



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRINCIPIOS BIODINÁMICOS DE LAS ESPECIES FÚNGICAS *Penicillium* sp. G1-a14
Y *Penicillium spathulatum* B35

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. PAULINA DEL VALLE PÉREZ

TUTOR

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Alfredo Ortega Hernández
VOCAL: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL: Dr. Adolfo Andrade Cetto
VOCAL: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
SECRETARIO: Dr. Francisco Hernández Luis

Lugar donde se realizó el trabajo de Tesis:

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

CONGRESOS

Calmodulin inhibitors from *Aspergillus stromatoides*. Cartel. Paulina Del Valle, Mario Figueroa, Martín González-Andrade, and Rachel Mata. 2013 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, St. Louis Missouri, EUA.

Calmodulin binding agents from selected fungal metabolites. Cartel. Paulina Del Valle, Mario Figueroa and Rachel Mata. 2014 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Oxford, Mississippi, EUA.

Phytotoxic eremophilane sesquiterpenes from the coprophilous fungus *Penicillium* sp. G1-a14. Cartel. Paulina Del Valle, Mario Figueroa and Rachel Mata. QUIMIUNAM 2015, Ciudad Universitaria, UNAM.

Alpha-glucosidase inhibitors from *Penicillium spathulatum*. Cartel. Paulina Del Valle, Ana-Laura Martínez, Mario Figueroa, Huzefa A. Raja and Rachel Mata. Simposio del 75 Aniversario del Instituto de Química 2016, Ciudad Universitaria, UNAM.

ARTÍCULOS

Paulina Del Valle, Mario Figueroa and Rachel Mata. **Phytotoxic eremophilane sesquiterpenes from the coprophilous fungus *Penicillium* sp. G1-a14.** 2015. Journal of Natural Products. DOI: 10.1021/np5009224.

Paulina Del Valle, Ana-Laura Martínez, Mario Figueroa, Huzefa A. Raja and Rachel Mata. **Alkaloids from the fungus *Penicillium spathulatum* as α -glucosidase inhibitors.** 2016. Planta Medica. DOI: 10.1055/s-0042-111393.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, me brindó la oportunidad de continuar con mi formación académica y profesional.
- A mi tutora, la Dra. Rachel Mata Essayag por permitirme formar parte de su grupo de investigación, así como por su dedicación y compromiso para el desarrollo del presente trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (becario 234569), así como por el financiamiento autorizado a través del proyecto CONACyT 219765.
- A los miembros del comité tutor, la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava y el Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por sus valiosas recomendaciones y aportaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.
- A los miembros del jurado quienes se tomaron el tiempo para revisar y realizar valiosas observaciones sobre el presente documento.
- Al personal técnico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, por los análisis espectroscópicos y espectrométricos.
- Al personal técnico del Instituto de Química, UNAM, por los análisis espectroscópicos y espectrométricos, en especial al M. en C. Simón Hernández Ortega por los análisis de difracción de rayos X.
- Al Departamento de Supercómputo (Miztli-UNAM) de la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de la Información y Computación por la asignación de recursos para realizar los cálculos computacionales.
- A los Doctores Isabel Rivero Cruz y Abraham Madariaga Mazón por el apoyo técnico brindado a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación.
- Al Dr. Huzefa A. Raja por la identificación taxonómica de los microorganismos fúngicos utilizados en el presente estudio.
- Mi más profundo agradecimiento a mi esposo, a mi familia y amigos por su amor incondicional y su todo su apoyo durante mis estudios de maestría y doctorado.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE CUADROS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 El género <i>Penicillium</i>	6
2.1.1 Aspectos generales	6
2.1.2 Características morfológicas	8
2.1.3 Identificación taxonómica	8
2.1.4 Metabolismo secundario	10
2.1.4.1 Metabolitos secundarios biodinámicos producidos por especies del género <i>Penicillium</i> sección <i>Citrina</i>	11
2.1.4.2 Metabolitos secundarios biodinámicos producidos por especies del género <i>Penicillium</i> sección <i>Brevicompacta</i>	17
2.2 Los biopesticidas	21
2.2.1 Aspectos generales	21
2.2.2 Productos naturales como fuente potencial de agentes agroquímicos	22
2.2.3 Control de malezas	24
2.2.4 Productos naturales como fuente potencial de herbicidas	24
2.3 Las α -glucosidasas	26
2.3.1 Aspectos generales	26
2.3.2 Inhibidores de α -glucosidasas	27
3. HIPÓTESIS	29
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	30
5. PARTE EXPERIMENTAL	32
5.1 Material fúngico	32
5.1.1 Toma de muestras de guano de murciélago	32
5.1.2 Tratamiento de las muestras G1-a y G1-b	32
5.1.3 Obtención de cultivos axénicos	32

5.2 Análisis cromatográficos	33
5.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	34
5.4 Obtención de los extractos orgánicos en pequeña escala	34
5.5 Estudio químico de la especie <i>Penicillium</i> sp. G1-a14	35
5.5.1 Fermentación, extracción y fraccionamiento	35
5.5.2 Aislamiento, purificación e indentificación de los eremofilanos 89-92 .	35
5.6 Estudio químico de la especie <i>Penicillium spathulatum</i> B35	37
5.6.1 Fermentación, extracción y fraccionamiento	37
5.7 Identificación de los hongos coprófilos <i>Penicillium</i> sp. G1-a14 y <i>Penicillium spathulatum</i> B35	40
5.8 Evaluación <i>in vitro</i> del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos, fracciones y productos puros	40
5.8.1 Ensayo bioautográfico de fitotoxicidad	40
5.8.2 Ensayo de fitotoxicidad en caja Petri	41
5.9 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de los extractos orgánicos, fracciones y productos puros sobre las enzimas α -glucosidasas	41
5.10 Estudios <i>in vivo</i>	43
5.10.1 Animales de experimentación	43
5.10.2 Inducción de hiperglucemia en ratones	43
5.10.3 Prueba oral de tolerancia a la sacarosa	44
5.10.4 Evaluación de la actividad antihiperalgésica de la benzomalvina A (94)	44
5.10.5 Análisis estadísticos	45
5.11 Estudios computacionales	45
5.11.1 Preparación de las estructuras	45
5.11.2 Cálculos teóricos de rotación óptica, dicroísmo circular y desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C	46
5.11.3 Estudios de acoplamiento molecular	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1 Obtención del material fúngico	49
6.2 Selección de las especies fúngicas	49
6.3 Estudio de la especie <i>Penicillium</i> sp. G1-a14	51
6.3.1 Identificación molecular de la especie fúngica	51
6.3.2 Estudio químico biodirigido	52
6.3.3 Elucidación estructural del 3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> -dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (89)	54
6.3.4 Evaluación de la actividad fitotóxica de los eremofilanos 89-92	59
6.4. Estudio de la especie <i>Penicillium spathulatum</i> B35	62
6.4.1 Identificación molecular de la especie fúngica	62
6.4.2 Estudio químico biodirigido	64
6.4.3 Elucidación estructural de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (100)	68

