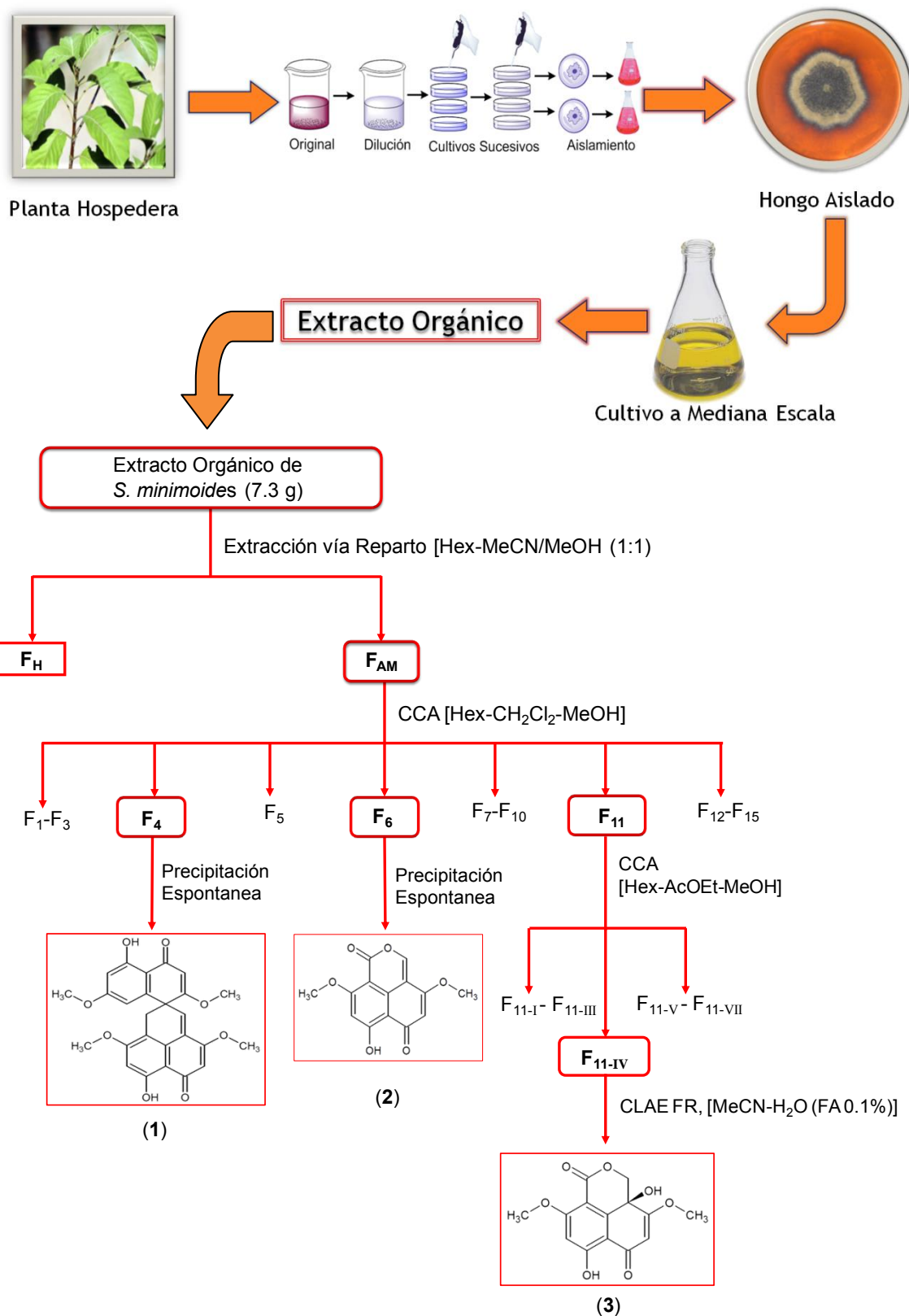
5.4.1. Preparación del extracto orgánico

La preparación del extracto orgánico de la especie fúngica cultivada, se realizó mediante un proceso de maceración exhaustiva de los cultivos sólidos a temperatura ambiente, utilizando CH_2Cl_2 como disolvente. Al cabo del proceso de extracción, el extracto orgánico se filtró y concentró al vacío, obteniéndose 7.3 g de extracto seco.

5.4.2. Fraccionamiento de extracto orgánico.

El extracto obtenido (7.3 g) se resuspendió en 60 mL de CHCl_3 y se le adicionaron 90 mL de H_2O . La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos. Enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta última se sometió a un proceso de extracción con CHCl_3 (3×100 mL). La fase orgánica obtenida de esta última extracción se llevó a sequedad a presión reducida. Posteriormente, el extracto de cloroformo se resuspendió en una mezcla de MeCN–MeOH 1:1 (120 mL) y se sometió a un segundo proceso de reparto con hexano (3×120 mL). La fase de hexano (F_H) se desechó y la fracción orgánica (F_{AM}) resultante se evaporó a sequedad a presión reducida.

Enseguida la fracción orgánica F_{AM} (5.4 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una CCA, empleando una columna empacada con gel de sílice utilizando un gradiente de elución entre Hex- CH_2Cl_2 -MeOH con incrementos graduales de polaridad. Este proceso generó un conjunto de 12 fracciones (F_1 - F_{12} ; **Esquema 1**).



Esquema 1. Preparación y fraccionamiento del extracto orgánico de *S. minimoides*.

5.4.3. Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en *S. minimoides*

5.4.3.1. Aislamiento de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51)

De la fracción primaria **F₄** (184.7 mg) precipitaron de manera espontánea 18.5 mg de un sólido naranja con punto de fusión mayor a 280 °C identificado como la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**).

5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51): ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 13.30 (1H, s, OH-5), 13.14 (1H, s, OH-7'), 6.67 (1H, s, H-2'), 6.45 (1H, s, H-8'), 6.35 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-6), 6.24 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-8), 5.75 (1H, s, H-5'), 5.70 (1H, s, H-3), 3.87 (3H, s, OCH₃-4'), 3.81 (3H, s, OCH₃-2), 3.80 (3H, s, OCH₃-9'), 3.66 (3H, s, OCH₃-7), 3.39 (1H, d, *J* = 18 Hz, CH₂-1'α), 3.19 (1H, d, *J* = 18 Hz, CH₂-1'β); ¹³C-RMN (175 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 190.1 (C-6'), 189.7 (C-4), 177.8 (C-2), 164.8 (C-4'), 164.7 (C-7), 164.6 (C-5), 162.4 (C-7'), 161.6 (C-9'), 147.0 (C-3a), 135.0 (C-2'), 129.2 (C-8a), 126.5 (C-3'), 109.8 (C-10'), 106.7 (C-4a), 106.7 (C-6a'), 106.4 (C-8), 102.1 (C-5'), 100.6 (C-3), 99.9 (C-6), 99.3 (C-8'), 56.7 (OCH₃-9), 56.0 (OCH₃-11'), 55.7 (OCH₃-12'), 55.4 (OCH₃-10), 45.6 (C-1), 33.1 (C-1'); EM-ESI⁺ *m/z* 463 [M+1]⁺ (calc. para C₂₆H₂₂O₈, 462.44808).

5.4.3.2. Aislamiento de la corimbiferona (44)

De la fracción primaria **F₆** (130.8 mg) precipitaron de manera espontánea 10.3 mg de un sólido amarillo con un p.f. de 255-256°C, el cual se identificó como la corimbiferona (**44**) mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de una muestra auténtica aislada previamente en nuestro grupo de trabajo (Leyte-Lugo *et al.*, 2013).

Corimbiferona (44): UV (MeOH) λ_{\max} : 212, 245, 276, 364 nm; IR (FTIR-ATR) ν_{\max} : 3474, 3074, 2949, 1741, 1647, 1588, 1561, 1381 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (700 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 14.56 (1H, s, OH-8), 8.25 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-7), 5.92 (1H, s, H-2), 4.06 (3H, s, OCH_3 -6), 3.96 (3H, s, OCH_3 -3); $^{13}\text{C-RMN}$ (175 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 188.5 (C-1), 170.4 (C-8), 167.5 (C-6), 165.0 (C-3), 156.0 (C-9), 152.1 (C-10), 136.9 (C-4a), 107.9 (C-4), 105.0 (C-8a), 101.3 (C-2), 99.9 (C-7), 99.6 (C-5), 56.9 (OCH_3 -6), 56.3 (OCH_3 -3); EM-FAB m/z 275.0530 $[\text{M}+1]^+$ (calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$, 275.0550).

5.4.3.3. Aislamiento de la preusocromona C (52)

La separación de los constituyentes presentes en la fracción primaria **F₁₁** (425.9 mg), se realizó mediante un análisis cromatográfico por CCA utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt y AcOEt-MeOH en orden creciente de polaridad. Este proceso permitió la obtención de un conjunto de 7 fracciones secundarias (**F_{11-I}**-**F_{11-VII}**).

La resolución de la fracción secundaria **F_{11-IV}** por CLAE, utilizando una columna fase reversa Phenomenex Gemini C_{18} (5 μm , 250 \times 21.2 mm) y como sistema de elución un sistema binario entre MeCN y H_2O (0.1% FA), permitió el aislamiento de 13 mg de un sólido amarillo con p.f. 244 – 245 °C identificado como la preusocromona C mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las reportadas en la literatura (Zhang *et al.*, 2012).

Preusocromona C (52): $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +151$ (1 mg/mL, MeOH); DC (c 0.01 mg/mL, CHCl_3) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 336 (+2.12), 296 (-0.14), 255 (+6.92); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 13.15 (1H, s, OH-1), 6.53 (1H, s, H-2), 5.63 (1H, s, H-7), 4.81 (1H, d, $J = 12$ Hz, CH_2 -10a), 4.21 (1H, d, $J = 12$ Hz, CH_2 -10b), 3.97 (3H, s, OCH_3 -12), 3.88 (3H, s, OCH_3 -11); $^{13}\text{C-RMN}$ (175 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 189.1 (C-8), 173.1 (C-6), 166.4 (C-1), 165.4 (C-3), 159.5 (C-9), 145.4 (C-4a), 105.2 (C-8a), 104.7 (C-4), 100.5 (C-7), 100.1 (C-2), 69.5 (C-10), 63.5 (C-5), 56.6 (OCH_3 -12), 56.3 (OCH_3 -11); EM-ESI⁺ m/z 293 $[\text{M}+1]^+$ (calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_7$, 292.2408).

5.5. Ensayos biológicos.

5.5.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

La evaluación de la actividad de las fracciones y los productos puros aislados sobre las enzimas α -glucosidasas de tipo I de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich®), se realizó utilizando la metodología descrita por Oki *et al.* (1999) con algunas modificaciones (Brindis *et al.*, 2011; Rivera-Chávez *et al.*, 2012). A continuación se describe con detalle el procedimiento:

Preparación de la mezcla de reacción: 1 U/mL de la enzima α -glucosidasa de levadura se incubó durante 30 min a 30°C en una solución amortiguadora de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 100 mM, pH 7).

Procedimiento: el ensayo se realizó en placas de Elisa de 96 pozos (250 μL de capacidad). Para cada muestra de prueba se prepararon diluciones seriadas, hasta obtener concentraciones finales en un intervalo entre 50–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 10 μL de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones indicadas, 20 μL de la solución de la enzima y 60 μL de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7). Posteriormente, la placa se incubó durante 10 min a 37°C. Al término de este período de incubación, se adicionaron a cada pozo, 10 μL del sustrato *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG; 5 mM); enseguida se determinó la absorbancia de las muestras, a tiempo cero, utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIO-RAD® modelo iMark® a 405 nm. Posteriormente, se incubó por segunda vez la placa a 37°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia con la finalidad de cuantificar el contenido de *p*-nitrofenol. Como control positivo se utilizó acarbosa. Los resultados representan el promedio de tres réplicas \pm EMM. El porcentaje de inhibición de las muestras se determinó utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\left(1 - \left(\frac{A_{IT20} - A_{IT0}}{A_{CT20} - A_{CT0}}\right)\right) 100 = \% \text{ de inhibición}$$

Donde: A_{IT20} es la absorbancia de la muestra registrada a los 20 minutos de reacción; A_{IT0} es la absorbancia de la muestra registrada al tiempo cero de reacción; A_{CT20} es la absorbancia del blanco registrada a los 20 minutos de reacción y A_{CT0} es la absorbancia del blanco registrada al tiempo cero de reacción.

Los valores de CI_{50} (concentración requerida para inhibir en un 50% la actividad de la enzima) se calcularon a partir del ajuste de las curvas obtenidas al graficar el porcentaje de inhibición vs concentración, utilizando un análisis de regresión no lineal con la ecuación de Hill-1 en el programa Origin 8.0.

Por otra parte, para determinar los parámetros cinéticos del tipo de inhibición de los compuestos activos se realizó el método gráfico de Dixon y Lineweaver-Burk utilizando diferentes concentraciones tanto de sustratos como de inhibidor. Los resultados se expresan como la media de al menos seis réplicas \pm EMM. Los parámetros cinéticos V_{max} (velocidad máxima), k_m (constante de Michaelis-Menten), k_i (constante de inhibición competitiva) y k_i' (constante de inhibición no competitiva) se evaluaron de acuerdo al modelo de regresión no lineal basado en la siguiente expresión matemática:

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

donde V representa la velocidad inicial en ausencia o presencia de inhibidor; S e I , son la concentración de sustrato e 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 (en una inhibición no competitiva un valor de α es igual a 1; en una inhibición mixta este valor es diferente de 1).

5.6. Estudio de acoplamiento molecular

Los estudios de acoplamiento molecular de los productos activos en el ensayo *in vitro* con su blanco molecular, la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron en primer lugar, mediante la búsqueda conformacional de los diferentes isómeros estructurales utilizando un protocolo Monte Carlo (Morris *et al.*, 2009). Este procedimiento se realizó utilizando el programa Spartan'02, con un campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94). Las estructuras de mínima energía obtenidas se revisaron cuidadosamente para eliminar a los duplicados; esta búsqueda se repitió por duplicado con el fin de obtener las estructuras que presentarán las conformaciones más estables (Wavefunction Inc. Irvine, CA, USA). La visualización de todas las estructuras se realizó utilizando los programas: Hyperchem 8.0, PyMol (DeLano Scientific LLC, CA), AutoDock Vina y AutoDock Tools (ADT; www.autodock.scripps.edu).

5.6.1. Acoplamiento molecular

Los cálculos de acoplamiento molecular (AM) se realizaron utilizando el programa AutoDock 4.2 (www.autodock.scripps.edu). La estructura cristalina de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo a partir del Protein Data Bank (RCSB: código PDB: 3A4A). La adición de los átomos de hidrógeno a la proteína, las cargas de Kollman, los parámetros de solvatación y volúmenes fraccionarios, se realizaron utilizando el programa ADT AutoDockTools 1.5.4 (<http://mglttools.scripps.edu>). Cada ligando se preparó utilizando el mismo programa adicionando las cargas parciales de Gasteiger-Maesili, y se permitió la rotación de todos los ángulos de torsión permisibles (Morris *et al.*, 1998; Huey *et al.*, 2007).

Para la predicción de los sitios y conformaciones de unión de menor energía, inicialmente se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego, colocando el ligando en una posición al azar, y construyendo una rejilla de reconocimiento para la proteína con las siguientes dimensiones $126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA}$ en los ejes x , y y z , con la proteína colocada en el centro.

Posteriormente, se realizó un refinamiento utilizando un tamaño de rejilla menor ($60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$), colocando al ligando en la posición de menor energía obtenida a partir de los análisis del acoplamiento ciego inicial.

El estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo usando los parámetros establecidos en el programa, seleccionando el número de corridas y de evaluaciones energéticas por corrida, así como, la búsqueda local por medio del algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (Morris *et al.*, 1998). Todos los resultados de este procedimiento se analizaron mediante el programa ADT con un análisis por clúster, y la representación esquemática en dos y tres dimensiones de las interacciones se llevó a cabo utilizando el programa PyMol (<http://www.pymol.org/educational>) y LigPlot+ (EMLB-EBI; www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado al descubrimiento de nuevos inhibidores de la enzima α -glucosidasa a partir de especies fúngicas endófitas selectas obtenidas de plantas medicinales mexicanas. En este caso, el aislamiento de la especie fúngica *Sporormiella minimoides*, se realizó a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Rubiaceae), ampliamente utilizada en la medicina popular de México para tratar la diabetes.

La presentación de los resultados, así como el análisis de los mismos se realizará en tres partes. En la primera se abordará lo concerniente al estudio químico de la especie fúngica *Sporormiella minimoides*; en la segunda parte se discutirán los resultados obtenidos de la evaluación de los metabolitos aislados sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa. Finalmente, en la tercera sección, se analizarán los resultados de los estudios de acoplamiento molecular realizados con el fin de determinar el probable sitio de unión a la enzima α -glucosidasa de los compuestos analizados.

6.1. Estudio químico de la especie *Sporormiella minimoides*

El extracto orgánico (7.3459 g) obtenido a partir de la maceración del medio de cultivo, se sometió a un proceso de reparto con hexano y una mezcla de acetonitrilo-metanol (1:1). La fracción primaria recuperada de la fase MeCN-MeOH se estudió aplicando diversas técnicas cromatográficas. Al cabo del análisis fue posible caracterizar a la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro [naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**), metabolito novedoso, y a la preusocromona C (**52**), no descrita con anterioridad en *S. minimoides*. De manera adicional, se aislaron y purificaron los compuestos corimbiferona (**44**) y 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**50**). Las estructuras de los compuestos caracterizados se indican en la **Figura 5**.

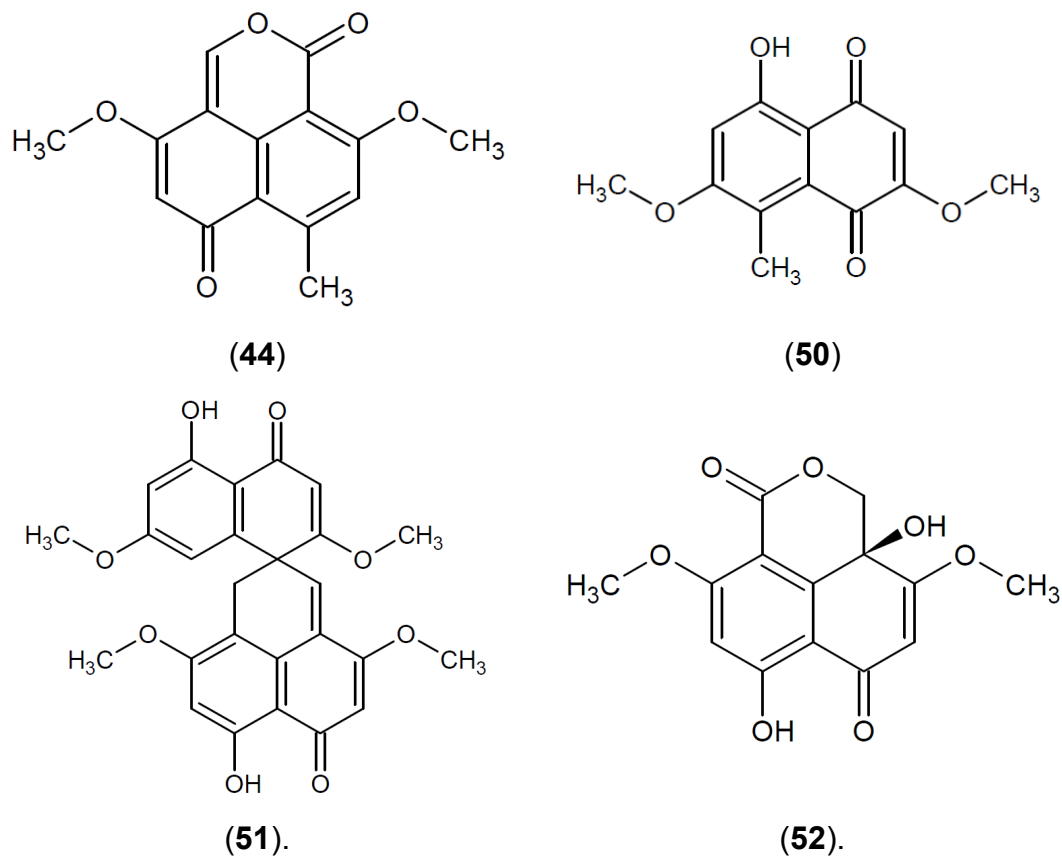


Figura 5. Estructuras de los compuestos aislados.

La caracterización de los metabolitos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (IR, ^1H y ^{13}C -RMN, HSQC, HMBC, NOESY, COSY) y espectrometría de masas (EM-ESI).

6.1.1. 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51)

El metabolito 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) se obtuvo como un sólido naranja, ópticamente inactivo. Su fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_8$ a partir del análisis de los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) y masas generado por la técnica electrospray (ES), modalidades positivo y negativo; los iones cuasimoleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$ se observaron en una relación m/z de 463 y 461, respectivamente.

Las señales correspondientes a los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C se muestran en la **Tabla 4**. En el espectro de RMN-¹³C (**Figura 9**) se observaron señales para 26 carbonos, de las cuales, dos corresponden a grupos carbonilos tipo cetona conjugada en δ_C 190.1 y 189.7. Mediante la ayuda del experimento HSQC y DEPT-135 se determinó la presencia de once carbonos protonados, entre ellos seis metinos (δ_C/δ_H 135.0/6.67, 106.4/6.24, 102.1/5.75, 100.6/5.70, 99.9/6.35, 99.3/6.45), cuatro grupos metoxilo (δ_C/δ_H 56.7/3.81, 56.0/3.87, 55.7/3.80 y 55.4/3.66), así como una señal correspondiente a un metileno en δ_C 33.1. También se encontró la presencia de trece carbonos cuaternarios, de los cuales 12 corresponden a carbonos aromáticos, seis de ellos unidos a grupos oxigenados (δ_C 177.8, 164.8, 164.7, 164.6, 162.4 y 161.6, 147.0, 129.2, 126.5, 109.8, 106.7 y 106.7) y el otro a un carbono alifático en δ_C 45.6.

En el espectro de RMN-¹H (**Figura 10**) se observa en la región aromática un sistema AB en δ_H 6.35 y 6.24 correspondiente a dos protones *meta* relacionados, a juzgar por la constante de acoplamiento de 2.5 Hz. Otro sistema AB se aprecia en δ_H 3.39 y 3.19 (d, $J= 18$ Hz); éste último es característico de los protones diastereotópicos de un metileno presente en un arreglo cíclico. En δ_H 13.30 y 13.14 aparecen dos señales de protones de hidroxilo que se encuentran quelatados. Finalmente se distinguen las señales de cuatro grupos metoxilos y cuatro hidrógenos aromáticos adicionales.

Las correlaciones observadas en los experimentos HMBC y NOESY se indican en la **Tabla 4**, y permitieron detectar las estructuras parciales **A-F** que se indican a continuación:

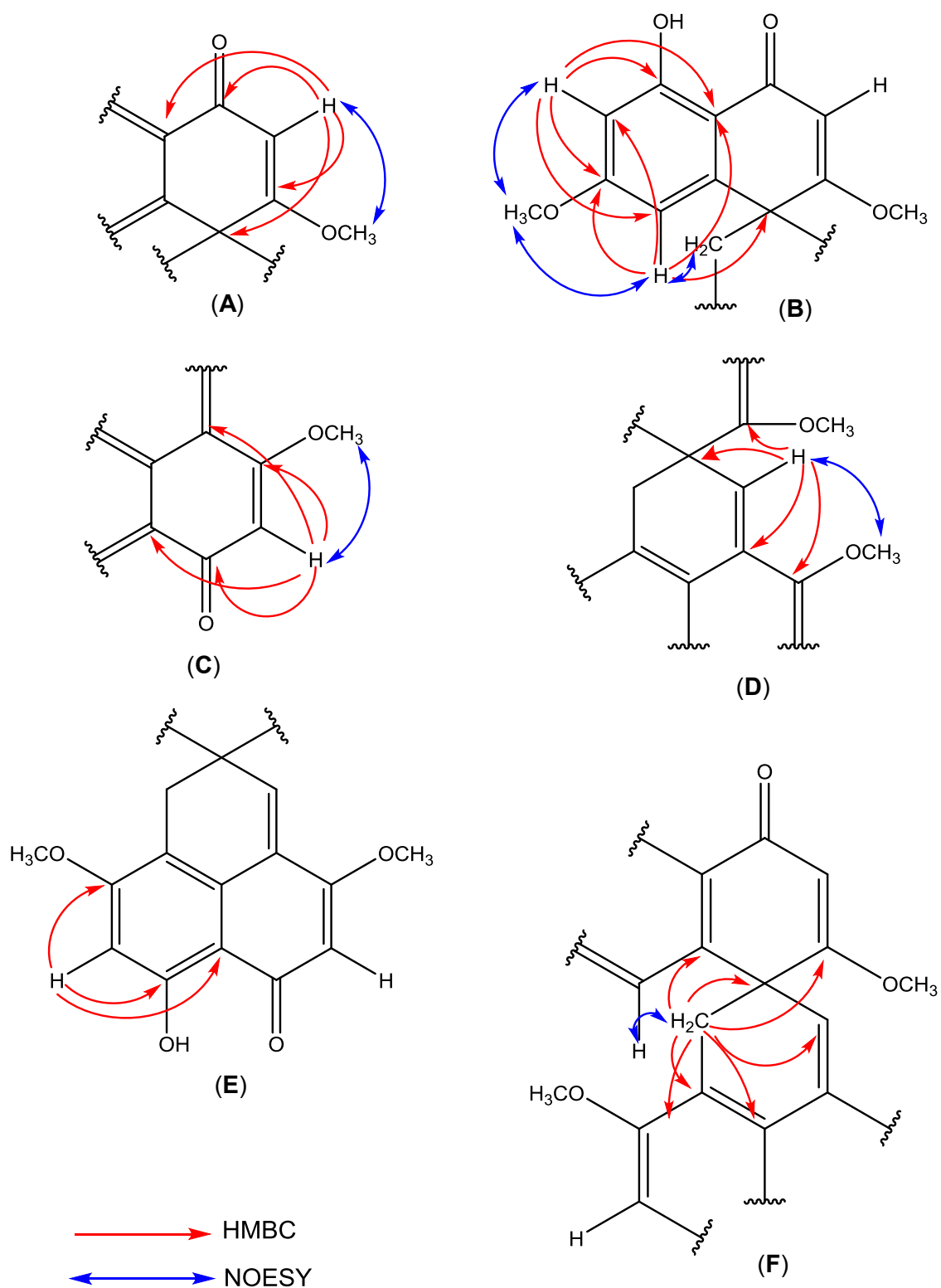


Figura 6. Elucidación estructural del compuesto **51**, fragmentos identificados (A-F) mediante los experimentos HMBC y NOESY.

La integración de los fragmentos estructurales **A-F** antes señalados (**Figura 6**) permitió proponer la estructura del producto natural como la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**Figura 7 y 8**).

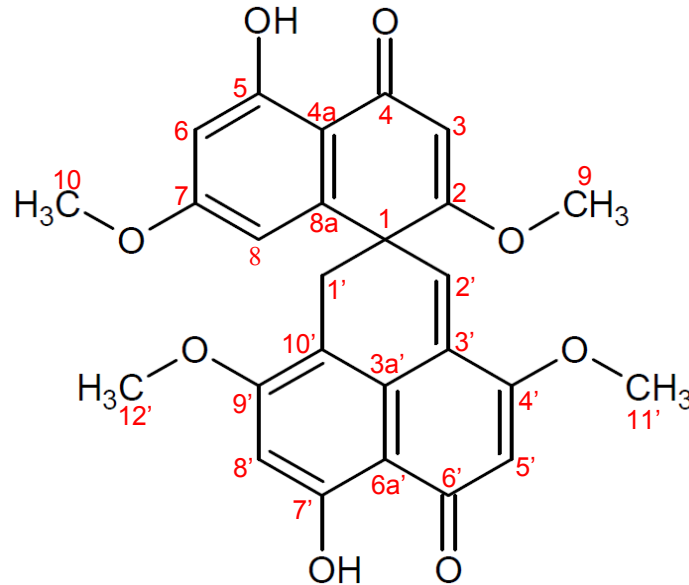


Figura 7. Estructura de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**).

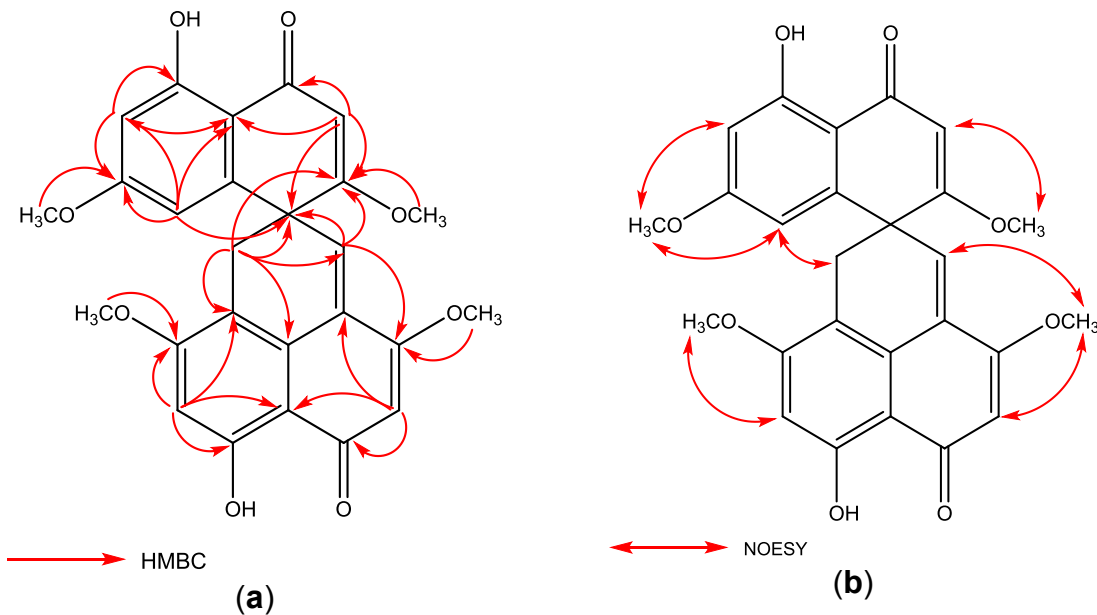


Figura 8. Correlaciones HMBC selectas para **51** (a); Correlaciones NOESY para **51** (b).

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) en CDCl₃ (¹H a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz).

	δ_C	δ_H (mult, <i>J</i> en [Hz])	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	NOESY
1	44.6			
2	177.8			
3	100.6	5.70 (s)	1, 2, 4, 4a	3.80
4	189.7			
4a	106.7			
5	164.6			
6	99.9	6.35 (d, 2.5)	4a, 5, 7, 8	3.67
7	164.7			
8	106.4	6.24 (d, 2.5)	1, 4a, 6, 7	3.19, 3.67
8a	129.2			
9	56.7	3.80 (s)	2	5.70
10	55.4	3.67 (s)	7	6.24, 6.35
1'α	33.1	3.39 (d, 18)	1, 2, 2', 3a',8a, 9', 10'	
1'β		3.19 (d, 18)	1, 2, 2', 3a',8a, 9', 10'	6.24
2'	135.0	6.67 (s)	1, 2, 3', 4',	3.84
3'	126.5			
3a'	147.0			
4'	164.8			
5'	102.1	5.75 (s)	3', 4',6', 6a',	3.84
6'	190.1			
6a'	106.7			
7'	162.4			
8'	99.3	6.45 (s)	7', 6a', 10'	3.79
9'	161.6			
10'	109.8			
11'	56.0	3.84 (s)	4'	5.75
12'	55.7	3.79 (s)	9'	6.45
OH-5		13.30 (s)	5, 6	
OH-7'		13.14 (s)		

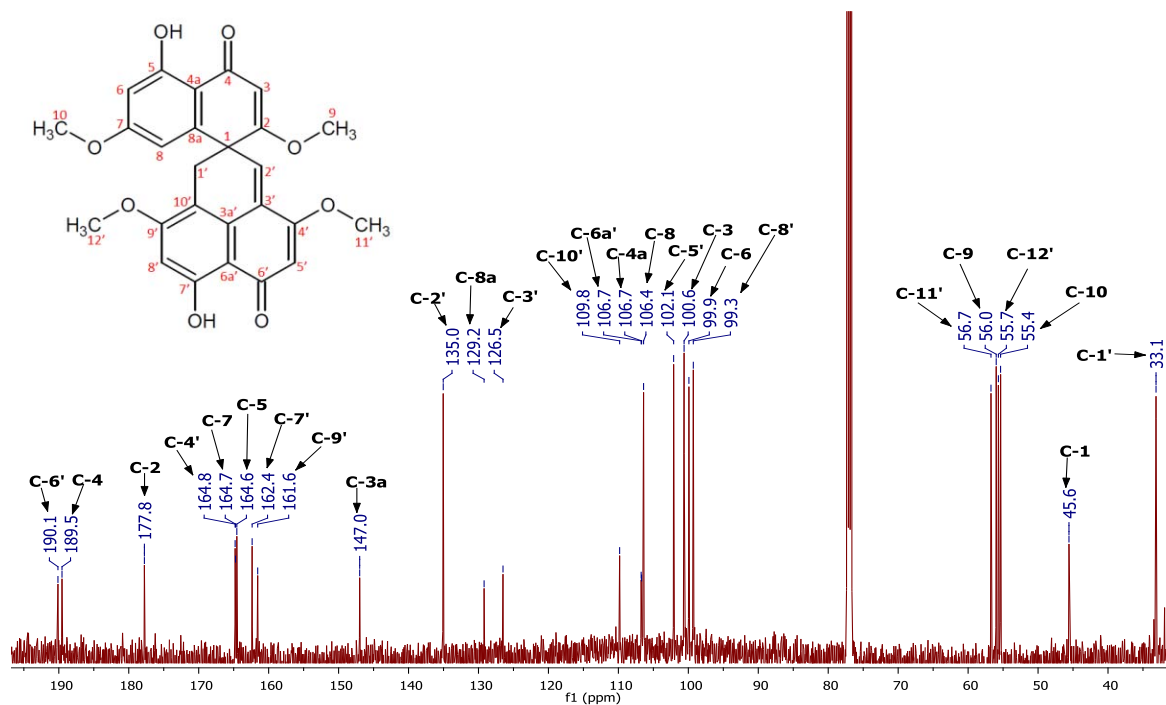


Figura 9. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del compuesto 51.

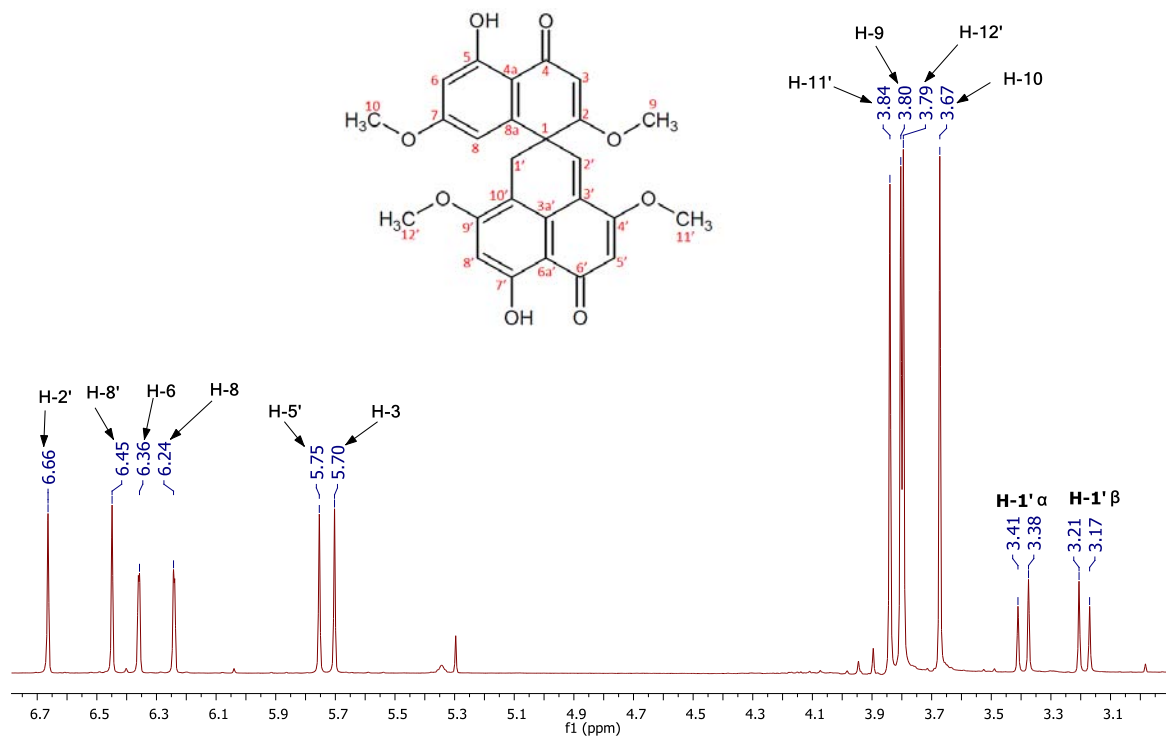


Figura 10. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 51.

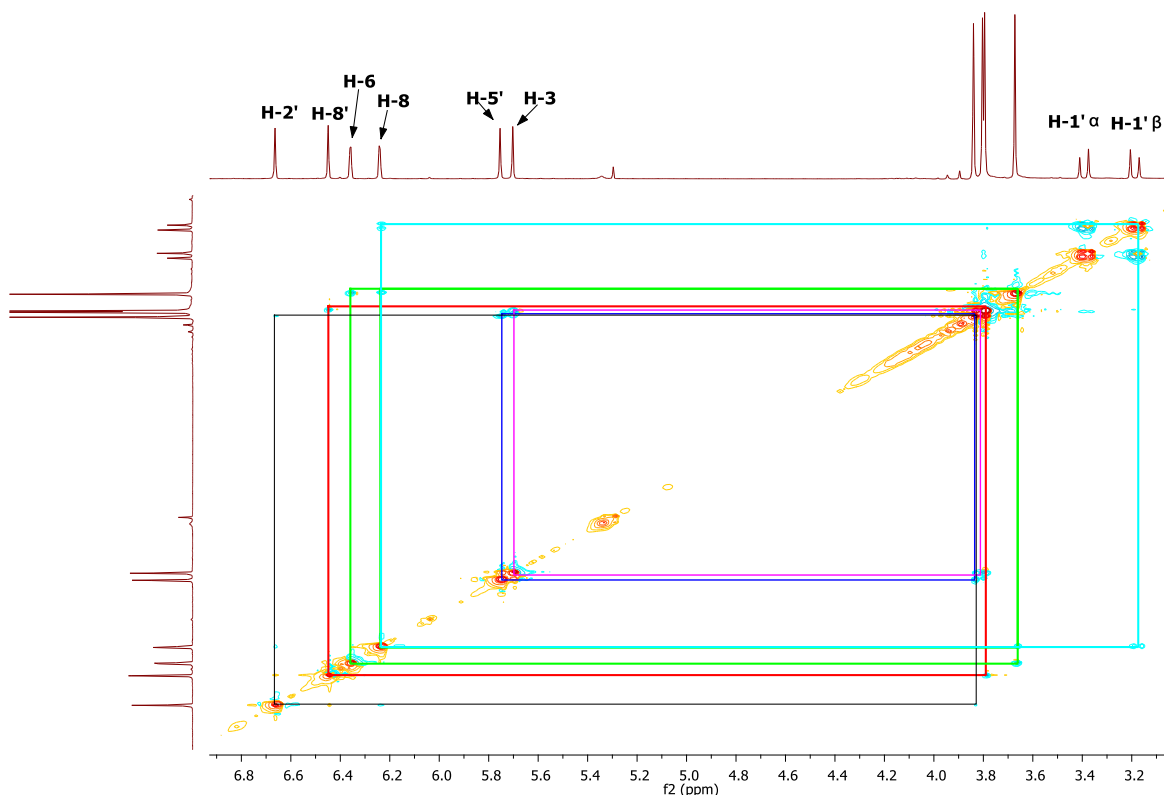


Figura 11. Espectro NOESY del compuesto **51** mostrando las principales interacciones.

La falta de rotación óptica y la naturaleza del espectro de dicroísmo circular sugieren que el producto se obtuvo como una mezcla racémica.

6.1.2. Preusocromona C (**52**)

La preusocromona C (**52**) se obtuvo como un sólido amarillo, ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25} +151$ (1 mg/mL, MeOH); DC (c 0.01 mg/mL, CHCl₃) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 336 (+2.12), 296 (-0.14) nm, 255 (+6.92) nm). Su fórmula molecular se determinó como C₁₄H₁₂O₇ a partir del análisis de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C y de espectrometría de masas. El espectro de masas obtenido por ESI⁺ muestra el ion cuasimolecular [M+H]⁺ en una relación *m/z* de 293, mientras que el ion cuasimolecular [M-H]⁻ en el espectro ESI⁻ se apreció en una relación *m/z* de 291.

Las señales correspondientes a los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C se muestran en la **Tabla 5** y resultaron muy similares a los de la corimbiferona (**44**). Así, en el espectro de RMN-¹³C (**Figura 12**) se observaron señales para 14 carbonos, de las cuales, una corresponde a un grupo carbonilo tipo cetona conjugada en δ_C 189.0 y otra en δ_C 159.5 al carbonilo de una lactona. Al analizar los espectros HSQC y DEPT-135 se determinó la presencia de cinco carbonos protonados, de los cuales dos son metinos (δ_C/δ_H 100.0/6.53 100.5/5.63), dos pertenecen a grupos metoxilos (δ_C/δ_H 56.6/3.88, 56.3/3.97), y el quinto corresponde a un metileno unido a oxígeno en δ_C 69.5; éste último correlaciona con los protones en δ_H 4.81 y 4.21. También se encontró la presencia de siete carbonos cuaternarios, de los cuales seis corresponden a carbonos aromáticos (δ_C 173.1, 166.4, 165.4 145.4, 105.2 y 104.7) y por último un carbono cuaternario alifático unido a oxígeno en δ_C 63.5.