6.4.4 Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasas de los compuestos aislados de <i>P. spathulatum</i> B35	73
6.4.5. Evaluación del potencial antihiper glucémico <i>in vivo</i> de la benzomalvina A (94)	75
6.4.6 Estudios de acoplamiento molecular	76
6.4.7 Evaluación del potencial antihiperalgésico <i>in vivo</i> de la benzomalvina A (94)	78
7. CONCLUSIONES	82
8. REFERENCIAS	84
9. ANEXOS	94
10. PUBLICACIONES	145

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura/Símbolo	Significado
[α] _D	Rotación óptica específica
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
Acetona- <i>d</i> ₆	Acetona deuterada
ANADEVA	Análisis de varianza
CaM	Calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
COSY	Espectroscopia bidimensional de correlación homonuclear
d	Señal doble
DC	Dicroísmo circular
dd	Señal doble de dobles
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EIMS	Espectrometría de masas modalidad de ionización impacto electrónico
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
h	Hora
Hex	Hexano
HMBC	Espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución modalidad de ionización electrospray
HSQC	Espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
IDF	International Diabetes Federation
IR	Espectroscopia de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k</i> _d	Constante de disociación

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS (cont.)

Abreviatura/Símbolo	Significado
kg	Kilogramo
k_i	Constante de inhibición
°C	Grados Celsius
m	Señal múltiple
m/z	Relación masa/carga
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio anhidro
nm	Nanómetro
nM	Concentración nanomolar
OMS	Organización mundial de la salud
p.f.	Punto de fusión
<i>p.o.</i>	Administración oral
PDA	Agar papa-dextrosa
PDB	Protein Data Bank
ppm	Partes por millón
q	Señal cuarteto
s	Señal simple
t	Señal triple
td	Señal triplete doble
TD-DFT	Teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Concentración micromolar

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Patrones de ramificación de los aparatos conidiales encontrados en el género <i>Penicillium</i> (Adaptado de Visagie y colaboradores, 2014).	9
Figura 2. Ingredientes activos registrados como plaguicidas convencionales o biopesticidas de 1997 a 2010 (Adaptado de Cantrell et al., 2012).	22
Figura 3. Ejemplos selectos de agentes agroquímicos de origen natural.	23
Figura 4. Ejemplos representativos de agentes fitotóxicos de origen natural.	25
Figura 5. Mecanismo de exohidrólisis catalizado por las enzimas α -glucosidasas (adaptado de Davies y Henrissat, 1995).	26
Figura 6. Ejemplos representativos de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas derivados de plantas o microorganismos.	28
Figura 7. Cultivos fúngicos axénicos obtenidos a partir de las muestras de guano de murciélago G1-a y G1-b.	49
Figura 8. Cultivo axénico de dos semanas en medio PDA de <i>Penicillium</i> G1-a14.	52
Figura 9. Bioautografía del extracto orgánico de <i>Penicillium</i> sp. G1-a14 contra <i>Amaranthus hypochondriacus</i> (A) y <i>Echinocloa crus-galli</i> (B).	53
Figura 10. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Penicillium</i> sp. G1-a14.	53
Figura 11. Espectro de ^1H -RMN del 3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> -dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (89 , Metanol- d_4 , 400 MHz).	56
Figura 12. Espectro de ^{13}C -RMN del 3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> -dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (89 , Metanol- d_4 , 100 MHz).	57
Figura 13. A) Correlaciones observadas en los espectros bidimensionales COSY (barras azules) y HMBC (flechas rojas). B) Estructura cristalográfica del compuesto 91 .	58
Figura 14. Estructuras de mínima energía de los dos posibles enantiómeros 3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> (A) y 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> (B) del producto natural 89 .	58

LISTA DE FIGURAS (cont.)

- Figura 15.** Comparación del espectro experimental de DC de **89** (negro) con los calculados por TD-DFT para los enantiómeros *3R,4R,5R,6R* (rojo) y *3S,4S,5S,6S* (azul). 59
- Figura 16.** Efecto fitotóxico del compuesto **94** sobre *A. hypochondriacus*. 60
- Figura 17.** Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud (-lnL = 11316.32) mediante el análisis de una matriz de datos de 50 secuencias de *RPB2* (1014 bp). Los valores de remuestreo (bootstrap) del ML se representan en los internodos (sólo se muestran valores > 70%). *Talaromyces flavus* (CBS 310.38) se utilizó como un grupo externo. 63
- Figura 18.** Cultivo axénico de dos semanas en medio PDA de *Penicillium spathulatum* G1-B35. 64
- Figura 19.** Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de *Penicillium spathulatum* B35. 65
- Figura 20.** Estructuras de mínima energía de los confórmers **94a** (A) y **94b** (B) de la benzomalvina A (**94**). 66
- Figura 21.** Mecanismo de epimerización (A) y descomposición (B) de los productos **97** y **98** (adaptado de Clark y colaboradores). 66
- Figura 22.** A) Estructura co-cristalográfica de las quinolactacinas A1 (**95**) y A2 (**96**). B) estructura cristalográfica de la quinolonimida (**98**). 67
- Figura 23.** Comparación de los espectros experimentales de DC de **95** y **96** (azul) con los calculados por TD-DFT para los epímeros *3R,1'S* (rojo) y *3S,1'S* (verde). 68
- Figura 24.** Espectro de ¹H-RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**, Acetona-*d*₆, 400 MHz). 70
- Figura 25.** Espectro de ¹³C-RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**, Acetona-*d*₆, 400 MHz). 71
- Figura 26.** Correlaciones observadas en los espectros bidimensionales COSY (barras azules) y HMBC (flechas rojas) para el compuesto **100**. 72

LISTA DE FIGURAS (cont.)

- Figura 27.** Curvas de concentración-respuesta del efecto inhibitorio de los compuestos **94 (A)**, **95-96 (B)**, **97, (C)**, **99 (D)** y acarbosa (**E**) sobre la α -glucosidasa de levadura. 74
- Figura 28.** Efecto antihiper glucémico de la benzomalvina A (**94**) en ratones sanos (**A**) y en ratones hiper glucémicos (**B**) en las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa. 76
- Figura 29.** Modelo estructural generado para los complejos de benzomalvina A (**94a** bastones verdes y **94b** bastones rojos), y acarbosa (bastones rosas) con isomaltasa de levadura (3A4A). 77
- Figura 30.** Modelos de interacción de **94a (A)** y **94b (B)** con los residuos de 3A4A. 77
- Figura 31.** Modelo estructural generado para los complejos de benzomalvina A (**94a**, bastones verdes y **94b**, bastones rojos), kotalanol (bastones amarillos) y acarbosa (bastones rosas) con sacarasa-isomaltasa humana (**A**); con la porción *N*-terminal de maltasa-glucoamilasa humana (**B**); y con la porción *C*-terminal de maltasa-glucoamilasa humana (**C**). 78
- Figura 32.** Curso temporal del comportamiento hiperalgésico inducido por la formalina (**A**). Efecto antihiperalgésico de la benzomalvina A (**94**, BZM) sobre la fase I (**B**) y sobre la fase II (**C**). 80
- Figura 33.** Efecto antihiperalgésico de la benzomalvina A (**94**, BZM) con el pre-tratamiento de flumazenil (FLU) durante la fase I (**A**) y la fase II (**B**) en la prueba de formalina. 81

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Penicillium</i> .	6
Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección <i>Citrina</i> .	12
Cuadro 3. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección <i>Brevicompecta</i> .	18
Cuadro 4. Rendimiento de los extractos orgánicos y actividad biológica	50
Cuadro 5. Datos espectroscópicos del 3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> -dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (89).	55
Cuadro 6. Actividad fitotóxica (CI ₅₀) del extracto y los metabolitos 91 y 92 de <i>Penicillium</i> sp. G1-a14.	60
Cuadro 7. Datos espectroscópicos experimentales y teóricos de la 2-cloro-6-[2'(<i>S</i>)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (100).	72
Cuadro 8. Valores de CI ₅₀ sobre α -glucosidasa de levadura de los metabolitos aislados de <i>P. spathulatum</i> .	73

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe el estudio químico de las especies fúngicas *Penicillium* sp. G1-a14 y *Penicillium spathulatum*, las cuales se seleccionaron a partir de una colección de hongos coprófilos aislados de la cueva Chontalcoatlán, en el Estado de Guerrero, con la finalidad de obtener compuestos bioactivos potencialmente útiles para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas o bien, como agentes terapéuticos para la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

Por una parte, la especie fúngica *Penicillium* sp. G1-a14 se seleccionó como fuente potencial de agentes herbicidas con base en la actividad fitotóxica que mostró un extracto orgánico obtenido a partir de medio sólido. El estudio químico biodirigido de esta especie condujo al aislamiento de un sesquiterpenoide novedoso identificado como el 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**), además de los eremofilanos conocidos isopetasol (**90**), sporogen AO-1 (**91**) y dihidrosporogen AO-1 (**92**). La elucidación estructural del compuesto **89** se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, y se confirmó inequívocamente por difracción de rayos X. La configuración absoluta de los centros estereogénicos C-3 y C-6 de **89** se estableció como *R,R* mediante la comparación del espectro de dicroísmo circular (DC) obtenido experimentalmente con los espectros obtenidos a través de cálculos teóricos utilizando teoría de funcionales de la densidad (DFT). La actividad fitotóxica de los metabolitos aislados del hongo *Penicillium* sp. G1-a14 se evaluó sobre el crecimiento radicular y la germinación de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Los eremofilanos **91** y **92** inhibieron de manera significativa el crecimiento y la germinación de *A. hypochondriacus* con valores de CI₅₀ de 0.17 mM, y de *E. crus-galli* con valores de CI₅₀ de 0.17 y 0.30 mM, respectivamente. Su acción fitotóxica fue comparable a la obtenida para la tricolorina A y mejor que el glifosato, utilizados como controles positivos.

Por otra parte, el hongo *P. spathulatum* se seleccionó como fuente potencial de inhibidores de α -glucosidasas con base en la actividad inhibitoria que mostró un extracto orgánico obtenido a partir de medio sólido. La investigación química de este hongo coprófilo permitió el aislamiento de una polihidroxiantraquinona halogenada descrita por primera vez en la literatura, y que se caracterizó por técnicas espectroscópicas y espectrométricas como

la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxi-antraquinona (**100**), estructura que a su vez se confirmó mediante la comparación de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C con los calculados de forma teórica utilizando DFT. La configuración absoluta del centro estereogénico C-2' de **100** se estableció como *S* comparando el valor experimental de rotación óptica específica ($[\alpha]_D$), con los valores calculados utilizando el mismo nivel de teoría. De manera adicional se aislaron los alcaloides benzomalvina A (**94**), quinolactacinas A1 (**95**), A2 (**96**) y B (**97**), quinolonimida (**98**) y asperfenamato (**99**). Todos estos compuestos mostraron una potente actividad *in vitro* como inhibidores de α -glucosidasas con valores de CI_{50} de 383.2, 273.3, 57.3 y 8.3 μM , respectivamente. Su acción inhibitoria fue mejor que la de la acarbosa ($\text{CI}_{50} = 659.3$), usada como control positivo. Los estudios de acoplamiento molecular (docking) predijeron que los atropoisómeros de **94**, **94a** y **94b** se unen con gran afinidad a las α -glucosidasas, tanto de levadura, como de humano. La actividad inhibitoria de la benzomalvina A (**94**) sobre las enzimas α -glucosidasas se confirmó *in vivo* mediante una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones sanos e hiperglucémicos. En este experimento se observó que el producto natural provoca una disminución significativa del pico postprandial. Finalmente se evaluó el potencial antihiperalgésico *in vivo* de **94**, lo que permitió confirmar que las quinazolino-benzodiazepinas poseen propiedades antihiperalgésicas.

ABSTRACT

The present work describes the chemical research of the fungal species *Penicillium* sp. G1-a14 and *Penicillium spathulatum*, which were selected from a collection of coprophilous fungi with the aim of discover bioactive compounds useful for the development of new biopesticides, or as leads for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Penicillium sp. G1-a14 was selected as a potential source of herbicides, based on the phytotoxic activity of an organic extract obtained from solid-rice culture. Bioassay-guided fractionation led to the isolation of a new sesquiterpene namely 3*R*,6*R*-dihydroxy-9,7(11)-dien-8-oxoeremophilane (**89**), along with the known eremophilanes isopetasol (**90**), sporogen AO-1 (**91**) y dihydrosporogen AO-1 (**92**). The structure of compound **89** was established by means of spectroscopic and spectrometric techniques, and confirmed unambiguously with an X-ray analysis. The absolute configuration at the stereocenters C-3 and C-6 of **89** was determined as *R,R*, through the comparison of experimental circular dichroism spectrum (CD) with the spectra obtained by theoretical calculations using the density functional theory (DFT). The phytotoxic activity of the isolated metabolites from *Penicillium* sp. G1-a14 was evaluated on radical growth and germination of the weeds *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli*. Eremophilanes **91** and **92** inhibited the radicle growth and germination of *A. hypochondriacus* with IC₅₀ values of 0.17 mM for both compounds, and *E. crus-galli* with IC₅₀ values of 0.17 and 0.30 mM, respectively. The phytotoxic action was comparable to that of tricolorin A and better than glyphosate, used as positive controls.