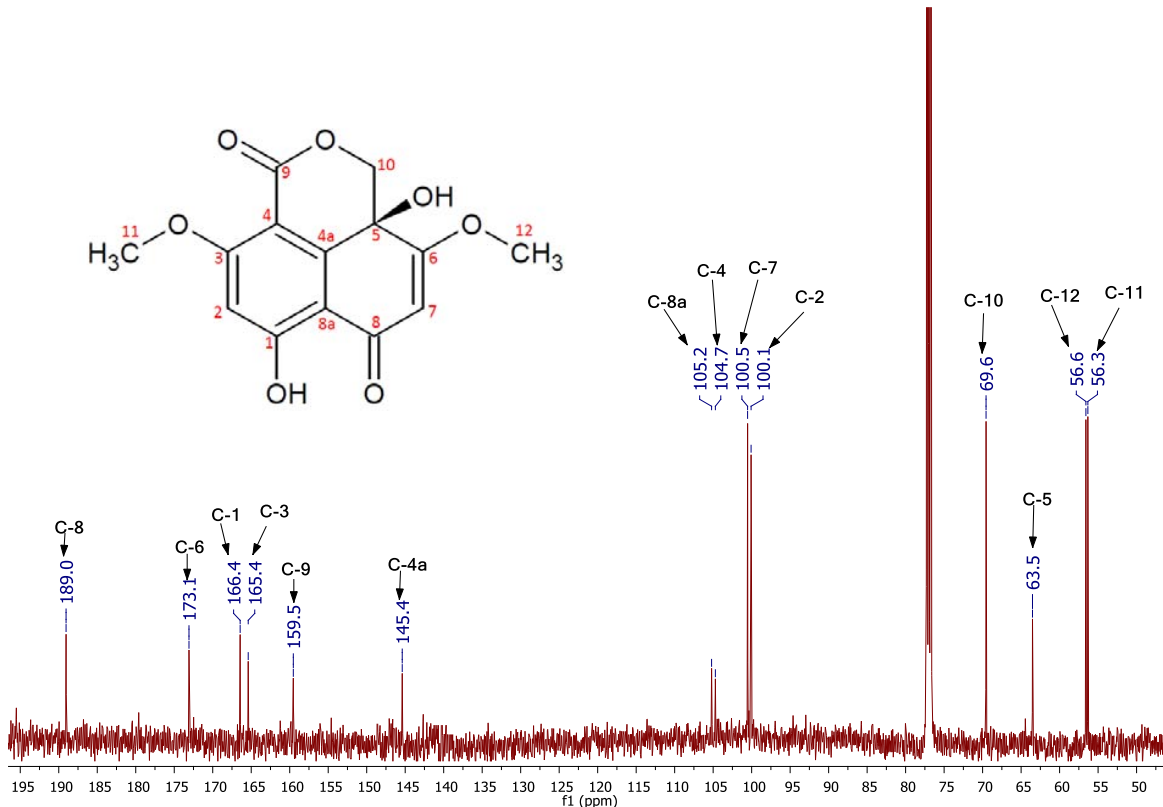


Figura 12. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de la preusocromona C (**52**).

Entonces, en contraste con la corimbiferona (Overy *et al.*, 2005) el espectro de la preusocromona C (**52**) mostró dos carbonos insaturados menos y en su lugar se detectaron las señales para un oximetileno y un carbinol cuaternario como se evidencio también en el espectro de RMN-¹H (**Figura 13**); éste espectro presento similitud con el de la corimbiferona. Las principales diferencias consistieron en la presencia de dos señales (d, $J=12$ Hz) de un sistema AB en δ_H 4.81 y 4.22 asignables a un metileno unido a oxígeno, en lugar de la señal del protón vinílico en C-10 de la corimbiferona (**44**); este sistema se encuentra presente también en el anillo lactónico de otros derivados de la corimbiferona (Leyte-Lugo *et al.*, 2013). El espectro presento igualmente una señal intercambiable por D₂O en δ_H 5.81 asignable al hidroxilo unido al carbono cuaternario en δ_C 69.5; y otras señales presentes en la corimbiferona.

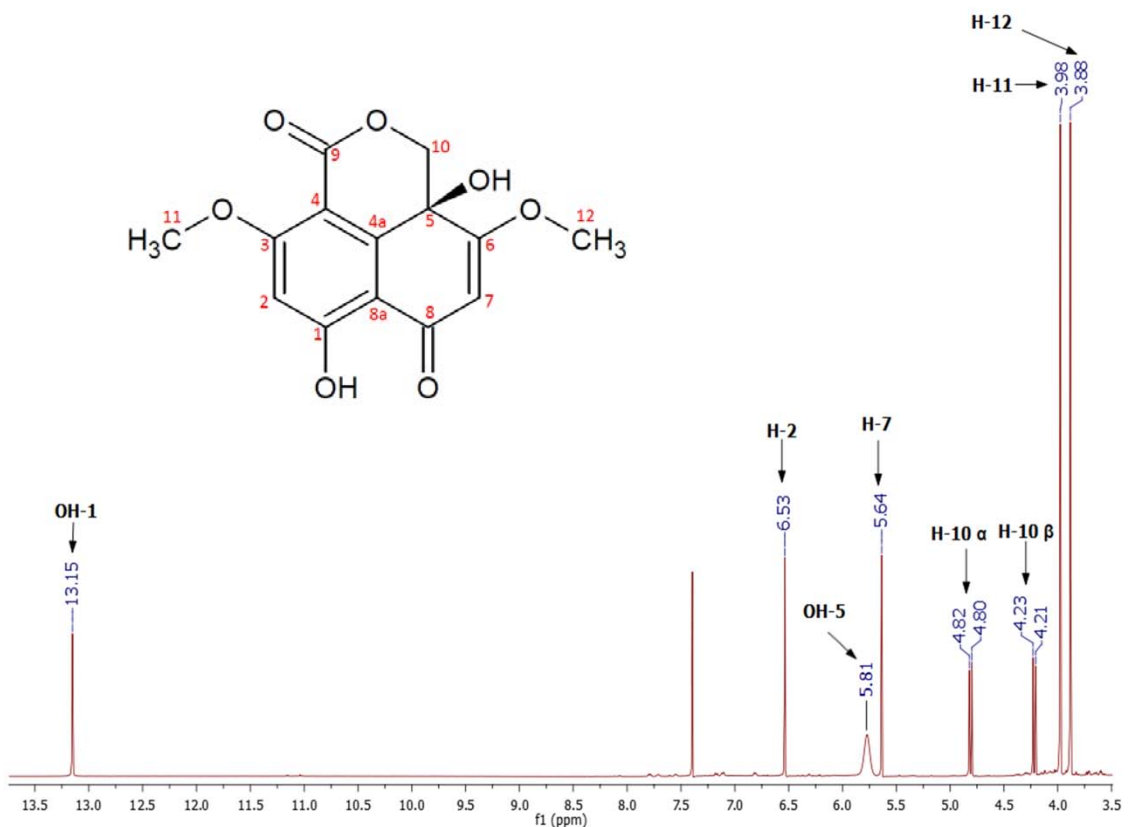


Figura 13. Espectro de RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) de la preusocromona C (**52**).

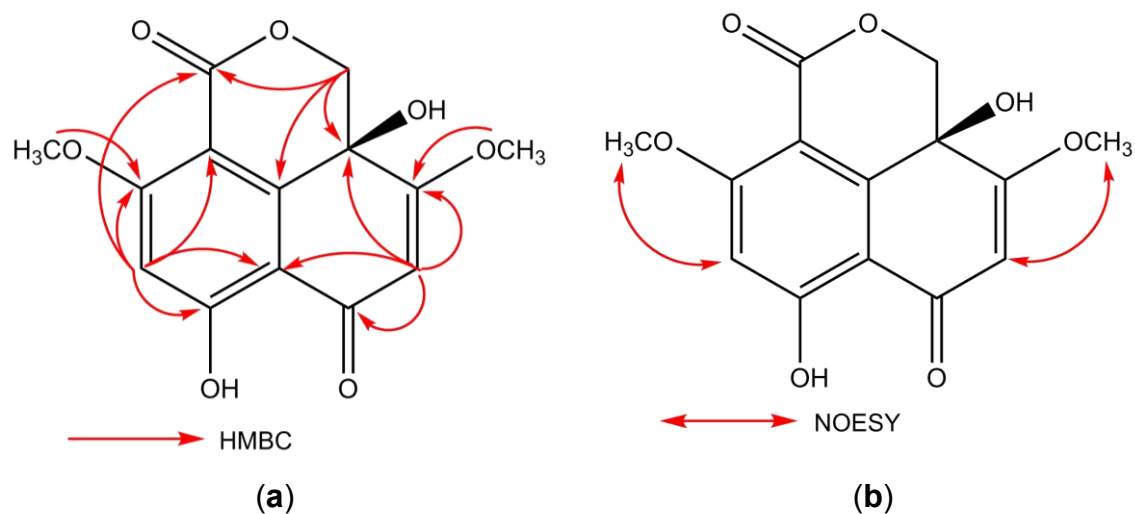


Figura 14. Correlaciones HMBC selectas (a) y correlaciones NOESY (b) para la preusocromona C (52).

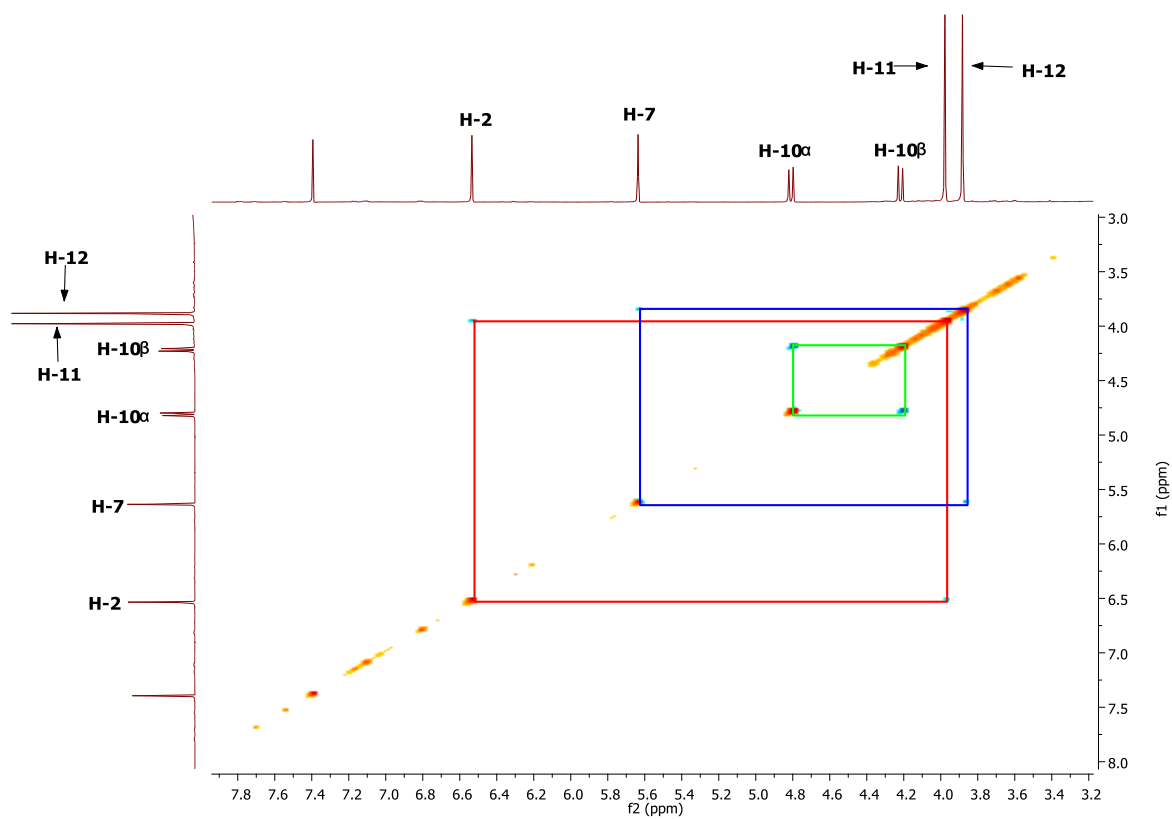


Figura 15. Espectro NOESY de la preusocromona C mostrando las principales interacciones.

La integración de los elementos estructurales detectados mediante la interpretación de los diferentes espectros de RMN uni- y bidimensionales (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC y NOESY, **Tabla 5**) permitió determinar la estructura del compuesto **52** como la de la preusocromona C, previamente obtenida de *Preussia africana*. La configuración del centro estereogénico se confirmó mediante el registro del espectro de dicroísmo circular (DC) que presentó un efecto Cotton en (c 0.01 mg/mL, CHCl_3) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 336 (+2.12) y 255 (+6.92) nm, correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ (Zhang *et al.*, 2012).

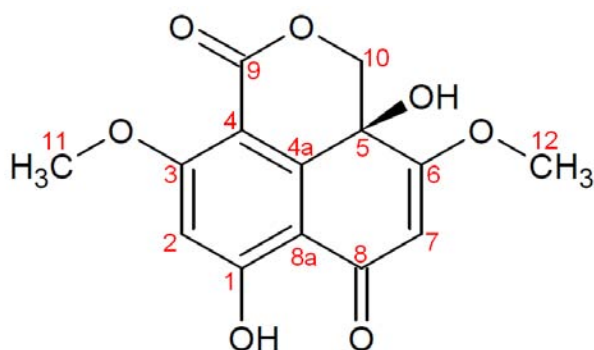


Tabla 5. Datos espectroscópicos de la preusocromona C (**52**) en CDCl_3 (^1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz).

	δ_{C}	δ_{H} (mult, J en [Hz])	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	NOESY
1	166.4			
2	100.0	6.53 (s)	1, 3, 4, 8, 9	3.97
3	165.4			
4	104.7			
4a	145.4			
5	63.5			
6	173.1			
7	100.5	5.63 (s)	5, 6, 8, 8a	3.88
8	189.0			
8a	105.2			
9	159.5			
10 α		4.81 (d, 12)	4a, 5, 6, 8a, 9	4.21
10 β	69.5	4.21 (d, 12)	4a, 5	4.81
11	56.3	3.97 (s)	2, 3	6.53
12	56.6	3.88 (s)	6, 7	5.63
OH-1		13.15 (s)	1, 2, 8a	
OH-5		5.81 (s)	5, 6	

6.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura

6.2.1. Evaluación del efecto de la fracción primaria (MeCN/MeOH) sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura

Se determinó el efecto del extracto y de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa utilizando un ensayo espectrofotocolorimétrico. Este método se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del α -D-glucósido del *p*-nitrofenol (*p*-NPG). La actividad de la enzima α -glucosidasa es directamente proporcional a la cantidad del fenol libre generado durante la reacción del sustrato con la enzima y los compuestos de prueba (Oki, *et. al.*, 1999).

La curva de inhibición de la fracción primaria MeCN/MeOH (**Figura 16**) mostró una inhibición significativa de la enzima α -glucosidasa con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 38.0 ± 10.34 ppm alcanzando un porcentaje de inhibición del 100%.

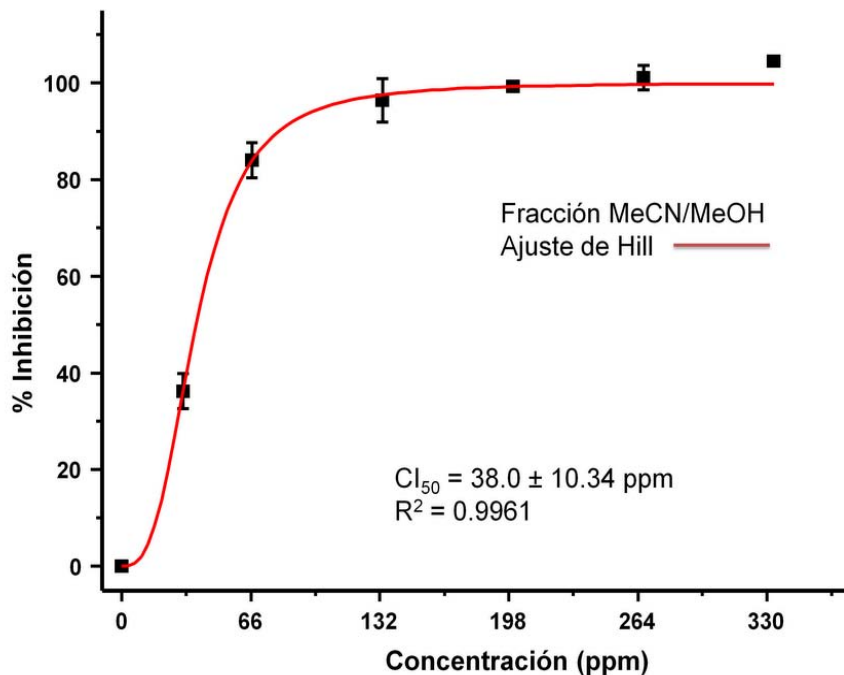


Figura 16. Curva de inhibición enzimática de la fracción MeCN/MeOH.

Este resultado sugiere la presencia de metabolitos inhibidores de la enzima α -glucosidasa en la fracción estudiada, por lo que se procedió a evaluar los metabolitos aislados a partir de ella.

6.2.2. Evaluación del efecto de los compuestos aislados sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa

Los compuestos aislados 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**), la preusocromona C (**52**) y la corimbiferona (**44**) fueron ensayados mediante la misma prueba y los resultados se compararon contra la acarbosa. En la **Tabla 6** se muestran los valores de CI_{50} calculados.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa.

Muestra	CI_{50} (μ M)	R^2
5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1' <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,6' <i>H</i> -espiro [naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (51)	2.9 ± 0.47	0.9874
Preusocromona C (52)	66.5 ± 0.97	0.9989
Corimbiferona (44)	155.5 ± 4.25	0.9946
Acarbosa (6)*	876.9 ± 38.8	0.9963

*Inhibidor modelo de la enzima α -glucosidasa.

El compuesto **51** mostró la mayor actividad; la CI_{50} calculada fue de $2.9 \pm 0.47 \mu$ M (**Figura 17**), en comparación con la acarbosa (**6**) que mostró una CI_{50} de $876.9 \pm 38.8 \mu$ M.

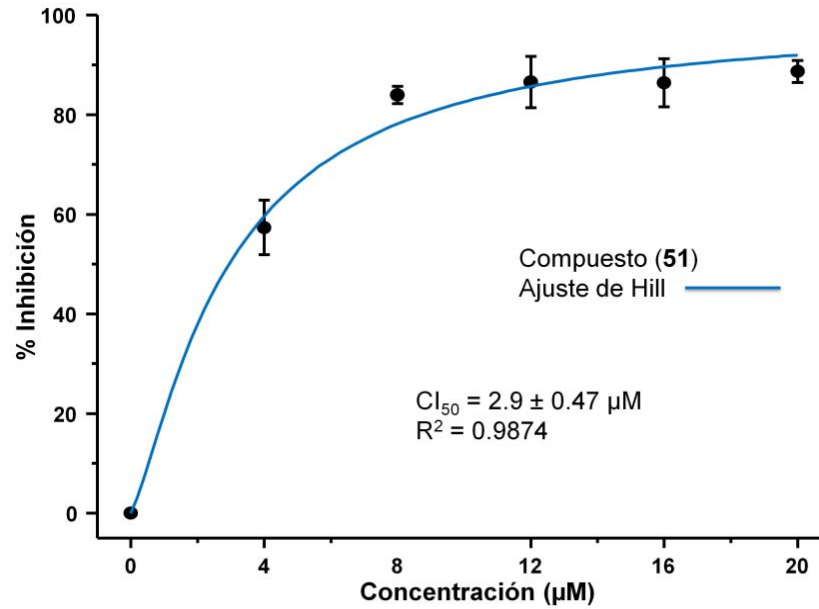


Figura 17. Curva de inhibición enzimática de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**).

En cuanto a la preusocromona C (**52**), ésta presentó una CI_{50} de $66.5 \pm 0.97 \mu M$ (**Figura 18**) y la corimbiferona (**44**), que fue el metabolito menos activo de los tres aislados, presentó una CI_{50} de $155.5 \pm 4.25 \mu M$ (**Figura 19**).

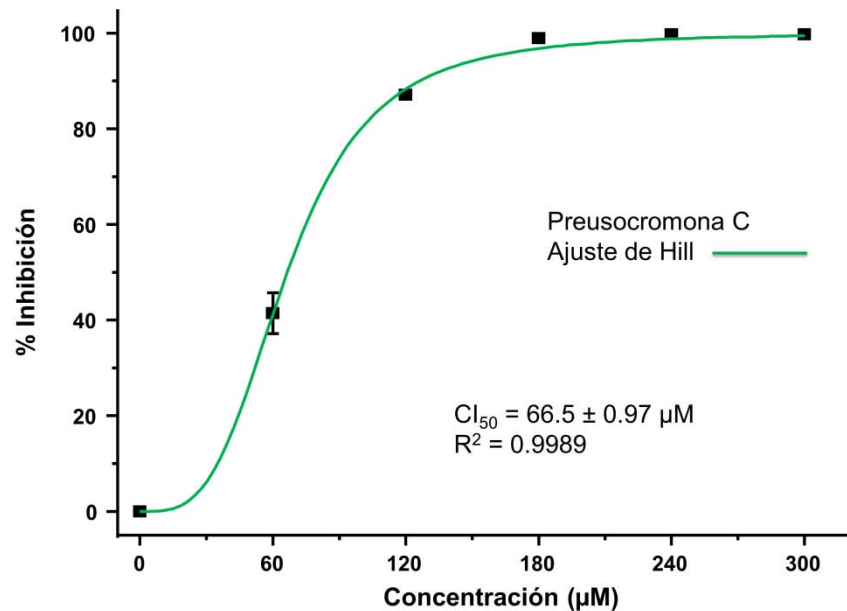


Figura 18. Curva de inhibición enzimática de la Preusocromona C (**52**).

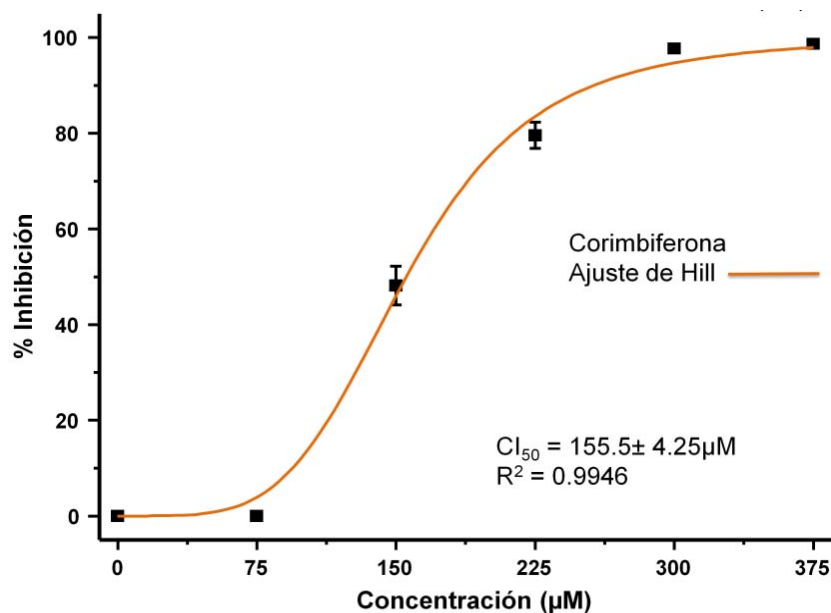


Figura 19. Curva de inhibición enzimática de la Corimbiferona (**44**).