P. spathulatum was selected as a potential source of α -glucosidase inhibitors, based on the inhibitory activity displayed by an organic extract obtained from solid-rice culture. Chemical investigation of this coprophilous fungus led to the isolation of a new halogenated polyhydroxyanthraquinone characterized by means of spectroscopic and spectrometric methods as 2-chloro-6-[2'(*S*)-hydroxypropyl]-1,3,8-trihydroxyanthraquinone (**100**). This structure was confirmed by comparison of the experimental ¹H y ¹³C chemical shifts and those obtained theoretically by DFT calculations. The absolute configuration of the stereocenter C-2' of **100** was established as *S* through the comparison of experimental specific optical rotation ($[\alpha]_D$) with those values obtained with theoretical calculations using the same level of theory. In addition, the known alkaloids benzomalvin A (**94**), quinolactacins A1 (**95**),

A2 (**96**) and B (**97**), quinolonimide (**98**) and asperphenamate (**99**) were isolated. These alkaloids showed *in vitro* inhibitory activity against α -glucosidase with IC₅₀ values of 383.2, 273.3, 57.3 y 8.3 μ M, respectively. The inhibitory activity was better than that of acarbose (CI₅₀ = 659.3 μ M) used as positive control. Furthermore, docking studies predicted that the most stable conformers of **94**, **94a** y **94b** bind to yeast and mammalian α -glucosidases with higher affinity than acarbose. The α -glucosidase inhibitory properties of **94** were confirmed *in vivo* with an oral sucrose tolerance test in normal and hyperglycemic mice, in which it was observed that the natural product reduced significantly the postprandial peak. Finally **94** also showed antihyperalgesic activity when tested in the formalin assay in hyperglycemic mice.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming a partir del hongo *Penicillium rubens*, los organismos fúngicos han demostrado ser una fuente relevante de productos naturales bioactivos (Fleming, 1929; Houbraken et al., 2011a). De tal forma, muchos de los fármacos empleados actualmente para el tratamiento de diversas enfermedades, así como algunos productos de interés agroquímico, derivan de estos microorganismos (Newman y Cragg, 2016; Seiber et al., 2014).

Los hongos son un grupo diverso de organismos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se estima que alrededor del mundo existen más de cinco millones de especies fúngicas y solamente cerca de 80,000 se encuentran descritas en la literatura (Pearce, 2011). Gracias a los avances tecnológicos, hoy en día existen cada vez más herramientas que facilitan su estudio químico y/o biológico y permiten que la investigación en productos naturales de origen fúngico siga siendo un campo fructífero.

De manera particular, los ascomicetos pueden producir una rica variedad química de metabolitos secundarios. Esta diversidad estructural se refleja en la amplia gama de efectos biológicos que presentan. Así, muchos productos naturales derivados de ascomicetos presentan actividad antibacteriana (cefalosporinas y penicilinas), antifúngica (griseofulvina y caspofungina), antiviral (3-*O*-metilviridicatina y emmyguyacinas), inmunosupresora (ciclosporina A y ácido micofenólico), citotóxica (brefeldina A y wortmannina), hipocolesterolemia (lovastatina y compactina), fitotóxica (brevionas y okaraminas), insecticida (decaturias y brevianamidas), entre muchas otras (Orjala et al., 2011; Cimmino et al., 2015).

A pesar de que el género *Penicillium* ha sido uno de los más estudiados en el campo de los productos naturales de origen fúngico, quizás debido a su diversidad y ubicuidad, en la actualidad, la exploración de diferentes nichos ecológicos ha permitido obtener especies que biosintetizan nuevos compuestos biodinámicos que constituyen prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos, agentes agroquímicos, y/o como herramientas de investigación (Zhou et al., 2016). De allí que en el presente trabajo de investigación se hayan seleccionado dos especies coprófilas de *Penicillium* provenientes de la cueva Chontalcoatlán, ubicada en el Estado de Guerrero en México.

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Penicillium*

2.1.1 Aspectos generales

El género *Penicillium* fue descrito por primera vez en el año de 1809 por el científico alemán Johann Heinrich Friedrich Link, quien acuñó el término (del latín *Penicillus* = pincel pequeño) para hacer referencia a la distintiva forma de pincel que presentan sus estructuras microscópicas. Link incluyó en su trabajo tres especies: *P. candidum*, *P. galucum* y *P. expansum* (Link, 1809). A partir de entonces, se han referido más de 1000 especies diferentes de *Penicillium*, sin embargo, muchas de ellas no están reconocidas actualmente debido a que no se cuenta con su descripción detallada, o se han considerado como sinónimas de otras especies. Con el uso de las técnicas modernas de identificación taxonómica, en la actualidad se encuentran reconocidas formalmente poco más de 350 especies de *Penicillium* (Visagie et al., 2014), las cuales, de acuerdo con la propuesta de Houbraken y colaboradores (Houbraken et al., 2016), se clasifican en dos subgéneros y 27 secciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Penicillium*.

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Penicillium</i>
Subgéneros	<i>Penicillium</i> y <i>Aspergilloides</i>
Secciones	<i>Aspergilloides, Brevicompacta, Canescentia, Charlesia, Charlesii, Chrysogena, Cinnamopurpurea, Citrina, Digitata, Exilicaulis, Fasciculata, Fracta, Gracilentia, Lanata-Divaricata, Ochrosalmonea, Osmophila, Paradoxa, Penicillium, Ramigena, Ramosa, Robsamsonia, Roquefortorum, Sclerotiora, Stolkia, Thysanophora, Torulomyces y Turbata</i>

Penicillium es un género muy diverso en la naturaleza; presenta una extensa distribución hallándose en todo tipo de climas y sustratos como suelos, aire, agua, productos alimenticios y en interiores. Como todos los ascomicetos, su principal función ecológica es la descomposición de materia orgánica para la reintegración de los nutrientes (Visagie et al., 2014). A través de la historia, este género ha tenido un impacto económico importante por ser uno de los principales causantes de la descomposición de alimentos destinados para consumo humano y animal (Pitt y Hocking, 2009). Asimismo, la mayoría de las especies que incluye este género son micotoxigénicas y por ende contaminan los alimentos con micotoxinas como la citrinina, el ácido ciclopiazónico, el ácido penicílico, la patulina, la roquefortina C, la toxina PR, la esterigmatocistina, la ocratoxina A, la zearalenona y el penitrem A, entre otras (Pitt, 2002). Por otro lado, la única especie de *Penicillium* considerada como patógena para el hombre y los animales es *P. marneffeii*, la cual es causante de una peniciliosis endémica de Asia tropical (Vanittanakom et al., 2006).

A pesar de su impacto negativo, el género *Penicillium* tiene una historia fascinante dentro de la medicina gracias al descubrimiento accidental de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1929. El uso terapéutico de este antibiótico comenzó a llevarse a cabo en los años 40. Desde entonces y hasta nuestros días, se han utilizado cepas de *Penicillium* en procesos industriales para producir una variedad de penicilinas (Bycroft y Shute, 1987). Algunas otras especies pertenecientes a este género también tienen un importante papel dentro de la industria alimenticia, principalmente para la producción de quesos como Camembert y Roquefort, en la elaboración de productos cárnicos fermentados, o como productores de enzimas de interés biotecnológico (Perrone et al., 2015; Hamlyn et al., 1987).

Aunque el género *Penicillium* ha sido ampliamente estudiado en el área de los productos naturales de origen fúngico, en la actualidad sigue constituyendo una fuente prometedora de nuevos compuestos biodinámicos que pueden ser útiles para el desarrollo de fármacos o biopesticidas (Kozlovskii et al., 2013).

2.1.2 Características morfológicas

Las colonias de *Penicillium in vitro* son generalmente circulares, con borde neto muchas veces sin fructificación y mostrando el color del micelio. Inicialmente son blancas y luego se convierten en verdes, verde azuladas, gris verdosas, amarillentas o hasta rosadas. La superficie de la colonia madura puede ser aterciopelada, filamentosa, vellosa, lanosa o de textura algodonosa (Okuda et al., 2000). En muchos casos se observan en la superficie gotas de líquido exudado que pueden ser incoloras o bien tener un color determinado, o pigmentos que son excretados al medio de cultivo (Figuroa et al., 2014).

Sus estructuras microscópicas presentan característicos penicilios o aparatos conidiales en forma de pincel. El micelio se distingue por tener hifas septadas y hialinas a partir de las que derivan los conidióforos que están unidos al micelio mediante estipes. Los puntos de ramificación pueden ser uno, dos, o excepcionalmente tres, a lo largo del conidióforo. Además, se presentan fiálides que están unidas a las ramas a través de células denominadas métulas. A partir de las fiálides se originan cadenas de conidios o esporas asexuales (Visagie et al., 2014). Las formas teleomórficas de *Penicillium*, como *Eupenicillium* o *Talaromyces*, presentan ascocarpos en forma de cleistotecios o gimnotecios, en los que se encuentran las ascosporas o esporas sexuales (Yilmaz et al., 2014). En algunos casos se forman masas compactas de micelio llamadas esclerocios, estructuras que sirven como reservorio de alimento (Smith et al., 2015).

2.1.3 Identificación taxonómica

La identificación a nivel de especie dentro del género *Penicillium* es un tanto compleja ya que se basa en una serie de criterios que incluyen la caracterización morfológica micro y macroscópica, el estudio de secuencias de ADN mediante técnicas de biología molecular y la identificación de micotoxinas u otros metabolitos secundarios característicos (Houbraken et al., 2016).

Las características macromorfológicas en medios de cultivo específicos tales como agar Czapek, agar Czapek-autolizado de levadura (CYA), agar sacarosa-creatina (CREA), agar extracto de malta (MEA; Oxoid), agar extracto de levadura-sacarosa (YES), agar avena

(OA), agar papa-dextrosa (PDA), entre otros, son el punto de partida para la identificación a nivel de género y también se utiliza como criterio de identificación entre especies (Houbraken et al., 2011b). En lo que respecta a las características microscópicas, la ramificación de los conidióforos (monoverticilados, biverticilados, terverticilados, etc.), el número, forma y disposición de las métulas, fiálides y conidios que aparecen en el extremo de los aparatos conidiales (Figura 1), así como la presencia de cleistotecios o esclerocios, se utiliza como carácter distintivo entre las distintas secciones del género (Visagie et al., 2014).

Sin duda en la actualidad los estudios moleculares se han convertido en la principal herramienta para identificar a las especies del género *Penicillium* y para comprender su filogenia (Houbraken y Samson, 2011). En este sentido, las secuencias de ADN ribosómico ITS1 e ITS2 (Internal transcribed spacers, en inglés) son ampliamente utilizadas como marcadores universales para organismos fúngicos (Schoch et al., 2012). Para el género *Penicillium* se utilizan también regiones de secuencias marcadoras de ADN ribosómico tales como la 18S, 5.8S, 28S, y otras secuencias como la de β -tubulina (*BenA*), la calmodulina (*CaM*) y la subunidad 2 de la ARN-polimerasa (*RPB2*) [Peterson, 2012].

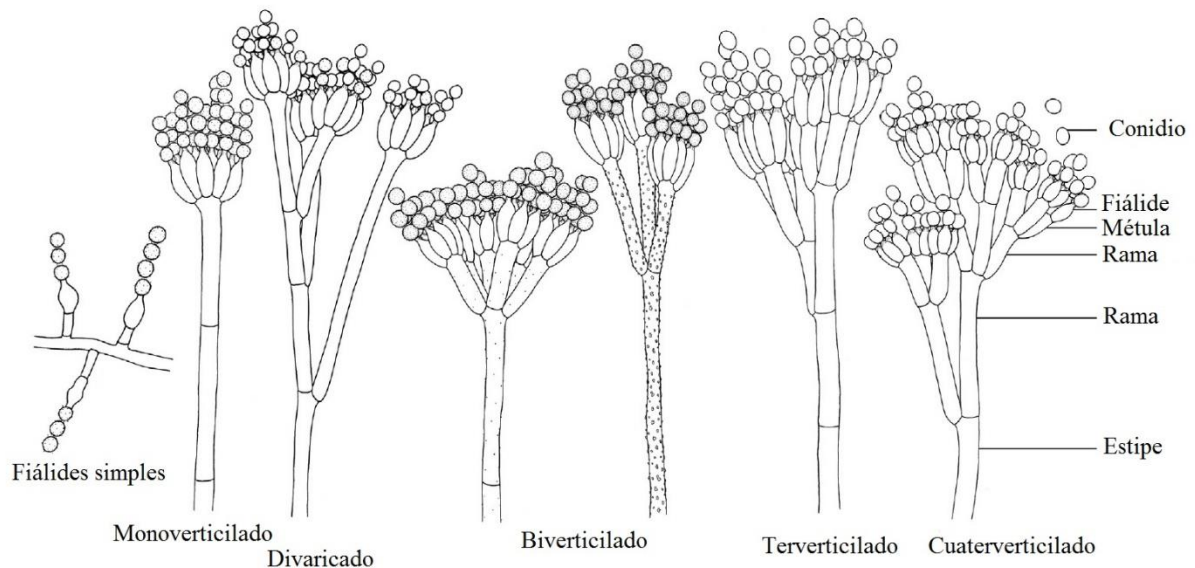


Figura 1. Patrones de ramificación de los aparatos conidiales encontrados en el género *Penicillium* (Adaptado de Visagie y colaboradores, 2014).