El efecto inhibitorio de los compuestos sobre la enzima α -glucosidasa es novedoso y sugiere el potencial efecto antihiper glucémico de estos productos.

6.2.3. Ensayos de cinética enzimática

Considerando que la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro [naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) presentó una buena actividad, se realizó un estudio de cinética enzimática para determinar su tipo de inhibición. Los datos generados se graficaron como el recíproco de la respuesta obtenida contra el recíproco de la concentración del sustrato utilizado. Como resultado, se obtuvieron una serie de rectas que pueden intersectarse o no en un mismo punto; ya sea el punto en el eje de las abscisas, en el eje de las ordenadas, o entre éstas. Para calcular las constantes inhibitorias (k_i) de cada compuesto se utilizó la ecuación de Dixon. Con la gráfica de los dobles recíprocos se puede determinar entonces de manera sencilla si la inhibición de un producto es competitiva, no competitiva o mixta (Kim *et al.*, 1999).

De acuerdo a la gráfica de Lineweaver-Burk (**Figura 20**) el producto **51** se comporta como un inhibidor de tipo mixto, ya que al aumentar su concentración se obtienen una serie de rectas que se intersectan por debajo del eje de las abscisas. Esto indica que puede haber una unión entre el producto **51** y la enzima, tanto en el sitio activo o cerca del mismo, así como entre el producto **51** y el complejo enzima-sustrato (enzima-*p*NPG), (Copeland *et al.*, 2000). En este último caso la unión del inhibidor no afecta la unión con el sustrato. El ajuste ($R^2=0.8525$) permitió calcular los valores de la constante de inhibición (k_i) de $2.78 \mu\text{M}$ y α de 0.36 , en comparación con la k_i de la acarbosa, que es de $260 \mu\text{M}$ y se comporta como inhibidor de tipo competitivo (Escandón-Rivera *et al.*, 2012).

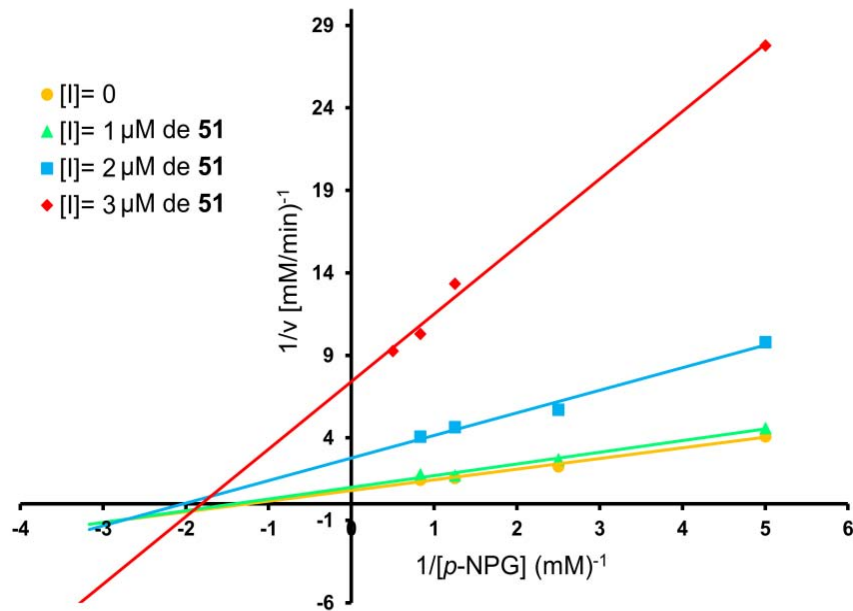


Figura 20. Gráfica de Lineweaver-Burk del compuesto **51**.

La cinética enzimática de la corimbiferona (**44**) ($k_i=163.8 \mu\text{M}$; $\alpha=1.624$) y la preusocromona C (**52**) ($k_i=52.15 \mu\text{M}$; $\alpha=1.746$), indicó que se comportan como inhibidores mixtos con un ajuste R^2 de 0.9168 y 0.8649 respectivamente (**Figura 21 y 22**).

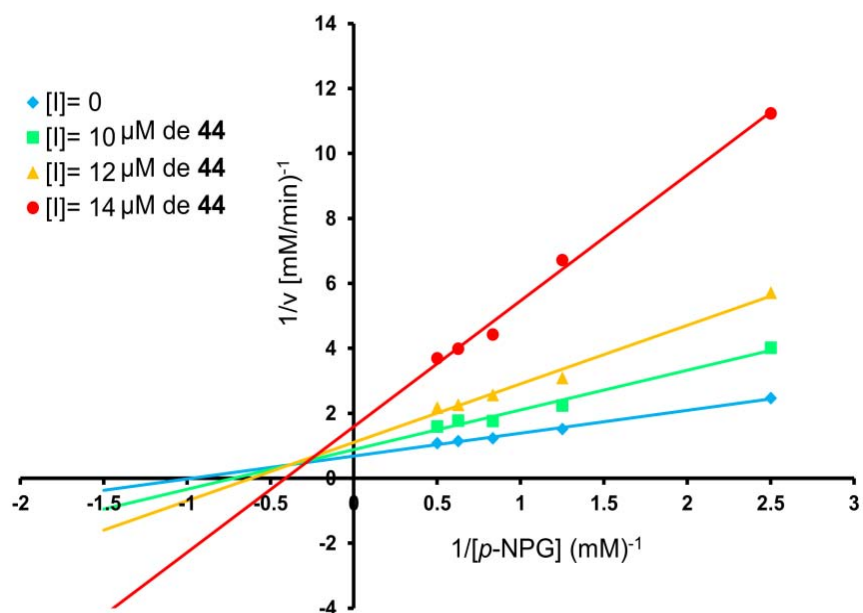


Figura 21. Gráfica de Lineweaver-Burk del compuesto 44.

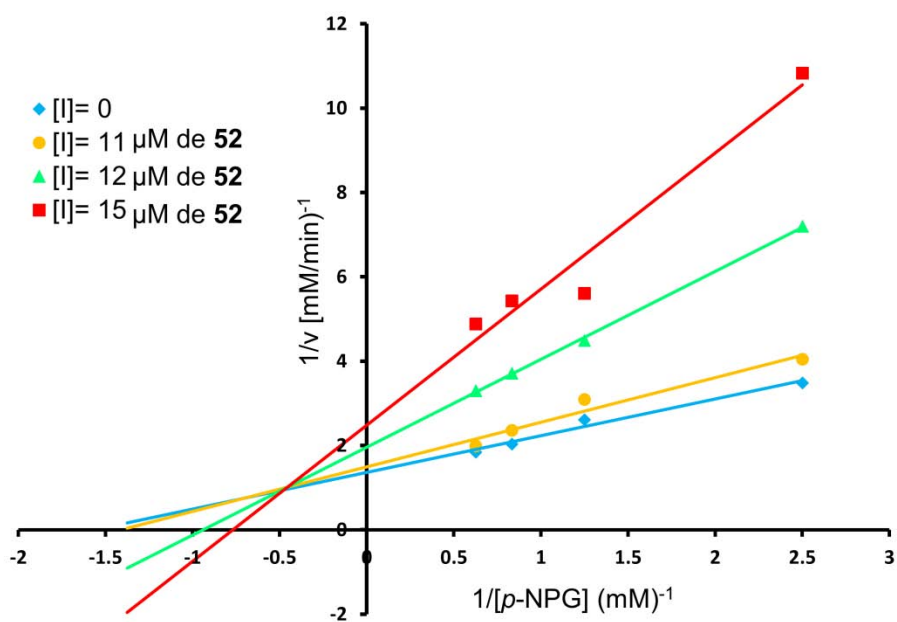


Figura 22. Gráfica de Lineweaver-Burk de la preusocromona C (52).

6.3. Estudios de Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular es un método computacional que permite el análisis teórico de la unión entre ligandos potenciales (generalmente moléculas pequeñas) y blancos macromoleculares (proteínas o enzimas) de estructura conocida. Así, es factible estimar teóricamente la asociación ligando-proteína utilizando una parametrización energética con la cual se obtienen constantes de unión o afinidad (k_i). La técnica permite también predecir el sitio idóneo de unión molecular entre el ligando y la macromolécula. También permite pronosticar la orientación y la afinidad de unión de fármacos potenciales a blancos moleculares, generalmente receptores, de interés terapéutico. Esta técnica involucra el uso de uno o más algoritmos de búsqueda específica, basados en simulaciones moleculares complejas para obtener la conformación optimizada de la proteína con su ligando que presente la menor energía libre total.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando la estructura cristalizada de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, obtenida del Protein Data Bank (código 3A4A). Para ello, se optimizaron geoméricamente las estructuras de los diferentes ligandos a estudiar por medio del programa HyperChem 8.0; posteriormente, se encontraron los sitios de interacción más favorables con la enzima de acuerdo a diferentes factores energéticos empleando el programa AutoDock Vina y AutoDock 4.2. Para cada ligando analizado fue posible obtener los sitios de interacción principales (grupos totales), la energía libre de unión estimada (EFEB, kcal/mol), la constante de inhibición estimada (k_i), así como los residuos con los que interactúa y tipo de enlaces (ej. enlaces de hidrógeno o uniones de tipo electrostáticas).

El análisis de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) se realizó evaluando los dos posibles enantiómeros, el **S** y el **R**. El análisis predijo que el compuesto **51-S** se une al sitio catalítico de la enzima formando enlaces de hidrógeno con Ser-240, His-280 y Gln-353, este

compuesto fue el que presentó la menor energía y k_i teórica. El compuesto **51-R** se une en un sitio alostérico de la enzima formando enlaces de hidrógeno con los aminoácidos Lys-373 y Lys-568. Los resultados concuerdan con los de la cinética enzimática, ya que el producto se comportó como un inhibidor mixto. Por otro lado, el estudio de acoplamiento molecular para la preusocromona C reveló que este compuesto se puede unir en un sitio alostérico (Anaya-Eugenio *et al.*, 2014) formando enlaces de hidrógeno con la Ile-272 y la Thr-274, este sitio es diferente al sitio de unión del confórmero **51-R**. Finalmente, el esquema resultante de la interacción del producto **44** con la enzima, indicó que el compuesto forma enlaces de hidrógeno con la Thr-274 y la Ser-298, y que se puede unir en el mismo sitio de la preusocromona C (**52**), en concordancia con su gran similitud estructural. Cabe mencionar, que la preusocromona C (**52**) presentó una menor energía de enlace que la corimbiferona (**44**) lo cual podría atribuirse al mayor número de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno entre la primera y la enzima.

Tabla 7. Resultados del ensayo de acoplamiento molecular.

Compuesto	Energía Docking (kcal/mol)		K _i Teórico (μ M)	K _i Experimental (μ M)
	Ciego	Refinado (Vina/AutoDock)		
Isomero 51-R	-7.3	-7.7/-6.5	16.69	2.78
Isómero 51-S	-10.3	-10.4 / -7.7	2.53	2.78
Preusocromona C (52)	-7.9	-8.0 / -6.89	8.97	52.15
Corimbiferona (44)	-7.6	-7.6 / -6.61	14.16	163.8
Acarbosa (6)	-9.2	-9.9 / -8.9	0.322	876.9

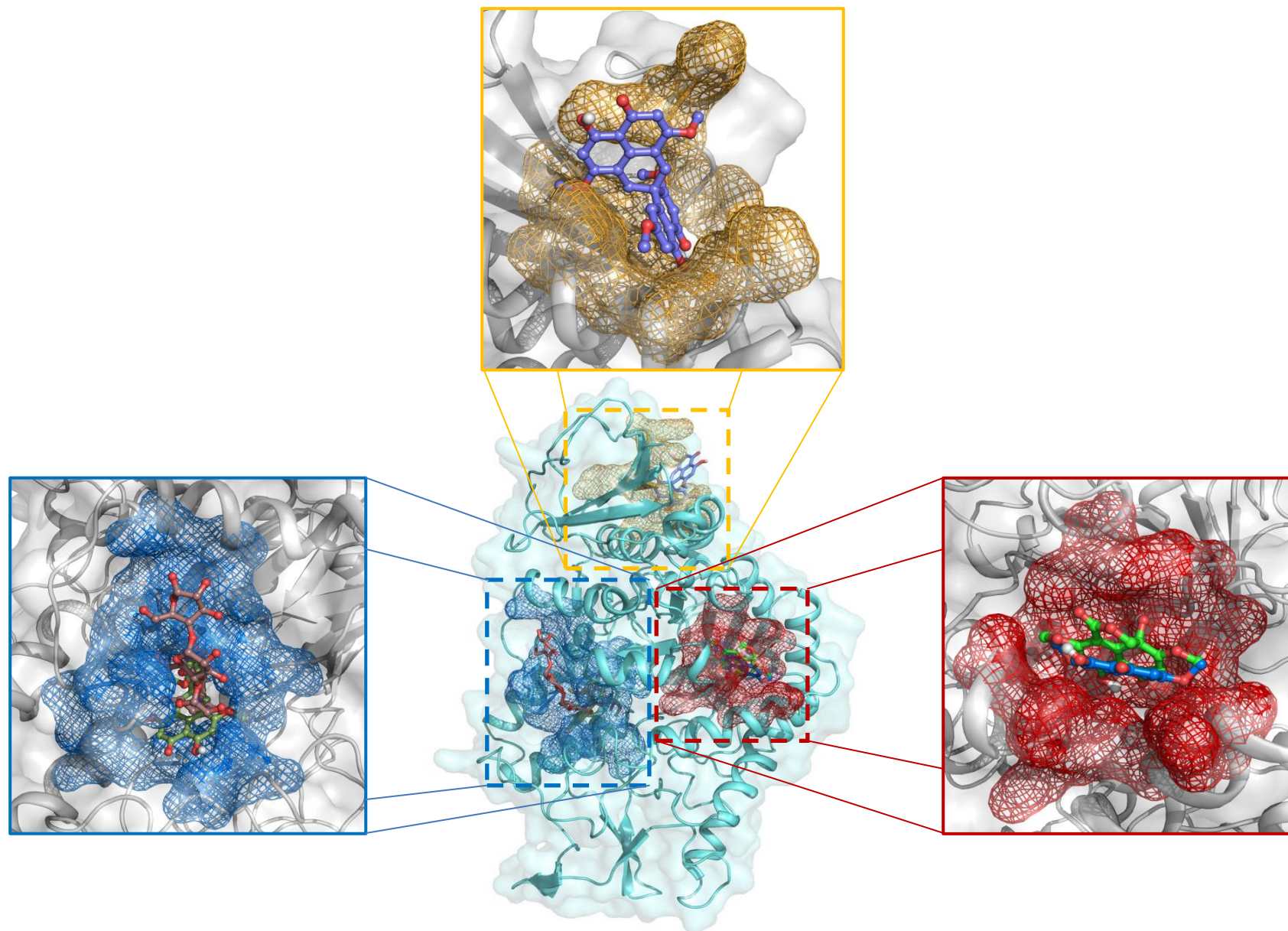


Figura 23. Resultados del análisis por Docking, en azul el sitio catalítico donde se une la acarbosa (**6**) y el isomero **51-S**, en rojo el sitio alostérico de unión de la corimbiferona (**44**) y la preusocromona C (**52**) y en amarillo el sitio alostérico del isomero **51-R**.

Tabla 8. Principales interacciones entre los metabolitos aislados y la enzima α -glucosidasa.

Compuesto	Interacciones hidrofóbicas	Enlace de hidrógeno	Distancia de enlace (Å)
Isomero 51-R	Pro488, Asn493, Phe494, Glu497, Phe563, Gly564, Tyr566, Lys569	Lys373 Lys568	2.95 (N-H \cdots O=C) 3.12 (N-H \cdots OCH ₃)
Isómero 51-S	Tyr158, Phe159, Phe178, Asp242, Gln279, Phe303, Asp307, Phe314, Arg315, Tyr316, Asp352, Asn415	Ser240 His280 Gln353	3.14 (HO \cdots H-O) 3.27 (N-H \cdots OCH ₃) 2.76 (C=O \cdots H-O)
Preusocromona C (52)	Trp15, Asn259, Ile262, Arg263, Glu271, Ala292, Glu296, Leu297, Ser298	Ile272 Ile272 Thr274	2.95 (C=O \cdots HO) 3.30 (N-H \cdots OH) 2.76 (N-H \cdots OH)
Corimbiferona (44)	Asn259, Ile262, Arg263, Ile272, His295, Glu296, Leu297	Thr274 Ser298	2.70 (O-H \cdots O=C) 2.81 (O-H \cdots O=C)
Acarbosa (6)	Tyr158, Asp242, Gln279, Phe303, Asp307, Val308, Ser311, Pro312, Arg315, Asp325, Ala329	His280 Ser304 Thr310	3.28 (N-H \cdots OH) 3.04 (HO \cdots H-O) 2.69 (O-H \cdots OH)

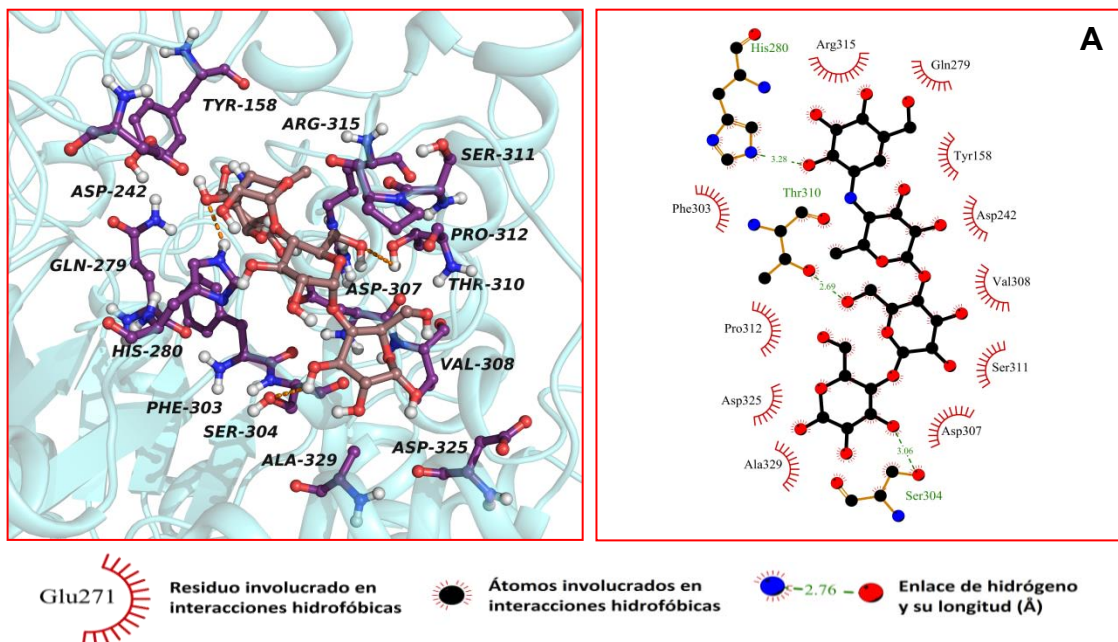


Figura 24. Análisis de las interacciones enzima-ligando en 2D y 3D de la acarbosa (**6**, **A**), isomero **51-S** (**B**), isomero **51-R** (**C**), preusocromona C (**52**, **D**) y corimbiferona (**44**, **E**).