Diversos estudios han demostrado que existe una estrecha correlación entre la clasificación taxonómica de una especie fúngica y la síntesis de metabolitos secundarios específicos. En este aspecto, la quimiotaxonomía es una valiosa herramienta de apoyo en el proceso de clasificación e identificación de hongos filamentosos, en particular de *Penicillium* spp. Esta estrategia se basa en el establecimiento de perfiles químicos de los metabolitos secundarios que biosintetizan dichas especies, y su posterior comparación con los de otras especies conocidas (Frisvad et al., 2008; Zhelifonova et al., 2010).

2.1.4 Metabolismo secundario

Por su importancia en el descubrimiento de moléculas bioactivas, la química del género *Penicillium* ha recibido una gran atención a través del tiempo (Nicoletti et al., 2008; Nicoletti y Trincone, 2016). El mejor testimonio de esta afirmación es la extensa literatura publicada que incluye miles de artículos originales, reportes, patentes y libros, de tal manera que, realizar una revisión completa resulta una tarea ardua.

De acuerdo con la vasta información existente, la diversidad química presente en el metabolismo secundario del género *Penicillium* incluye alcaloides muy diversos (Hanson, 2008; Li, 2010; Wallwey y Li, 2011; Finefield et al., 2012; Kozlovskii et al., 2013; Ma et al., 2016; *inter alia*); policétidos varios (Mantle, 1987; Hanson, 2008; Nicoletti et al., 2009; Cox y Al-Fahad, 2013; Gao et al., 2013; *inter alia*); terpenoides (Hoffmeister y Keller, 2007; Macías et al., 2014, y referencias allí citadas), péptidos (Morino et al., 1996 y referencias allí citadas); meroterpenoides (Matsuda et al., 2016 y referencias allí citadas), flavonoides (Hou et al., 2016 y referencias allí citadas), y otros productos de biogénesis mixta.

Considerando que los aislamientos de *Penicillium* estudiados en el presente trabajo pertenecen a las secciones *Citrina* y *Brevicompecta*, en los siguientes apartados se hará una breve descripción del perfil metabólico de las especies incluidas en estas secciones.

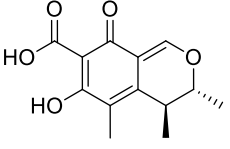
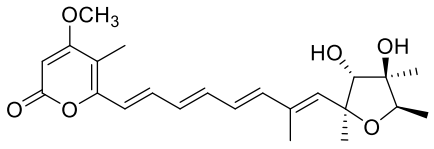
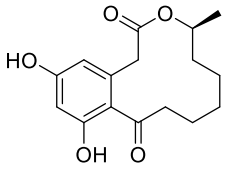
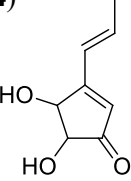
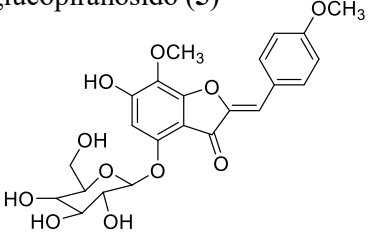
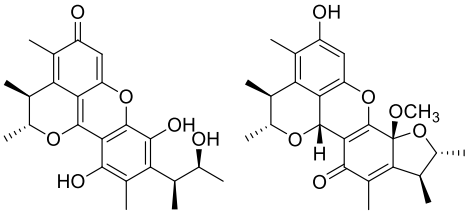
2.1.4.1 Metabolitos secundarios biodinámicos producidos por especies del género *Penicillium* sección *Citrina*

Dentro del género *Penicillium*, la sección *Citrina* se encuentra integrada por 39 especies las cuales tienen una amplia distribución mundial (Anexo A-1). La especie más común dentro de esta sección es *P. citrinum*, la cual incluso ha sido considerada como una de las formas de vida eucarionte más abundante en el planeta (Pitt, 1980). Las especies que pertenecen a esta sección se caracterizan por presentar aparatos conidiales biverticilados simétricos, fiálides en forma de matraz y conidios relativamente pequeños. En su mayoría, son productoras de micotoxinas como la citrinina (1) y la citreoviridina (2) (Houbraken et al., 2011b).

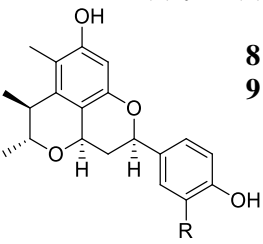
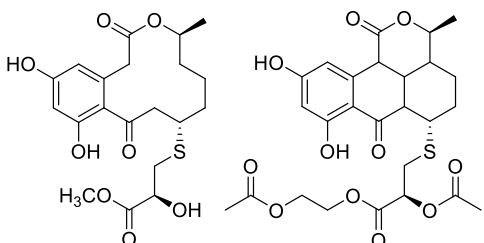
Asimismo, dentro de esta sección se han reportado otros policétidos comunes tales como la curvularina (3), la terreina (4), diversas antraquinonas, bisantronas y cromanos; alcaloides indólicos como las paxilinas (15), las okaraminas (16) y las citrinadinas (17), alcaloides quinolínicos como las quinolactacinas (95-97), las quinocitrininas (18) y la quinolactacida (19), quinazolino-benzodiazepinas como las benzomalvinas (94); terpenoides como los ácidos tanzawaicos (21), sesquiterpenoides de tipo eremofilano (22-24) y sesterterpenos como el 24-*epi*-ciclocitrinol (25); y por último, metabolitos de biogénesis mixta como las decaturinas (27), las perinadinas (31) y numerosos derivados de la citrinina (1), entre otros (Houbraken et al., 2010; Houbraken et al., 2011b).

En el Cuadro 2 se resumen algunos de los metabolitos secundarios biodinámicos más comunes descritos en la sección *Citrina*, así como otros productos reportados recientemente, todos clasificados de acuerdo con su biogénesis.

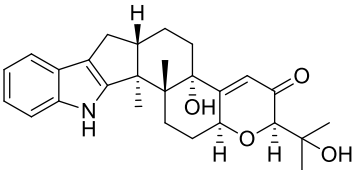
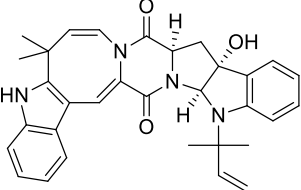
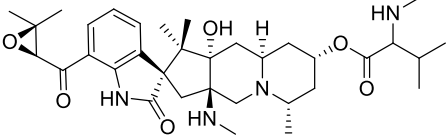
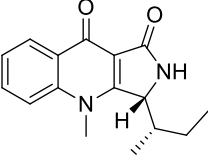
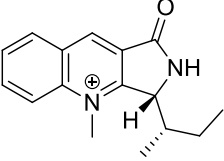
Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Citrina*.

POLICÉTIDOS			
Especie/origen	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Citrinina (1)		
<i>Penicillium</i> spp.		Nefrotóxico Hepatotóxico Genotóxico	Gayathri et al., 2015
	Citreoviridina (2)		
<i>Penicillium</i> spp.		Inhibidor de la ATP sintetasa mitocondrial	Datta y Ghosh, 1981
	Curvularina (3)		
<i>Penicillium</i> spp.		Antimicrobiano Fitotóxico	Meepagala et al., 2016
	Terreina (4)		
<i>Penicillium</i> spp.		Antimicrobiano Fitotóxico	Houbraken et al., 2011b
	(Z)-7,4'-dimetoxi-6-hidroxi-aurona-4-O-β-glucopiranosido (5)		
<i>P. citrinum</i> (endófito de <i>Bruguiera</i> <i>gymnorrhiza</i>)		Neuroprotector	Wu et al., 2015
	Pennicitrinona C (6) y penicitrinol B (7)		
<i>P. citrinum</i> (aislado de suelo)		Antioxidantes	Lu et al., 2008

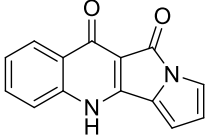
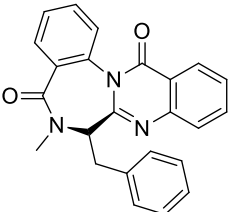
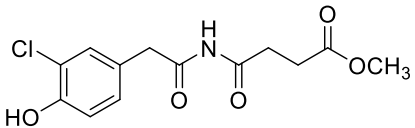
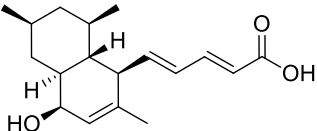
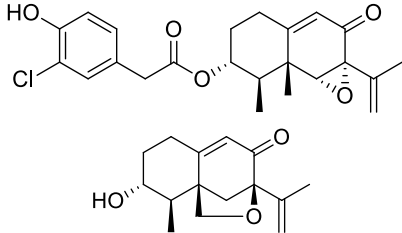
Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Citrina* (cont.).

POLICÉTIDOS			
Especie/origen	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
<i>P. citrinum</i> (marino)	Citrifelinas A (8) y B (9)	Antibacteriano	Meng et al., 2015
	 <p>8 R = -H 9 R = -OH</p>		
<i>P. citrinum</i> (marino)	Penicilantranina A (10)	Antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Khamthong et al., 2012
<i>P. paxilli</i> (marino)	Pirenocina A (11)	Antiinflamatorio	Toledo et al., 2014
<i>P. roseopurpureum</i> (acuático)	Roseopurpurina H (12)	Citotóxico sobre líneas de cáncer SW620, NCI-H460, KB3-1 y HepG2	Shang et al., 2016
<i>P. sumatrense</i> (micorriza de <i>Lumnitzera racemosa</i>)	Sumalarina A (13) y C (14)	Citotóxicos sobre líneas de cáncer Du145, HeLa, Huh 7, MCF-7, NCI-H460, SGC-7901 y SW1990	Meng et al., 2013
			

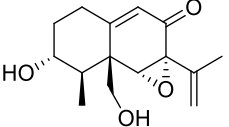
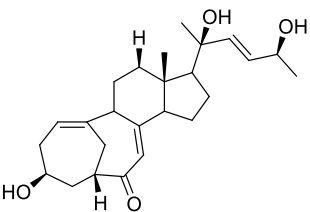
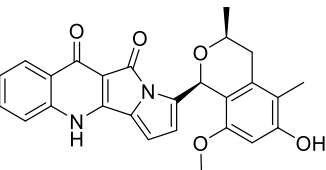
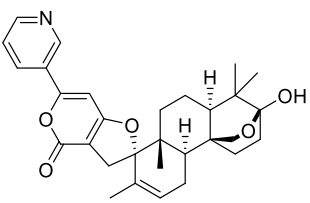
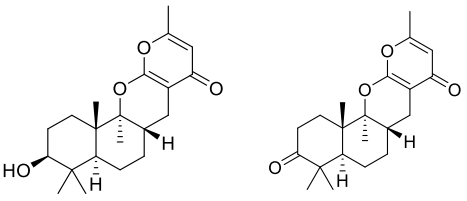
Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Citrina* (cont.).

ALCALOIDES			
Especie/origen	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Paxillina (15)		
<i>P. paxilli</i>		Antiviral sobre H1N1	Fan et al., 2013
	Okaramina A (16)		
<i>Penicillium</i> spp.		Insecticida	Murao et al., 1988
	Citrinadina A (17)		
<i>P. citrinum</i> (marino)		Citotóxico sobre leucemia murina L-1210 y carcinoma humano KB	Tsuda et al., 2004
	Quinolactacina A1 (95)		
<i>P. citrinum</i>		Inhibidor de acetilcolinesterasa	Kim et al., 2001
	Quinocitrinina A (18)		
<i>P. citrinum</i> (aislado de permafrost)		Citotóxico sobre células L-929 y K-562	Kozlovsky et al., 2003

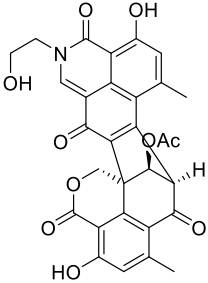
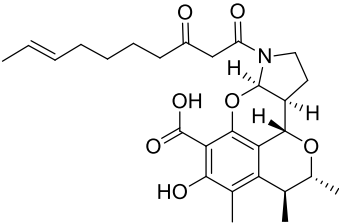
Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Citrina* (cont.).