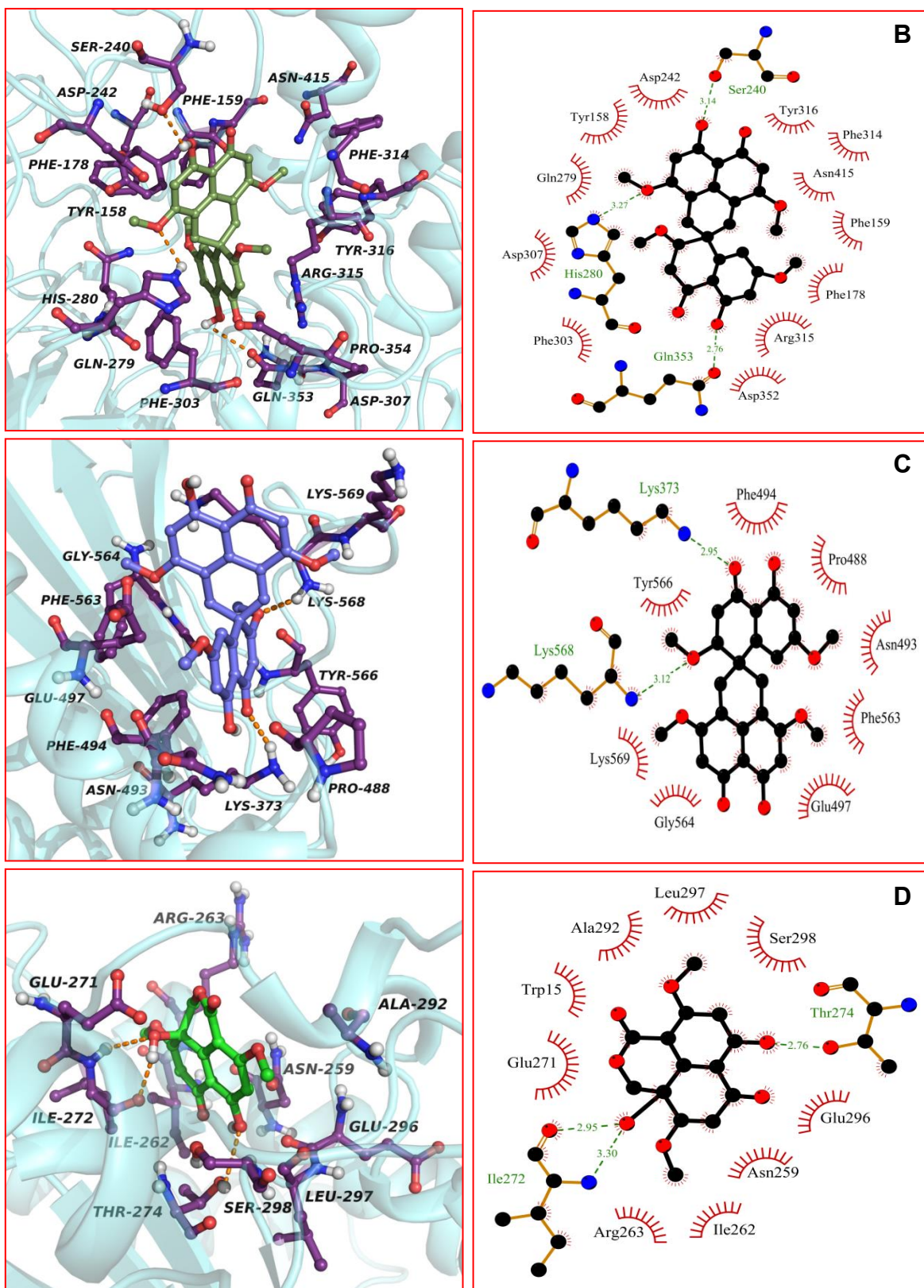


Figura 24. Análisis de las interacciones enzima-ligando en 2D y 3D de la acarbosa (**6**, **A**), isomero **51-S** (**B**), isomero **51-R** (**C**), preusocromona C (**52**, **D**) y corimbiferona (**44**, **E**) (continuación).

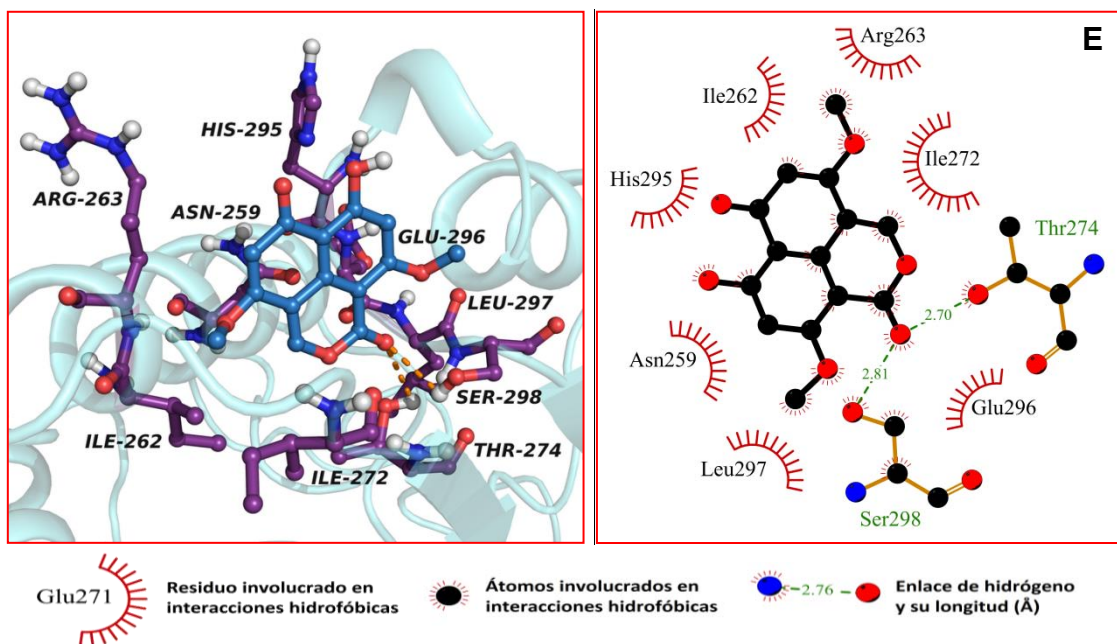


Figura 24. Análisis de las interacciones enzima-ligando en 2D y 3D de la acarbosa (**6**, **A**), isomero **51-S** (**B**), isomero **51-R** (**C**), preusocromona C (**52**, **D**) y corimbiferona (**44**, **E**) (*continuación*).

7. CONCLUSIONES

- Durante el estudio para obtener nuevos inhibidores de las α -glucosidasas del extracto orgánico de *Sporormiella minimoides* se aisló un producto con un esqueleto carbonado novedoso; el producto se identificó como (*RS*)-5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**). De manera adicional se identificaron la preusocromona C (**52**), no reportado en esta especie, y la corimbiferona (**44**).
- Los compuestos aislados (**51**, **52** y **44**) son inhibidores de la enzima α -glucosidasa de levadura. Las CI_{50} calculadas fueron de 2.9 μ M, 66.5 μ M y 155 μ M, respectivamente. Los tres productos fueron más activos que la acarbosa (876.9 μ M). Los estudios de cinética enzimática permitieron caracterizar a los productos fúngicos como inhibidores de tipo mixto, con valores de k_i de 2.78 μ M y α de 0.36 para la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**), k_i de 52.15 μ M y α de 1.746 para la preusocromona C (**52**) y k_i de 163.8 μ M y α de 1.624 para la corimbiferona (**44**). Entonces, la corimbiferona y sus análogos representan nuevos prototipos de inhibidores de α -glucosidasas y por ende, nuevos agentes antihiperoglucémicos potenciales.
- De acuerdo a los estudios teóricos de acoplamiento molecular, el isómero **51-S** se podría unir al sitio catalítico de la enzima, mientras que el isómero **51-R** lo haría en un sitio alternativo. La preusocromona C y la corimbiferona se unen a un sitio cercano al sitio catalítico. El isómero **51-S** presentó la mejor afinidad y por lo tanto la menor constante de inhibición (k_i) de los productos analizados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ✿ Abbas, H.K., Duke, S.O., Merrill Jr., A.H., Wang, E., Shier, W.T. 1997. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and fumonisin B₁ to *Lemna pausicostata*. *Phytochemistry*. **47**: 1509-1514.
- ✿ Asano, N. 2003. Glucosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*. **13**(10): 93-104.
- ✿ Barros, F.A.P., Rodrigues-Filho, E. 2005. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **33**: 257-268.
- ✿ Benalla, W., Bellahcen, S., Bnouhnam, M. 2010. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current Diabetes Review*. **6**(4): 247-254.
- ✿ Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *The Journal of Antibiotics*. **58**: 1-26.
- ✿ Bergstrom, J.D., Kurtz, M.M., Rew, D.J. 1993. Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **90**: 80-84.
- ✿ Borges de Melo, E., Silveira, G.A., Carvalho, I. 2006. α - and β -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. **62**(44): 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. *Organic Letters*. **2**: 4043-4046.
- ✿ Brindis F., Rodríguez, R., Bye, R., Gonzalez-Andrade, M., Mata, R. 2011. (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -Glucosidase Inhibitor. *Journal of Natural Products*. **74**: 314-320.
- ✿ Bugni, T.S., Bernan, V.S., Greenstein, M., Janso, J.E., Maiese, W.M., Mayne, C.L., Ireland, C.M. 2002. Brocaenols A-C: Novel polyketides from a marine-derived *Penicillium brocae*. *Journal of Organic Chemistry*. **68**: 2014-2017.
- ✿ Butler, M.S. 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*. **22**(2): 162-195.
- ✿ Butler, M.S., Buss, A.D. 2006. Natural products-the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*. **71**(7): 919-929.
- ✿ Campbell, L.K., White, J.R., Campbell, R.K., 1996. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*. **30**(11): 1255-1262.
- ✿ Campbell, R.K., White, J.R., Saulie, B.A. 1996. Metformin: a new oral biguanide. *Clinical Therapeutics*. **18**(3): 360-371.
- ✿ Cao, L., Huang, J., Li, J. 2007. Fermentation conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* endophytic fungus on production of podophyllotoxin. *Food and Fermentation Industries*. **33**: 28-32.

- ✿ Chakravarthi, B.V.S.K., Das, P., Surendranath, K., Karande, A.A., Jayabaskaran, C. 2008. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *Journal of Biosciences*. **33**: 259-267.
- ✿ Cheng, L., Ma, Q., Tao, G., Tao, W. 2007. Systemic identification of a paclitaxel-producing endophytic fungus. *Industrial Microbiology*. **37**: 23-30.
- ✿ Chiba, S. 1997. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **61**(8): 1233-1239.
- ✿ Chin, D., Means, A.R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*. **10**: 322-328.
- ✿ Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Kengtong, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P. 2009. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry*. **70**: 407-413.
- ✿ Clapp-Shapiro, W.H., Burgess, B.W., Giacobbe, R.A., Harris, G.H., Mandala, S., Polishook, J., Rattray, M., Thornton, R.A., Zink, D.L., Cabello, A., Diez, M.T., Martin, I., Pelaez, F. Antifungal agent from *Sporormiella minimoides*. U.S. Patent 5,801,172, September, 1998.
- ✿ Copeland, R.A. 2000. *Enzymes, A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2 ed. Wiley-VCH. New York. 129-135.
- ✿ Dewick, P.M. 2002. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 2 ed. John Wiley & Sons Ltd. University of Nottingham, UK.

- ✿ Eyberger, A.L., Dondapati, R., Porter, J.R. 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*. **69**: 1121-1124.
- ✿ Flores Bocanegra, L.C. 2013. Inhibidores de α -glucosidasas de *Vauquelinia corymbosa*. Tesis De Maestría. Facultad De Química.
- ✿ Gangadevi, V., Murugan, M., Muthumary, J. 2008. Taxol derermination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a fungal endophyte of a medicinal plant. *Chinese Journal of Biotechnology*. **24**: 1433-1438.
- ✿ Gangadevi, V., Muthumary, J. 2009. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **52**: 9-15.
- ✿ 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**(2): 137-49.
- ✿ Guo, B.H., Wang, Y.C., Zhou, X.W., Hu, K., Tan, F., Miao, Z.Q., Tang, K.X. 2006. An endophytic taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *African Journal of Biotechnology*. **5**: 875-877.
- ✿ Guo, S., Jiang, B., Su, Y., Liu, S., Zhang, L. 2004. Podophyllotoxin and its analogues from the endophytic fungi derivatived from *Dysosma veitchii*. *Biotechnology*. **14**: 55-57.
- ✿ Guo, B., Li, H., Zhang, L. 1998. Isolation of the fungus producing vinblastine. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*. **20**: 214-215.

- ✿ Harper, J.K., Arif, A.M., Ford, E.J., Strobel, G.A., Porco, J.A., Tomer, D.P., O'Neill, K.L., Grant, D. M. 2003. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*. **59**: 2471-2476.
- ✿ Harris, G.H., Dufresne, C.; Joshua, H., Koch, L.A., Zink, D.L., Salmon, P.M., Goklen, K.E., Kurtz, M.M., Rew, D.J., Bergstrom, J.D., Wilson, K.E. 1995. Isolation, Structure Determination and Squalene Synthase Activity of L-731,120 and L-731,128, Alkyl Citrate Analogs of Zaragozaic Acids A and B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **5**: 2403-2408.
- ✿ He, J., Lion, U., Sattler, I., Gollmick, F.A., Grabley, S., Cai, J., Meiners, M., Schunke, H., Shaumann, K., Dechert, U., Krohn, M. 2005. Diastereomeric Quinolinone Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium janczewskii*. *Journal of Natural Products*. **68**:1397-1399.
- ✿ 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.
- ✿ Hiort, J., Maksimenka, K., Reichart, M., Peroviae-Ottstadt, S., Lin, W.H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., Ebel, R., Müller, W.E.G., Bringmann, G. 2004. New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*. **67**: 1532-1543.
- ✿ Hormazahal, E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C.Z. 2005. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Hohn, an Endophytic Fungus of *Pilgerodendron uviferum*. *Zeitschrift für Naturforschung*. **60C**: 11-21.

- ✿ Hu, K., Tan, F., Tang, K., Zhu, S., Wang, W. 2006. Isolation and screening of endophytic fungi synthesizing taxol from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Journal of Southwest China Normal University* (Natural Science Edition). **31**: 134-137.
- ✿ Huey, R., Morris, G.M., Olson, A.J., Goodsell, D.S. 2007. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*. **28**(6): 1145-1152.
- ✿ Israili, H.Z. 2011. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Therapeutics*. **18**: 117-152.
- ✿ Jara Albarrán, A., Calle Blasco, H., Iglesias Lozano, P. 2011. *Terapia farmacológica en la diabetes mellitus tipo 2. Endocrinología*. 2 ed. Médica Panamericana. Madrid. 752-762.
- ✿ Kang, W., Song, Y., Gu, X. 2012. α -Glucosidase inhibitory *in vitro* and antidiabetic activity *in vivo* of *Osmanthus fragrans*. *Journal of Medicinal Plants Research*. **6**(14): 2850-2856.
- ✿ Kim, S.U., Strobel, G.A., Ford, E. 1999. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **42**: 97-99.
- ✿ Kinoshita, K., Sasaki, T., Awata, M., Takada, M., Yaginuma, S. 1997. Structure of sporostatin (M5032), an inhibitor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *Journal of Antibiotics*. **50**: 961-964.

- ✿ Kour, A., Shawl, A.S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P.H., Suden, P., Khajuria, R.K., Verma, V. 2008. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **24**: 1115-1121.
- ✿ Krohn, K., Flörke, U., John, M., Root, N., Steingröver, K., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M., Zsila, F. 2001. Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron*. **57**: 4343-4348.
- ✿ Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. 2011. α -Glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Review*. **5**(9): 19-29.
- ✿ Kumaran, R.S., Muthumary, J., Hur, B.K. 2008. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the Angiosperm *Citrus medica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **106**: 103-106.
- ✿ Kumaran, R.S., Muthumary, J., Kim, E.K., Hur, B.K. 2009. Production of taxol from *Phyllosticta dioscoreae*, a leaf spot fungus isolated from *Hibiscus rosa-sinensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **14**: 76-83.
- ✿ Kusari, S., Zühlke, S., Spiteller, M. 2009. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products*. **72**: 2-7.

- ✿ Leyte-Lugo, M.A. 2013. Especies selectas de hongos endófitos como fuentes potenciales de inhibidores de la calmodulina de utilidad para el desarrollo de fármacos y/o herramientas de investigación. Tesis De Doctorado. Facultad de Química.
- ✿ Leyte-Lugo, M., Figueroa, M., González, M.C., Glenn, A.E., González-Andrade, M., Mata, R. 2013. Metabolites from the entophytic fungus *Sporormiella minimoides* isolated from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **96**: 273-278.
- ✿ Li, C.T., Li, Y., Wang, Q.J., Sung, C.K. 2008. Taxol production by *Fusarium arthrosporioides* isolated from yew, *Taxus cuspidata*. *Journal of Medicinal Chemistry*. **27**: 454-458.
- ✿ Li, J.Y., Strobel, G.A. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*. **57**: 261-265.
- ✿ Li, J.Y., Sidhu, R.S., Ford, E.J., Long, D.M., Hess, W.M., Strobel, G.A. 1998. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **20**: 259-264.
- ✿ Liang-Dong, G., Guo-Rui, H., Yu, W. 2008. Seasonal and Tissue Age Influences on Endophytic Fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*. **50**: 997-1003.
- ✿ Liu, K., Ding, X., Deng, B., Chen, W. 2009. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*. **36**: 1171-1177.

-
- ✿ Lu, L., He, J., Yu, X., Li, G., Zhang, X. 2006. Studies on isolation and identification of endophytic fungi strain SC13 from harmaceutical plant *Sabina vulgaris* ant. and metabolites. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*. **15**: 85-89.
- ✿ Madariaga Mazón, A. 2008. Malbrancheamida C, un nuevo alcaloide de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* Sieglar & Carmichel. Tesis De Maestría. Facultad de Química.
- ✿ Mandala, S.M., Thornton, R.A. Frommer, B.R., Curotto, J.E., Rozdilsky, W., Kurtz, M.B., Giacobbe, R.A., Bills, G.F., Cabello, M.A., Martín, I., Peláez, F., Harris, G.H. 1994. Discovery of Australifungin, a Novel Inhibitor of Sphinganine TV-Acyltransferase from *Sporormiella australis* Producing Organism, Fermentation, Isolation, and Biological Activity. *Journal of Antibiotics*. **48**: 349-356.
- ✿ Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I. 2013. Mexican antidiabetics herbs: valuable source of inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products*. **76**: 468-483.
- ✿ Miao, Z., Wang, Y., Yu, X., Guo, B., Tang, K. 2009. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **45**: 81-86.
- ✿ Min, C., Wang, X. 2009. Isolation and identification of the 10-hydroxycamptothecin-producing endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* Decne. *Acta Botanica Boreali- Occidentalia Sinica*. **29**: 614-617.

- ✿ Mohamed E.I., Bushra, E., Nur, E., Choudhary, M.I., Khan, S.N. 2009. Bioactive natural products from two sudanese medicinal plants *Doispyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*. *Records of Natural Products*. **3**(4): 198-203.
- ✿ Moorthy, N.S.H.N., Ramos, M.J., Fernandes, P.A. 2012. Studies on α -glucosidase inhibitors development: Magic molecules for the treatment of carbohydrate mediated diseases. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. **12**(8): 1-8.
- ✿ 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**(14): 1639-1662.
- ✿ Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. **30**(16): 2785-2791.
- ✿ Mudur, S.V., Gloer, J.B., Wicklow, D.T. 2006. Sporminarins A and B: Antifungal Metabolites from a Fungicolous Isolate of *Sporormiella minimoides*. *Journal of Antibiotics*. **59**: 500-506.
- ✿ 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.
- ✿ Nathan, D.M. 2007. Finding new treatments for diabetes — How Many, How Fast ... How Good? *The New England Medicine*. **40**: 356-437.

- ✿ Newman, D.J., Cragg, G.M. 2004. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Current Medicinal Chemistry*. **11**(13): 1693-1713.
- ✿ Norma Oficial Mexicana. **NOM-015-SSA2-2010**, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- ✿ Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase, inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: 550-553.
- ✿ Organización Mundial de la Salud, 2012. Página web <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>> (Acceso 14-Feb-2015).
- ✿ Overy, D.P., Zidorn, C., Petersen, B.O., Duus, J.Ø., Dalsgaard, P.W., Larsen, P.O., Phipps, R.K. 2005. Medium dependant production of corymbiferone a novel product from *Penicillium hordei* cultured on plant tissue agar. *Tetrahedron Letters*. **46**: 3225-3228.
- ✿ Petrini, O., Andrews, J., Hirano, S. 1991. *Fungal endophytes of tree leaves*. In: *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York Inc. 179-197.
- ✿ Pompeng, P., Sommit, D., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Matsubara, K., Pudhom, K. 2013. Antiangiogenic effects of anthranoids from *Alternaria* sp., an endophytic fungus in a Thai medicinal plant *Erythrina variegata*. *Phytomedicine*. **20**(10): 918-22.

- ✿ 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 hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin ligands. *Journal of Biotechnology*. **122**: 494-510.
- ✿ Rehman, S., Shawl, A.S., Kour, A., Andrabi, R., Sudan, P., Sultan, P., Verma, V., Qazi, G.N. 2008. An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **44**: 203-209.
- ✿ Rivera Chávez, J.A. 2009. 15-Acetil-hidrato de tajixantona, un nuevo metabolito secundario de *Emericella* 25379. Tesis De Maestría. Facultad de Química.
- ✿ 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. Cryptosporioptide: A bioactive polyketide produced by an endophytic fungus *Cryptosporiopsis* sp. *Phytochemistry*. **93**: 199-202
- ✿ Salituro, G.M., Pelaez, F., Zhang, B.B. 2001. Discovery of a Small Molecule Insulin Receptor Activator. *Recent Progress in Hormone Research*. **56**: 107-126.
- ✿ Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C. 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **21**: 27-32.
- ✿ Scully, T. 2012. Diabetes in numbers. *Nature*. **485**: 2-3.

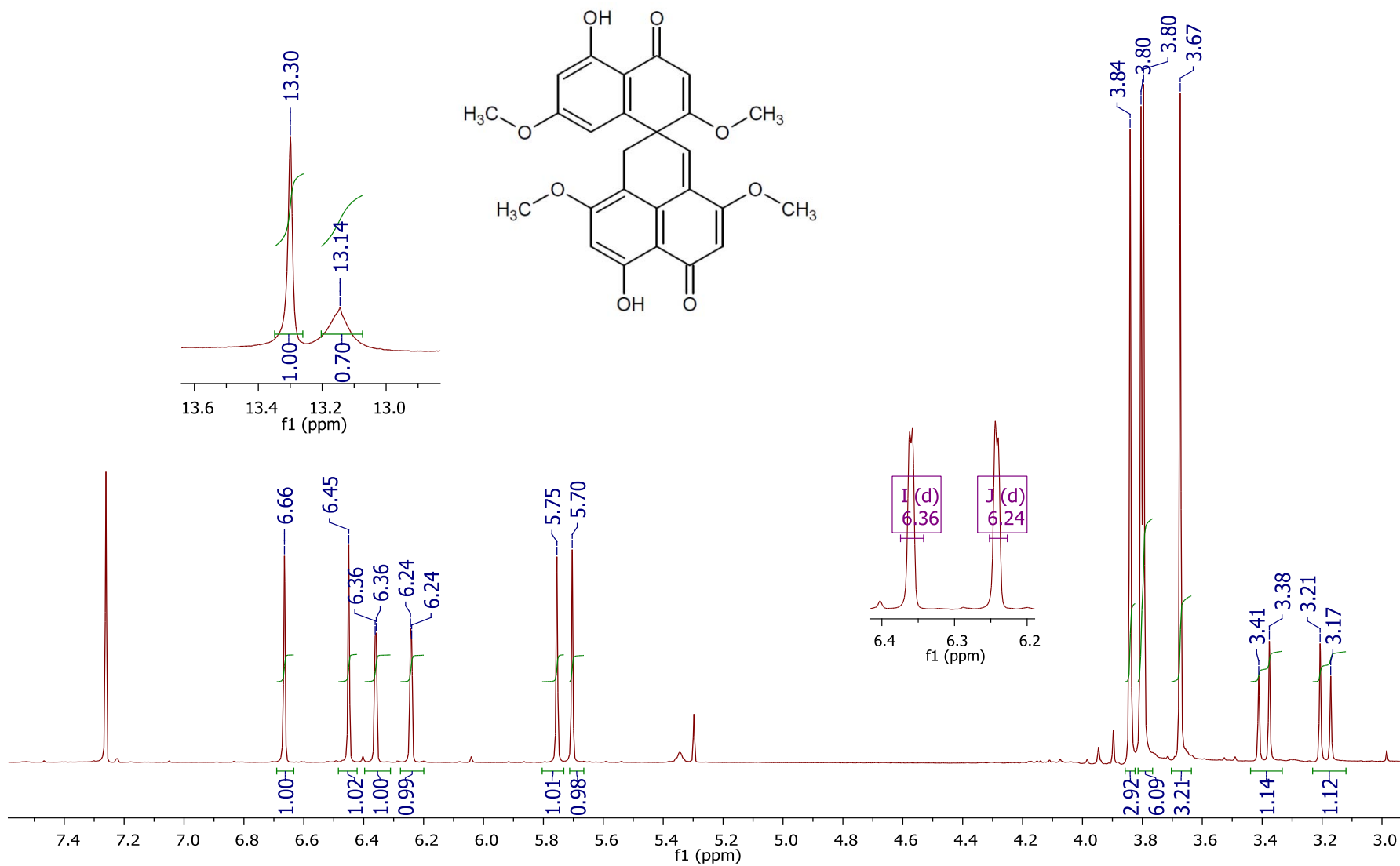
- ✿ Selim, S.A., Mousa, W.M., Mohamed, Kh.F. Ashgan, M.H., Al-Arafaj A.A., Moussa, I.M. 2012. Evaluation of the synergistic haemolytic activity of phospholipase D produced by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *African Journal of Microbiology Research*. **46**: 7306-7313.
- ✿ Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B.T., Priti, V., Mohana Kunar, P., Ravikanth, G., Spitteller, 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.
- ✿ Sneader, W. 2005. *Drug Discovery*. 1 ed. Wiley. Hoboken, USA.
- ✿ Soman, A.G., Gloer, J.B., Koster, B., Malloch, D. 1999. Sporovexins A-C and a New Preussomerin Analog: Antibacterial and Antifungal Metabolites from the Coprophilous Fungus *Sporormiella vexans*. *Journal of Natural Products*. **62**: 659-661.
- ✿ Song, Y.C., Huang, W.Y., Sun, C., Wang, F.W., Tan, R.X. 2005. Characterization of Graphislactone A as the Antioxidant and Free Radical-Scavenging Substance from the Culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an Endophytic Fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **28**: 506-509.
- ✿ Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. **260**: 214-216.
- ✿ Stone, J.K., Bacon, C.W., White, J.F. 2000. *An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined*. In: *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker. New York. 3-29.

-
- ✿ Strobel, G.A., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**: 491-502.
- ✿ Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. **5**: 535-544.
- ✿ Strobel, G.A., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. **67**: 257-268.
- ✿ Strobel, G.A., Hess, W.M., Ford, E., Sidhu, R.S., Yang, X. 1996. Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*. **17**: 417-423.
- ✿ Strobel, G.A., Hess, W.M., Li, J.Y., Ford, E., Sears, J., Sidhu, R.S., Summerell, B. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*. **45**: 1073-1082.
- ✿ Sun, D., Ran, X., Wang, J. 2008. Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiologica Sinica*. **48**: 589-595.
- ✿ Tan, R.X. & Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. **18**: 448-459.
- ✿ Tian, R., Yang, Q., Zhou, G., Tan, J., Zhang, L., Fang, C. 2006. Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Journal of Wuhan Botanical Research*. **24**: 541-545.

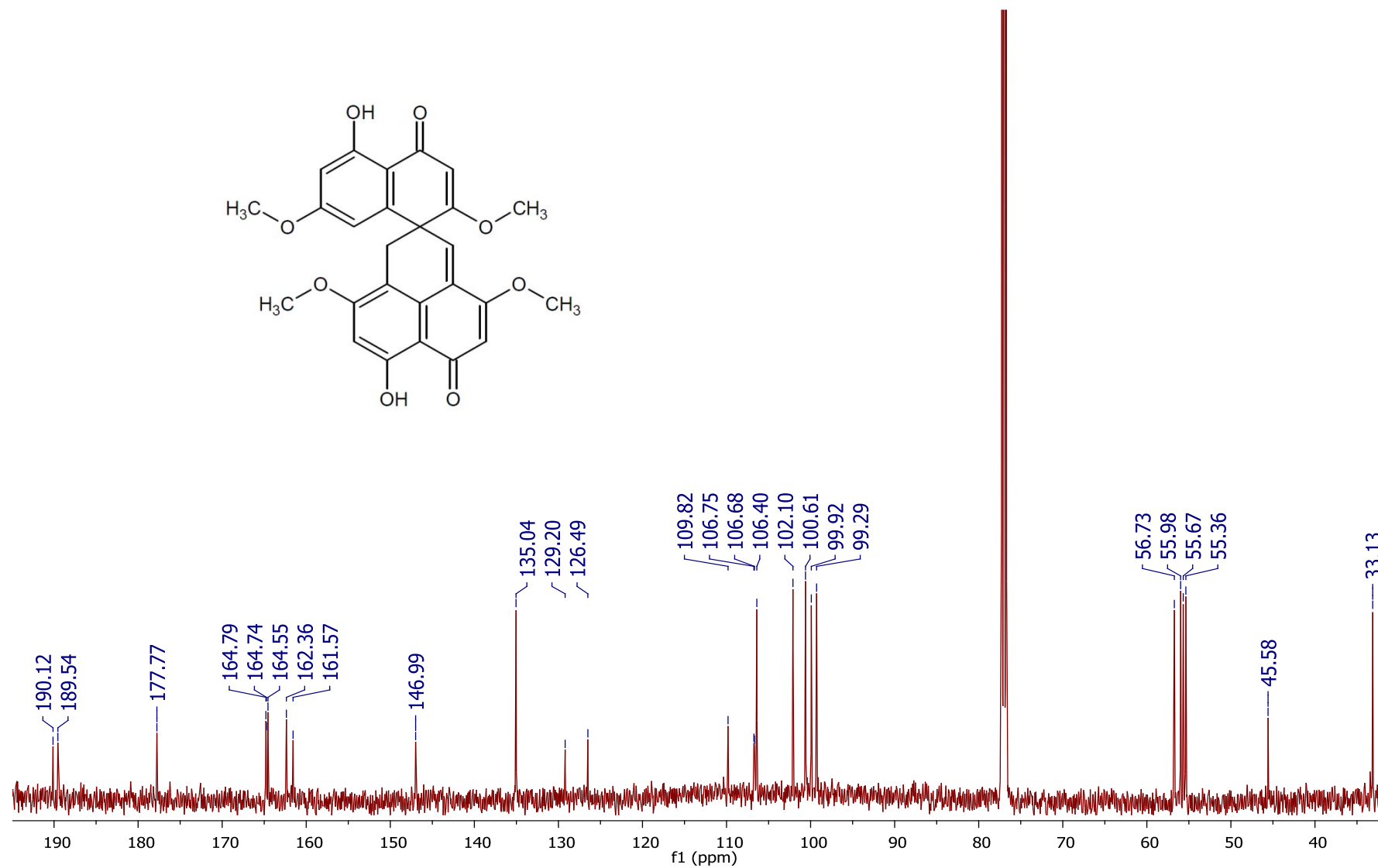
- ✿ Turbyville, T.J., Wijeratne, E.M.K., Liu, M.X., Burns, A.M., Seliga, C.J., Leuvano, L.A., David, C. L., Faeth, S.H., Whitesell, L., Gunatilaka, A.A.L. 2006. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products*. **69**: 178-184.
- ✿ Venkatachalam, R., Subban, K., Paul, M. J. 2008. Taxol from *Botryodiplodia theobromae* (BT 115)-an endophytic fungus of *Taxus baccata*. *Journal of Biotechnology*. **136**: 189-190.
- ✿ Wang, J., Huang, Y., Fang, M., Zhang, Y., Zheng, Z., Zhao, Y., Su, W. 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *Federation of European Microbiological Societies. Immunology and Medical Microbiology*. **34**: 51-57.
- ✿ Wang, Y., Xu, L., Ren, W., Zhao, D., Zhu, Y., Wu, X. 2012. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*. **19**: 364-368.
- ✿ Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczancy, S., Martino, V., Acevedo, C. 2004. Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *Journal of Antibiotics*. **57**: 559-563.
- ✿ Wicklow, D.T., Roth, S., Deyrup, S.T., Gloer, J.B. 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*. **109**: 610-618.
- ✿ Yang, T., Poovaiah, B.W. 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*. **8**: 505-512.

- ✿ Yang, X., Guo, S., Zhang, L., Shao, H. 2003. Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. *Natural Product Research and Development*. **15**: 419-422.
- ✿ Ye, Y.H., Zhu, H.L., Song, Y.C., Liu, J.Y., Tan, R.X. 2005. Structural Revision of Aspernigrin A, Reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002. *Journal of Natural Products*. **68**: 1106-1108.
- ✿ Yu, W., Liang-Dong, G. 2004. Endophytic Fungi II: New records from pine in China. *Mycosystema*. **23**: 24-27.
- ✿ Zeng, S., Shao, H., Zhang, L. 2004. An endophytic fungus producing a substance analogous to podophyllotoxin isolated from *Diphylleia sinensis*. *Journal of Microbiology*. **24**: 1-2.
- ✿ Zhang, F., Li, L., Niu, S., Si, Y., Guo, L., Jiang, X., Che, Y. 2012. A thiopyranochromenone and other chromone derivatives from an endolichenic fungus, *Preussia africana*. *Journal of Natural Products*. **75**: 230-237.
- ✿ Zhang, G., Sun, S., Zhu, T., Lin, z., Gu, J., Li, D., Gu, Q. 2011. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*. **72**: 1436-1442.
- ✿ Zhang, P., Zhou, P., Yu, L. 2009. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology*. **59**: 227-232.

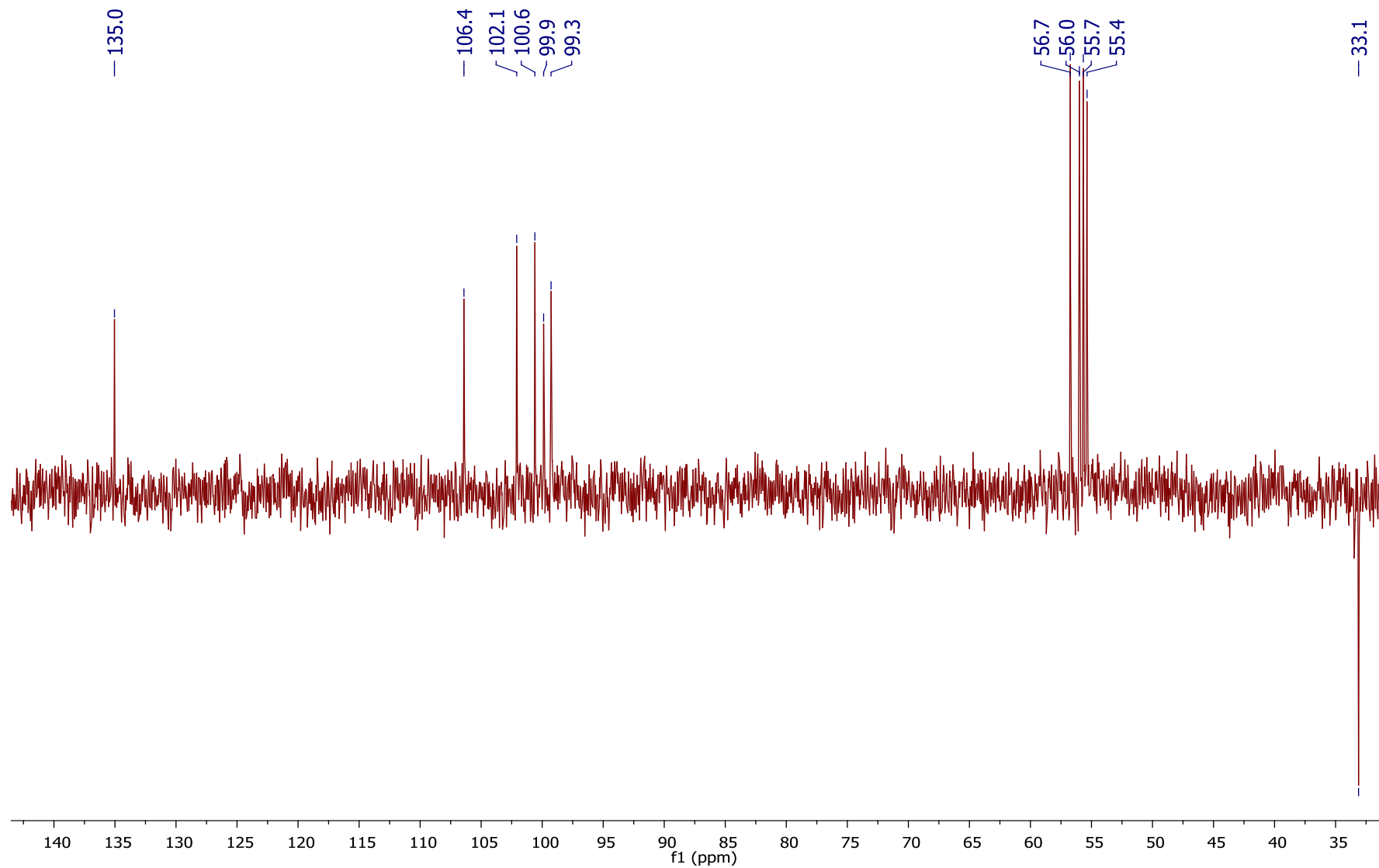
9. ANEXO



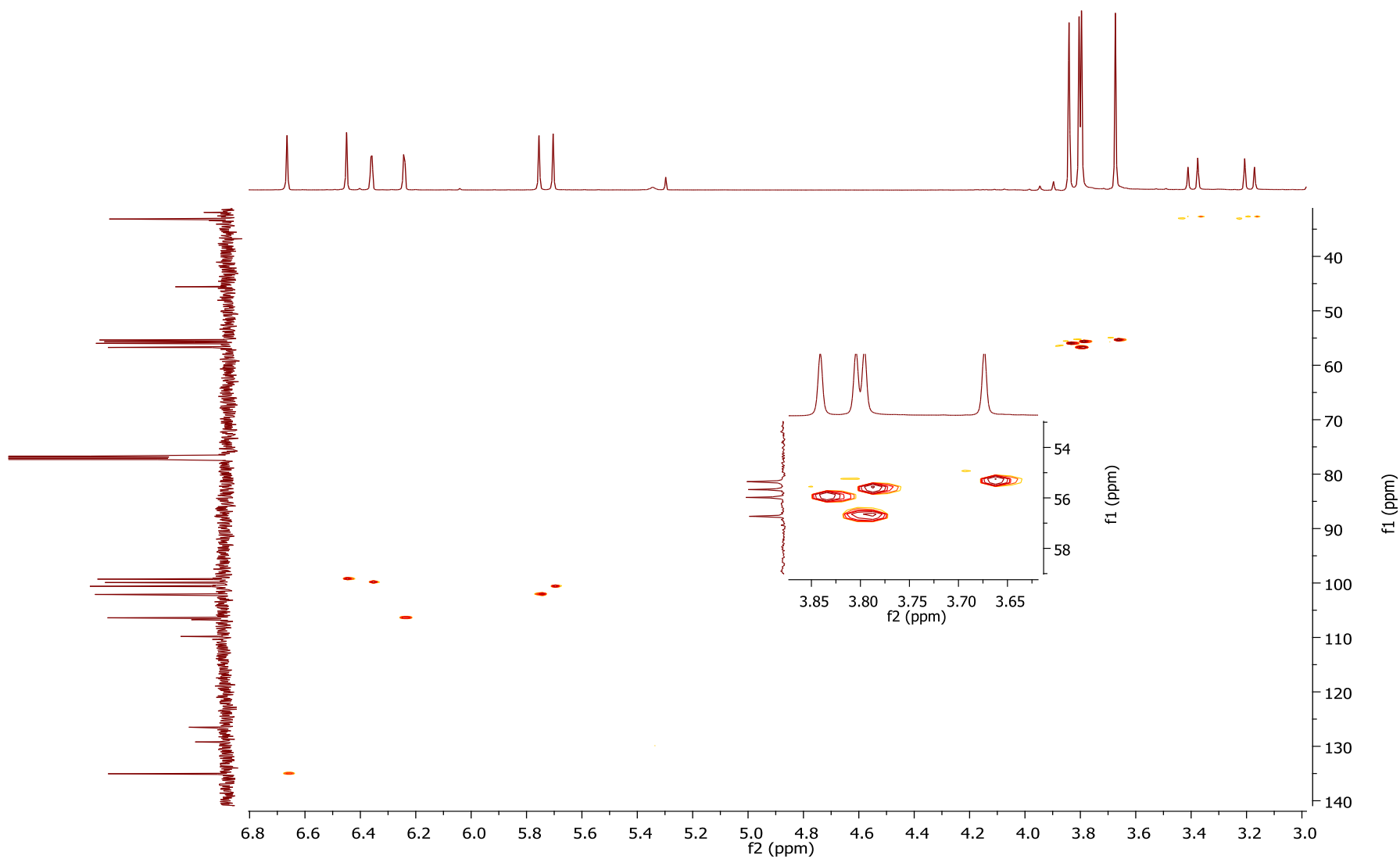
Espectro 1. Espectro de ¹H-RMN de 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fentalen]-4,6'-diona (**51**) en CDCl₃ (500 MHz).



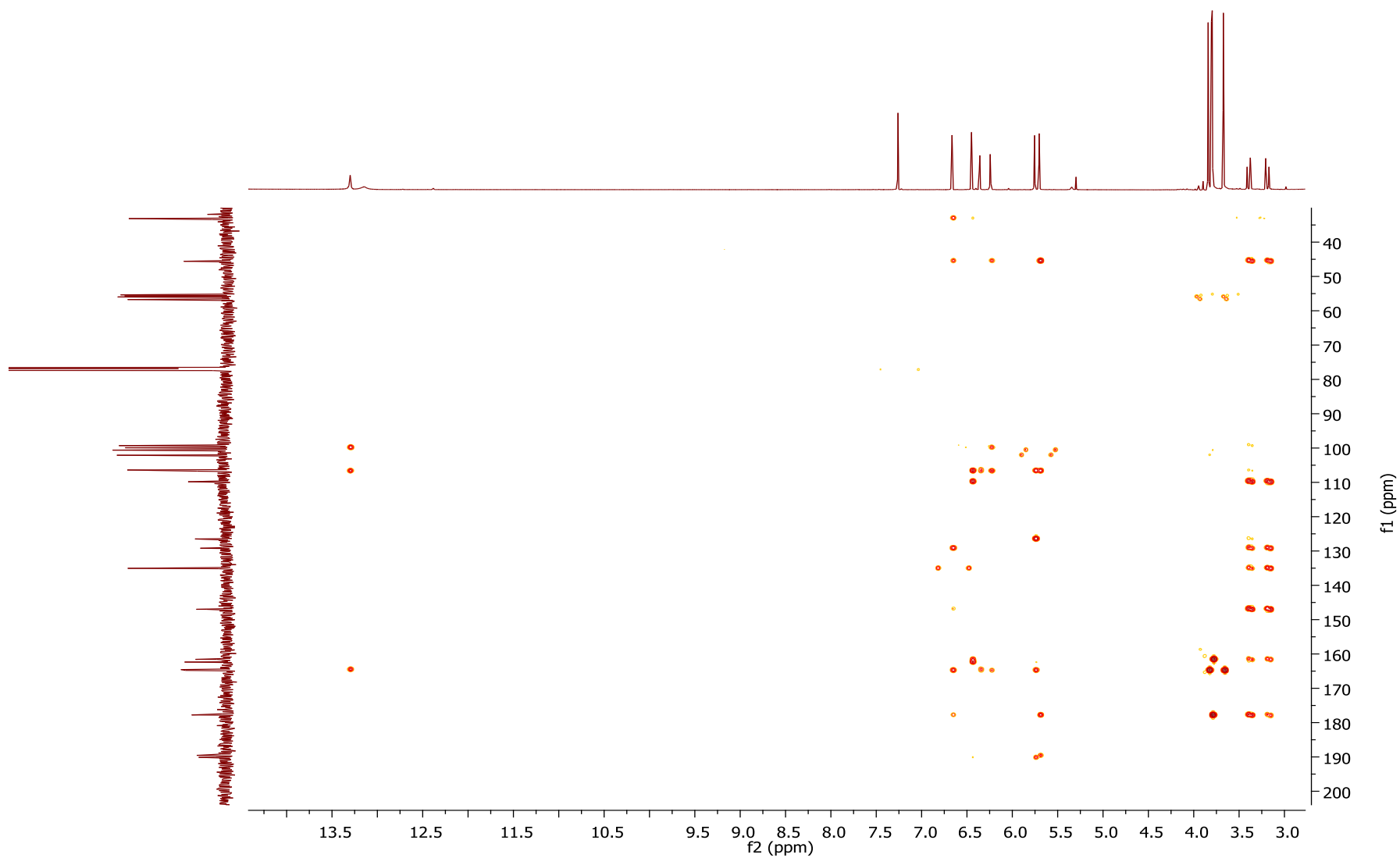
Espectro 2. Espectro de ^{13}C -RMN de 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espironaftalen-4,6'-diona (**51**) en CDCl_3 (125 MHz).



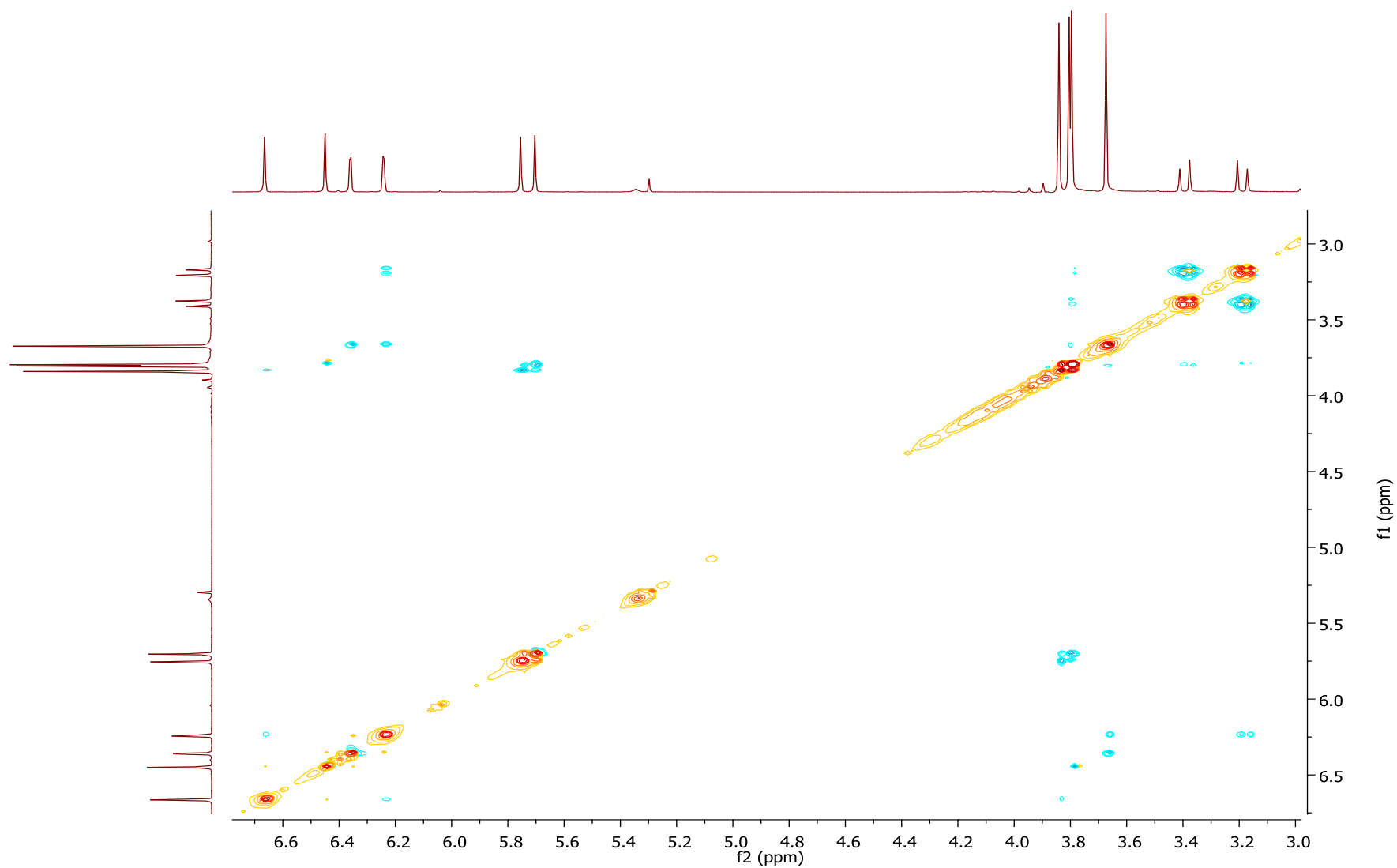
Espectro 3. Espectro de DEPT 135 de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) en CDCl_3 (125 MHz).



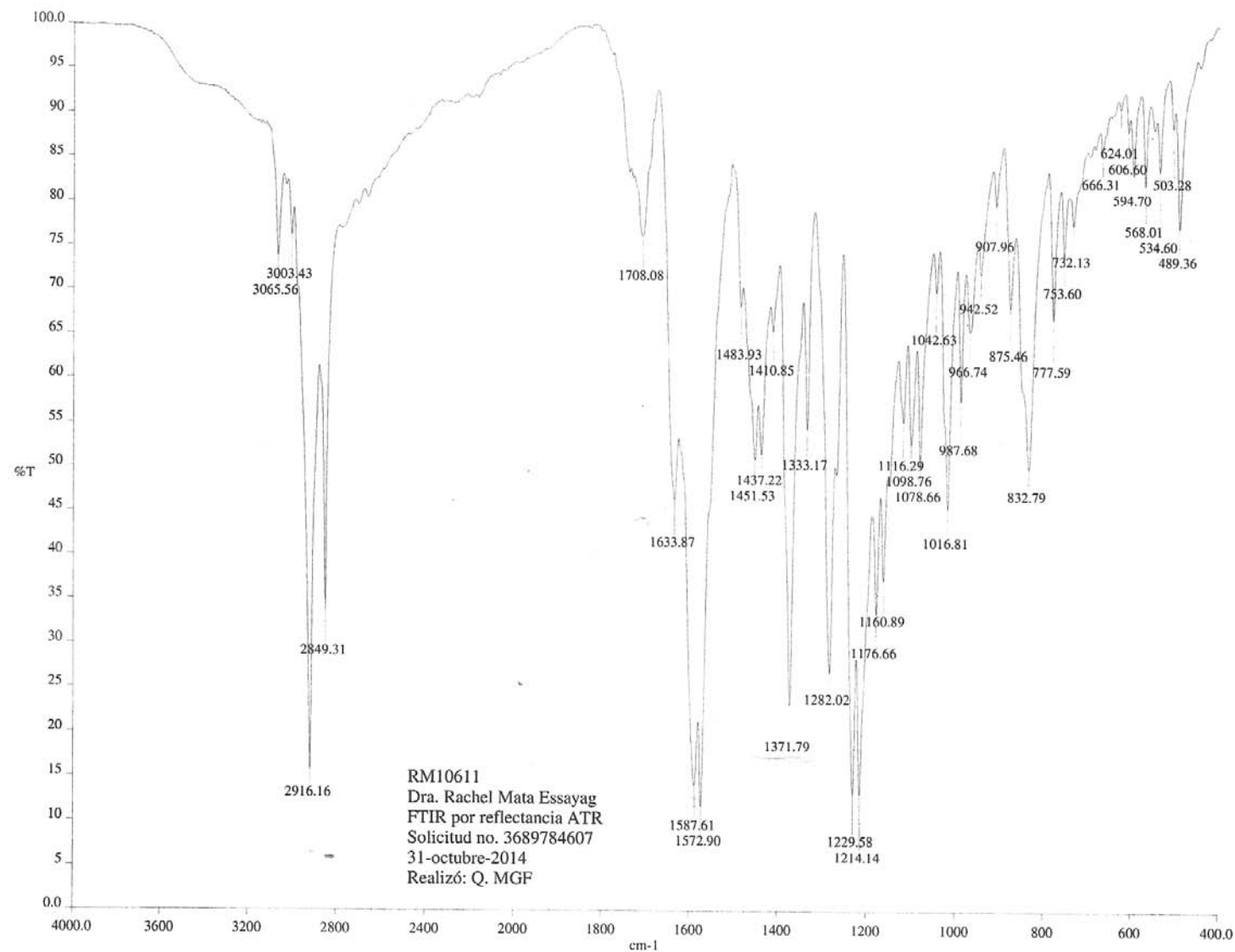
Espectro 4. Espectro HSQC de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) en CDCl_3 .



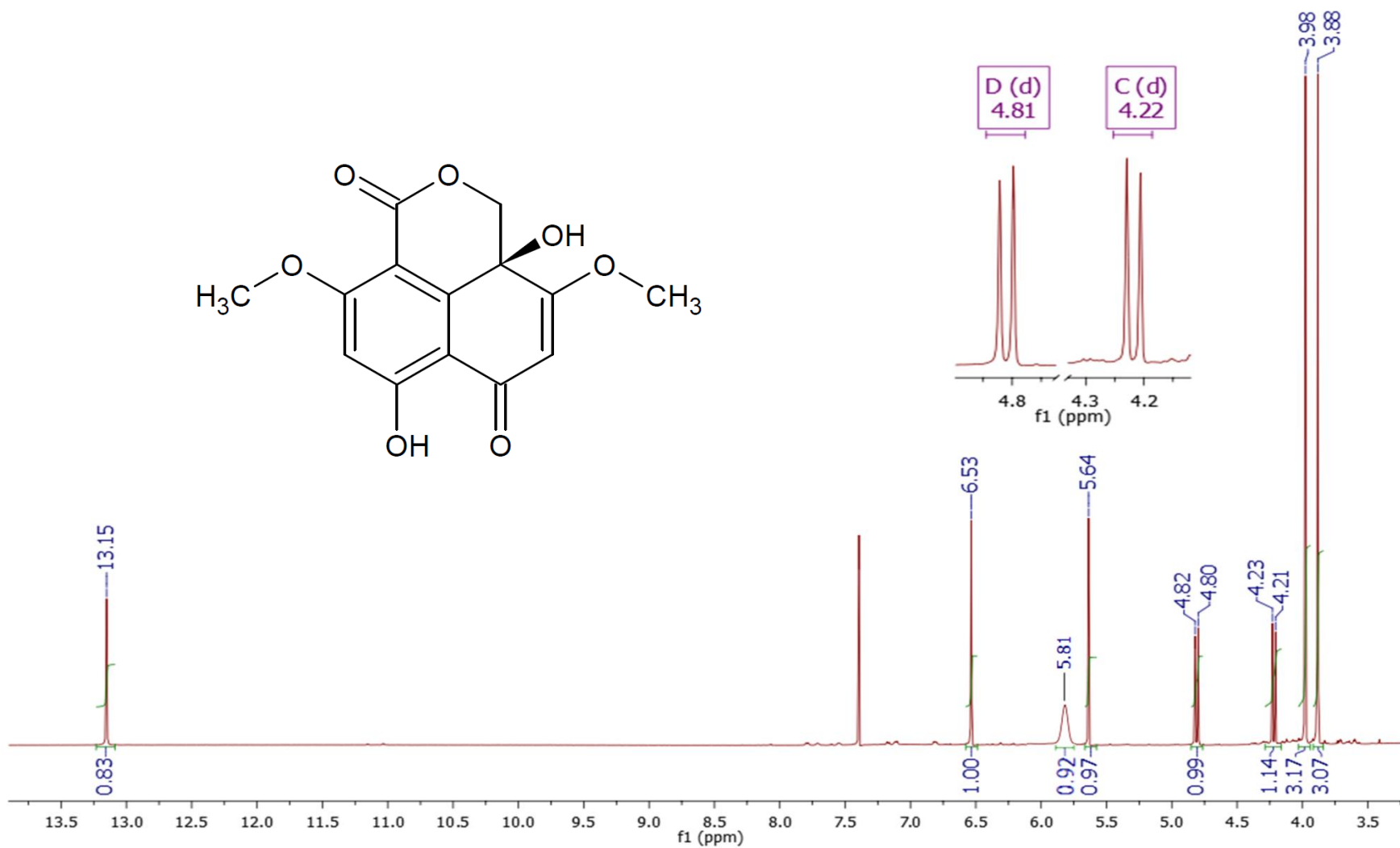
Espectro 5. Espectro HMBC de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) en CDCl₃.



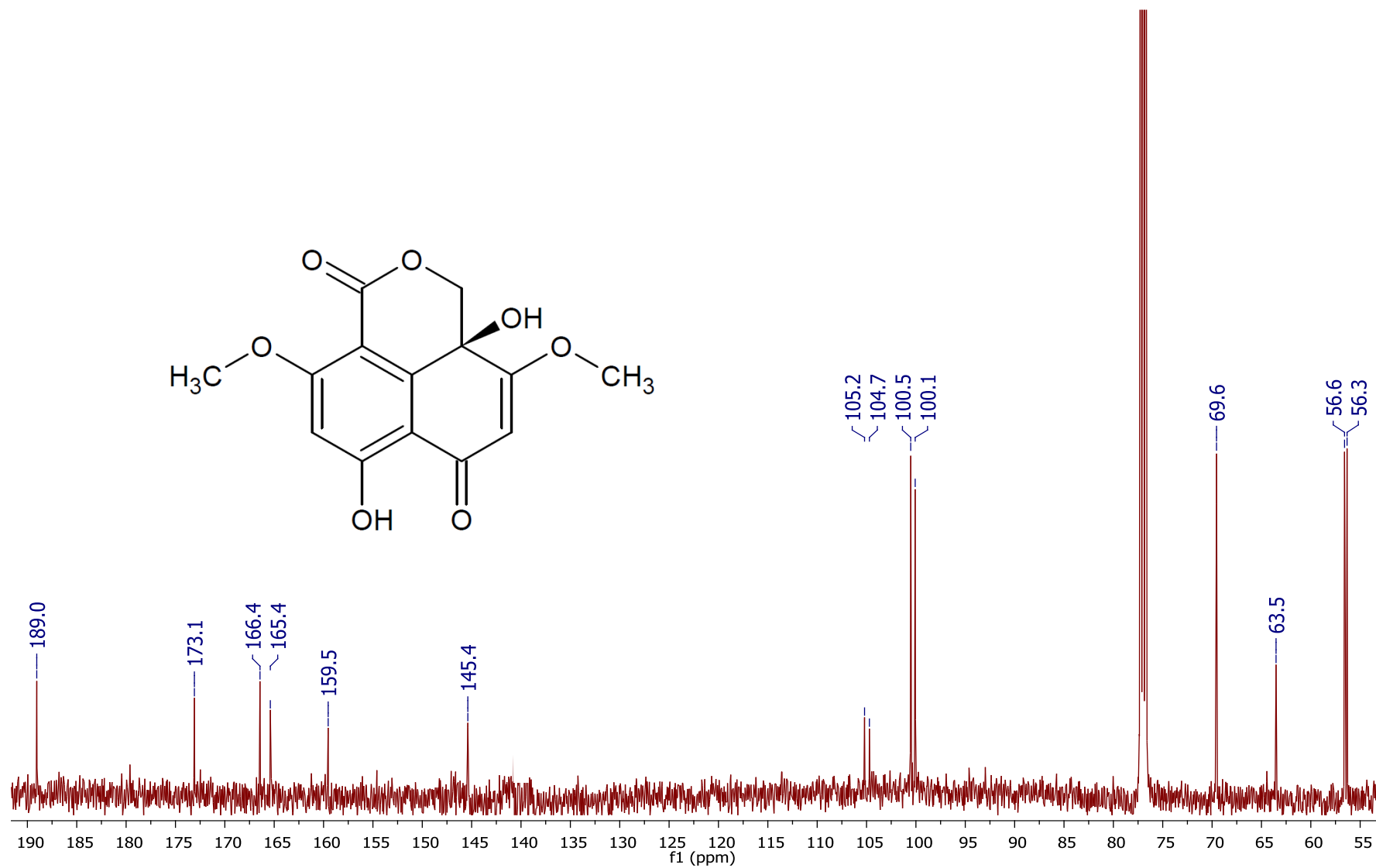
Espectro 6. Espectro NOESY de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'*H*,4*H*,6'*H*-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**) en CDCl_3 .



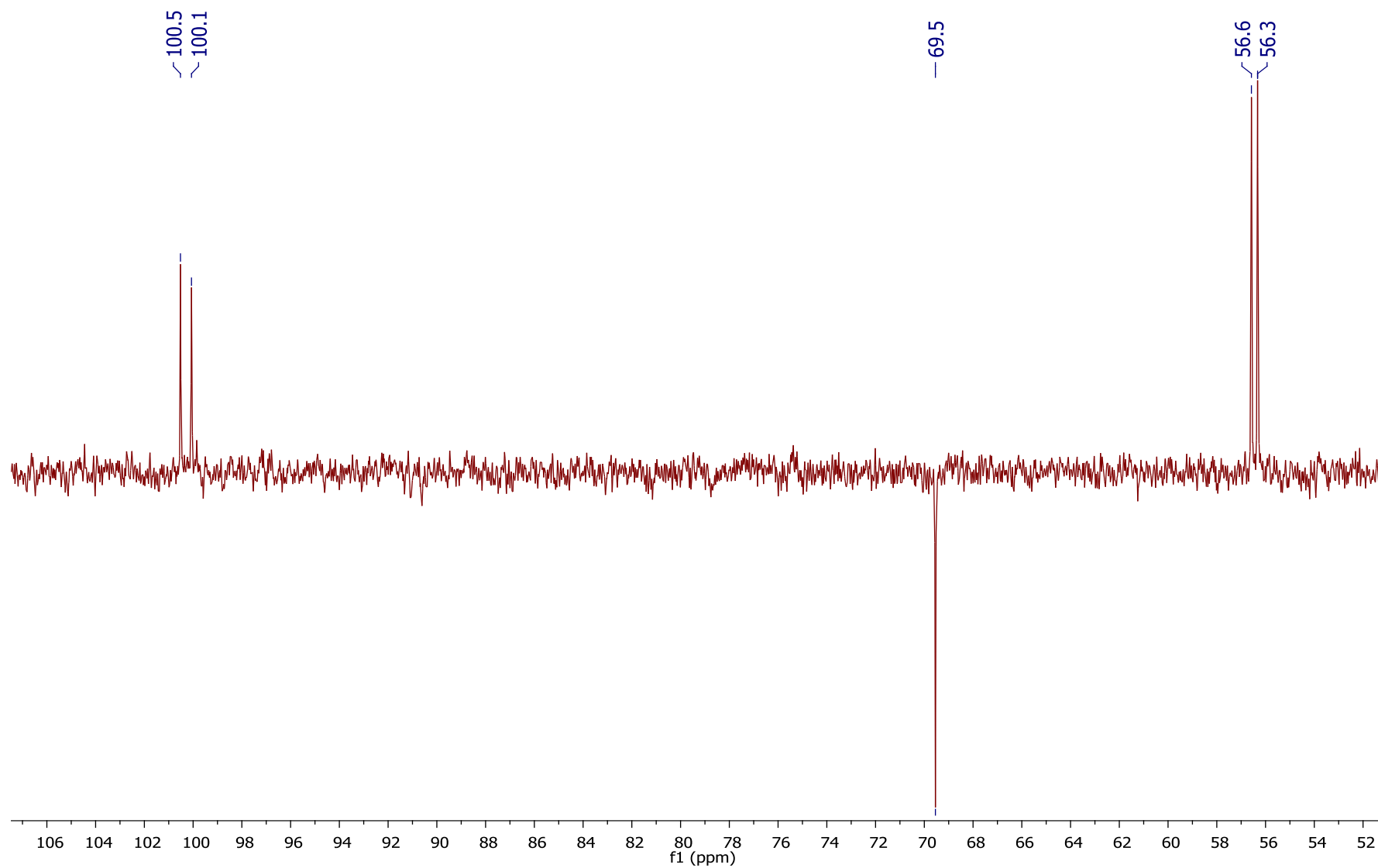
Espectro 7. Espectro de infrarojo por reflectancia ATR de la 5,7'-dihidroxi-2,4',7,9'-tetrametoxi-1'H,4H,6'H-espiro[naftalen-1,2'-fenalen]-4,6'-diona (**51**).



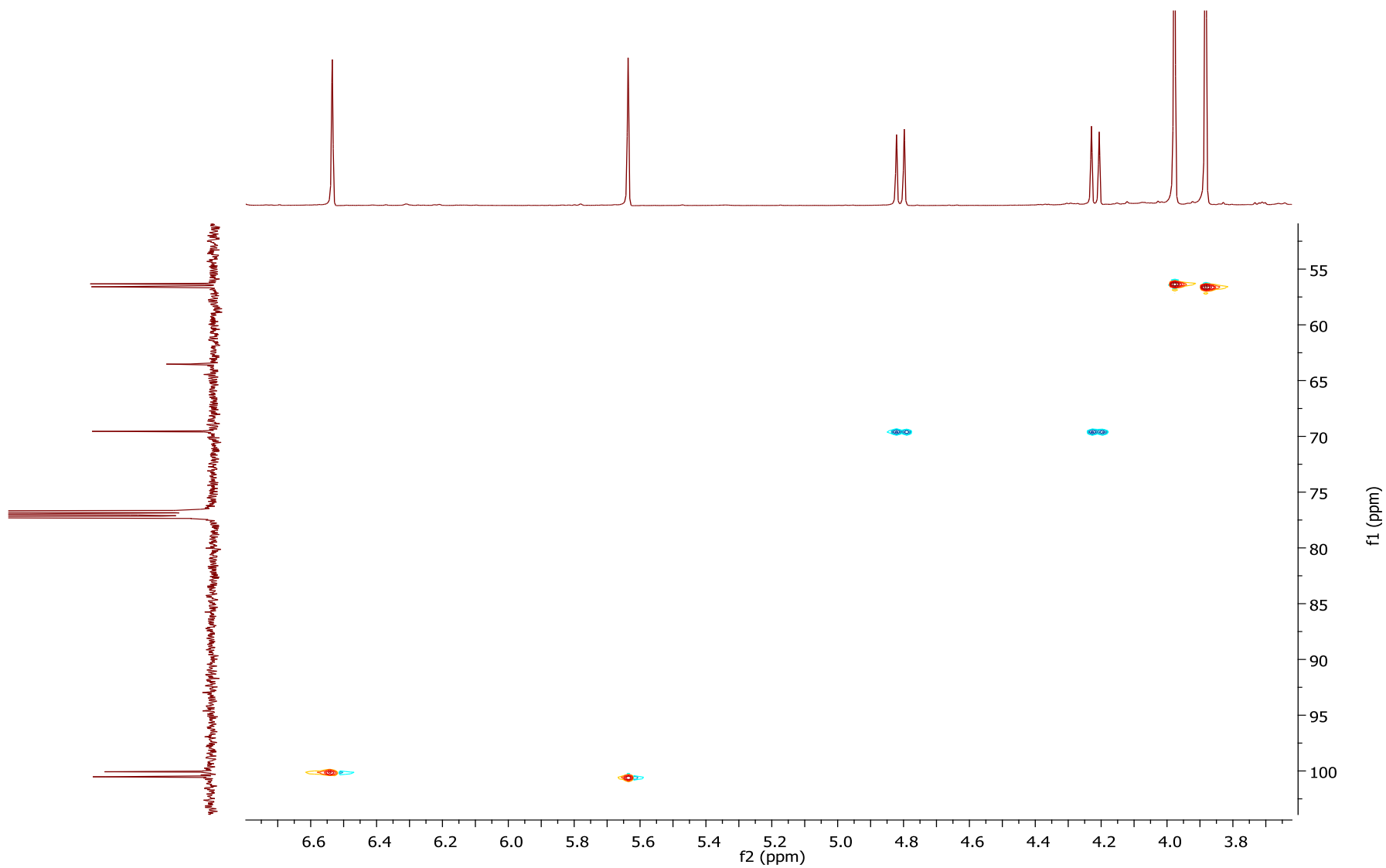
Espectro 8. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de la preusocromona C (**52**) en CDCl_3 (500 MHz).



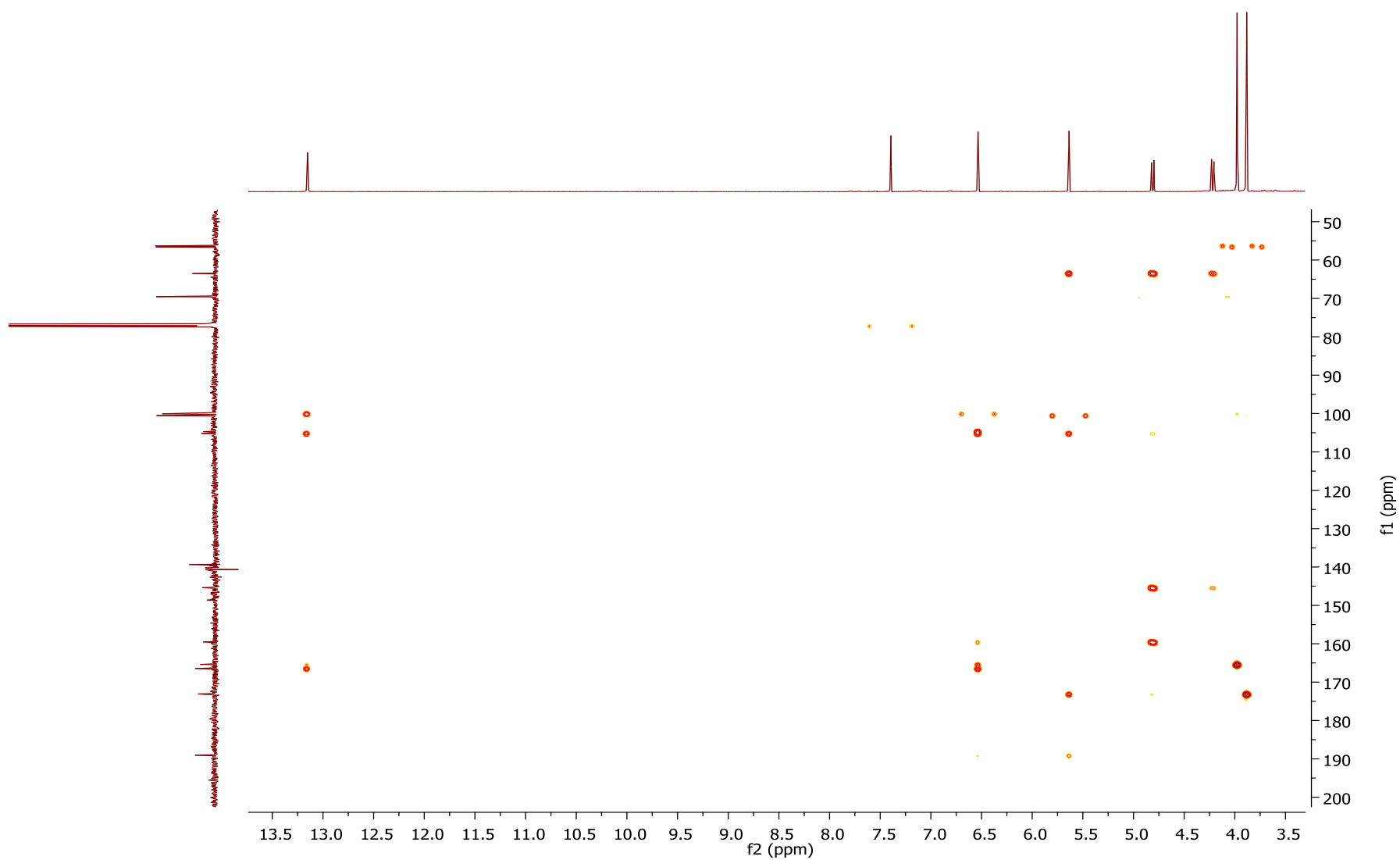
Espectro 9. Espectro ^{13}C -RMN de la preusocromona C (**52**) en CDCl_3 (125 MHz).



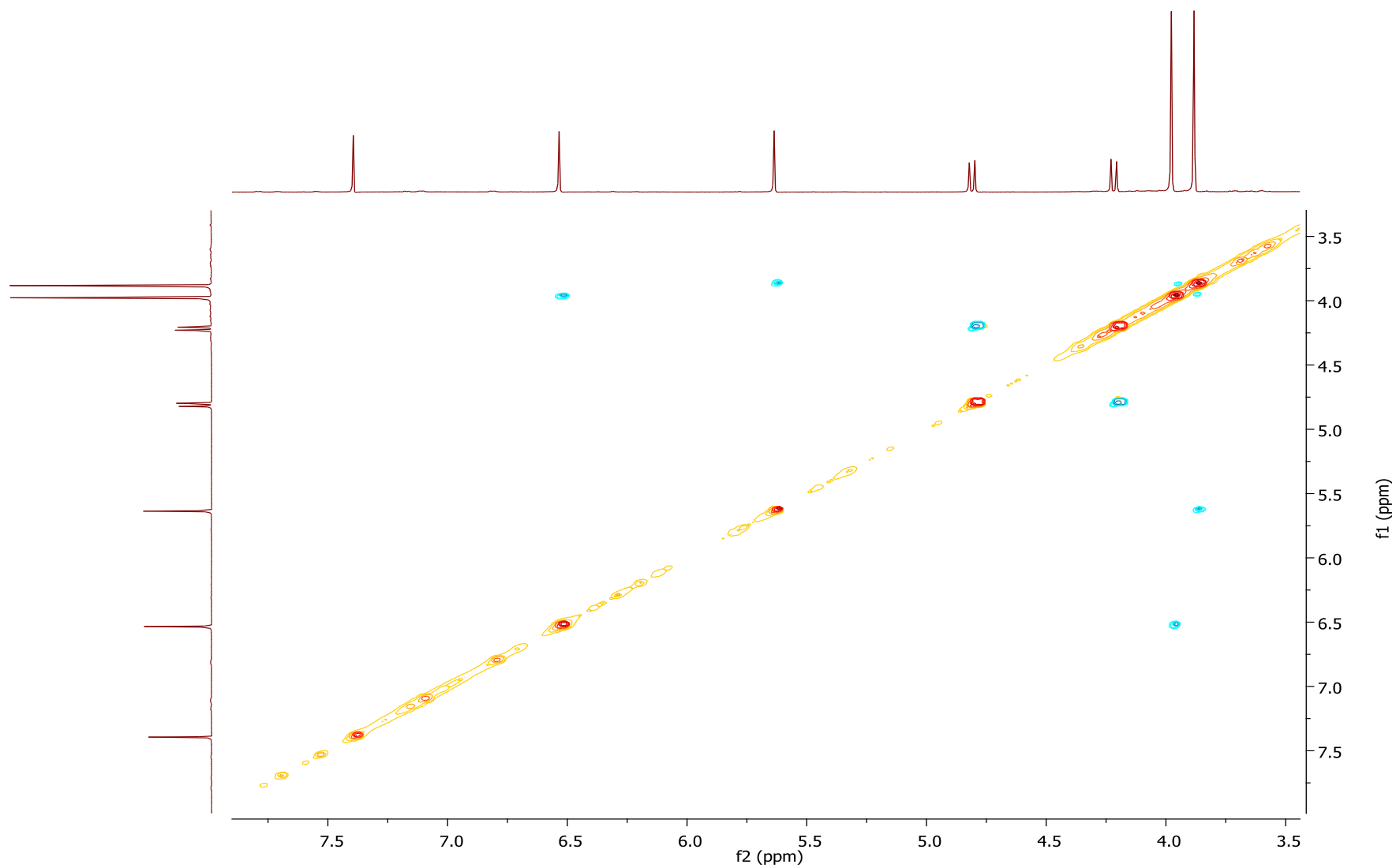
Espectro 10. Espectro DEPT 135 de la preusocromona C (**52**) en CDCl_3 (125 MHz).



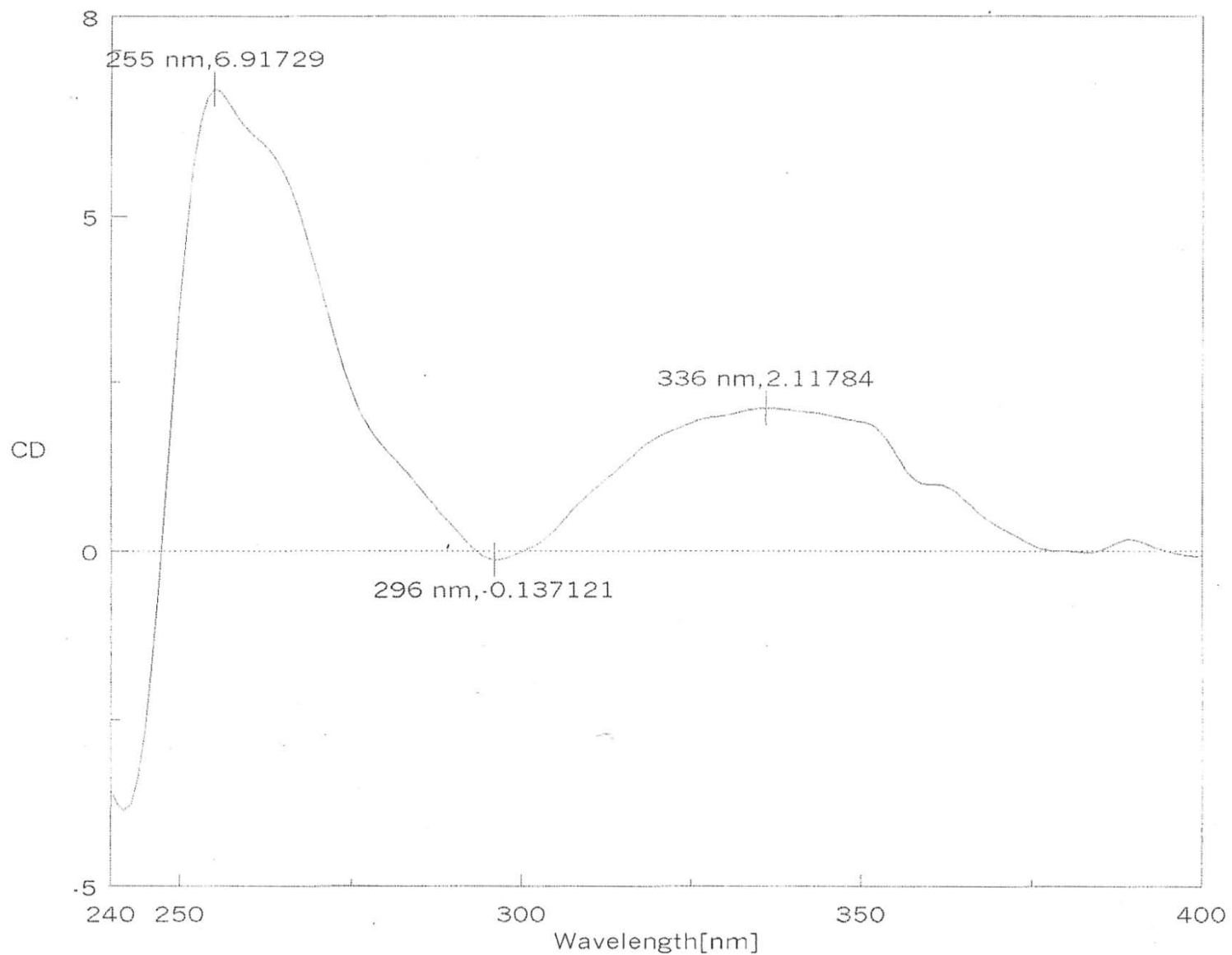
Espectro 11. Espectro HSQC de la preusocromona C (**52**) en CDCl₃ (500 MHz).



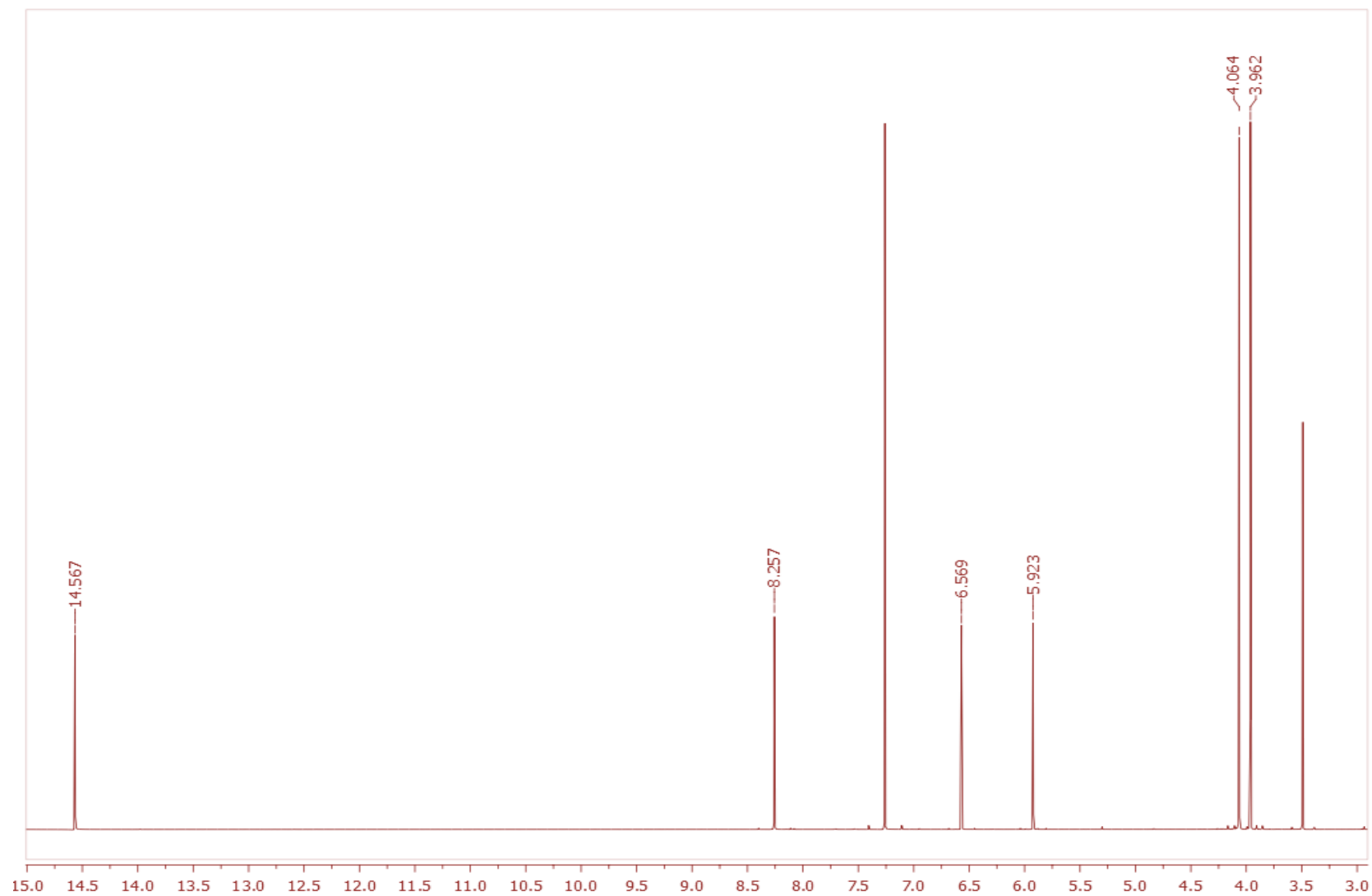
Espectro 12. Espectro HMBC de la preusocromona C (**52**) en CDCl_3 (500 MHz).



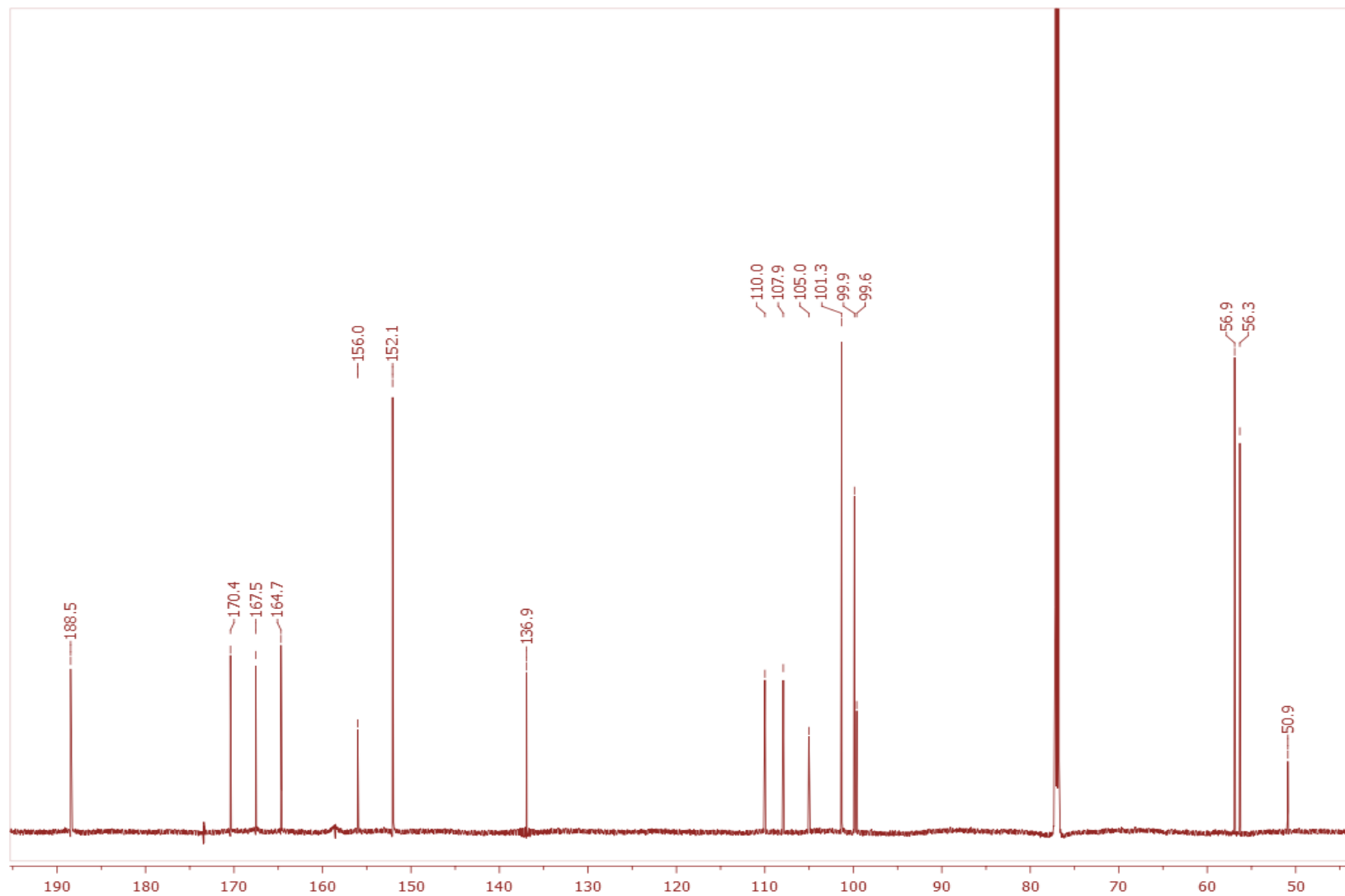
Espectro 13. Espectro NOESY de la preusocromona C (**52**) en CDCl₃ (500 MHz).



Espectro 14. Espectro de dicroísmo circular de la preusocromona C (**52**) en CH₂Cl₂.



Espectro 15. Espectro ^1H -RMN de la corimbiferona (**44**) en CDCl_3 (500 MHz).



Espectro 16. Espectro ^{13}C -RMN de la corimbiferona (**44**) en CDCl_3 (125 MHz).