ALCALOIDES			
Especie/origen	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Quinolactacida (19)		
<i>P. citrinum</i> (aislado de suelo)		Insecticida	Abe et al., 2005
	Benzomalvina A (94)		
<i>Penicillium</i> spp.		Antagonista de receptores NK1	Sun et al., 1994
	Penicilimida (20)		
<i>P. copticola</i> (marino)		Antifúngica contra <i>Mucor hiemalis</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>	Bu et al., 2015
TERPENOIDES			
	Ácido tanzawaico Q (21)		
<i>P. steckii</i> (marino)		Antiinflamatorio	Shin et al., 2016
	Penicileremofilanos A (22) y B (23)		
<i>P. copticola</i> (aislado de suelo)		Antiprotozoaria contra <i>Plasmodium</i> <i>falciparium</i>	Daengrot et al., 2015

Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Citrina* (cont.).

TERPENOIDES			
Especie/origen	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Eremofilano JBIR-28 (24)		
<i>Penicillium</i> sp. (marino)		Citotóxico contra células de cáncer de cérvix HeLa	Motohashi et al., 2009
	24-Epi-ciclocitrinol (25)		
<i>P. citrinum</i> (aislado de cenizas volcánicas)		Induce la producción de AMPc en células CHO	Du et al., 2008
BIOGÉNESIS MIXTA			
	Citriquinocromano (26)		
<i>P. citrinum</i> (endófito de <i>Ceratonia siliqua</i>)		Citotóxico contra la línea celular de linfoma L5178Y	El-Neketi et al., 2013
	Decaturina C (27)		
<i>P. decaturense</i> (aislado de madera en descomposición)		Insecticida	Macías et al., 2014
	Penicilipironas A (28) y B (29)		
<i>Penicillium</i> sp. (marino)		Inductores de la quinona reductasa en células de cáncer Hepa 1c1c7	Liao et al., 2014

Cuadro 2. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Citrina* (cont.).

BIOGÉNESIS MIXTA			
Especie/origen	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Duclauxamida A1 (30)		
<i>P. manginii</i> (endófito de <i>Panax notoginseng</i>)		Citotóxico contra las líneas celulares HL-60, SMML-7721, A-549, MCF-7 y SW480	Cao et al., 2015
	Perinadina A (31)		
<i>P. citrinum</i>		Antibacteriano contra <i>Micrococcus luteus</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Sasaki et al., 2005

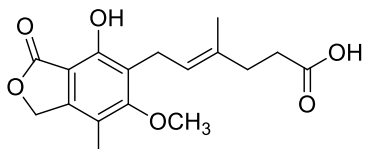
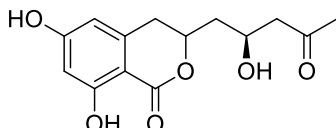
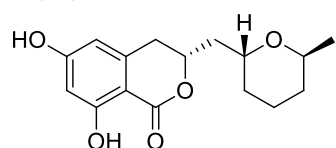
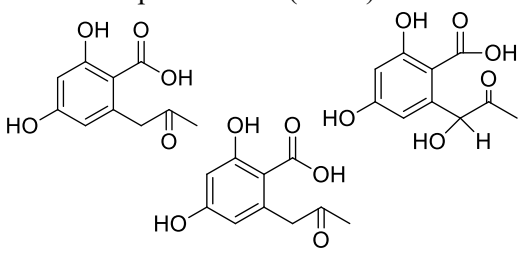
2.1.4.2 Metabolitos secundarios biodinámicos producidos por especies del género *Penicillium* sección *Brevicompecta*

La sección *Brevicompecta* está conformada por diez especies (Anexo A-2) las cuales se caracterizan por presentar conidióforos terverticilados, estipes robustas y conidios elipsoides dispuestos en cadenas largas (Wang y Wang, 2013). Esta sección está representada por la especie *Penicillium brevicompectum*, la cual se distingue por biosintetizar el ácido micofenólico (32). Este metabolito secundario con propiedades inmunosupresoras se aprobó desde 1995 por la FDA para evitar el rechazo en pacientes con trasplantes de órganos (Patel et al., 2016).

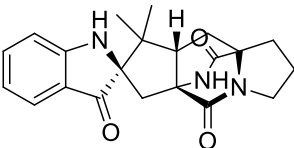
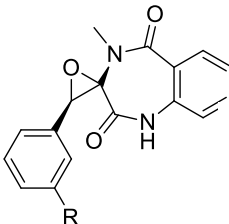
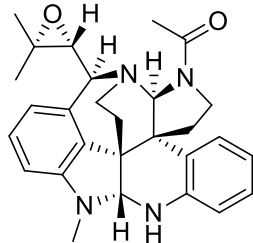
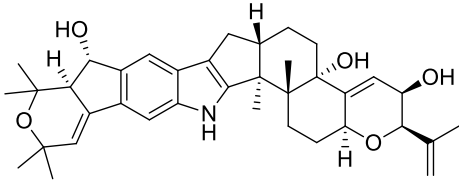
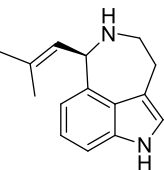
Además de este importante producto natural, en esta sección se han reportado otros metabolitos secundarios bioactivos (Cuadro 3), incluyendo policétidos como la citreoisocumarina (33), la asperentina (34) y fenoles de tipo Raistrick [ácido 2,4-dihidroxi-

6-(2-oxopropil)-benzoico (35), ácido 2,4-dihidroxi-6-(1-hidroxi-2-oxopropil)-benzoico (36) y ácido 2,4-dihidroxi-6-(1,2-dioxopropil)-benzoico (37)] los cuales sirven como criterio quimiotaxonómico para la identificación de *P. brevicompactum* y especies relacionadas (Andersen, 1991); alcaloides diversos como las brevianamidas (38), la ciclopenina (39) y el ciclofenol (40), las comunesinas (41), los janthitrens (42), la aurantioclavina, (43), el viridicatol (44), la paspalina (45), el asperfenamato (99), las paxilinas (15), las quinolactacinas (95-97), las benzomalvinas (94) y las perinadinas (31); y finalmente, terpenoides como las brevionas (46) y la compactina (47) [Frisvad et al., 2013].

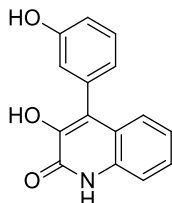
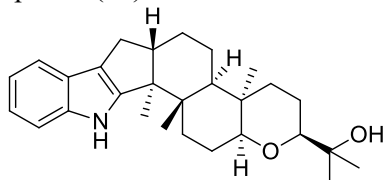
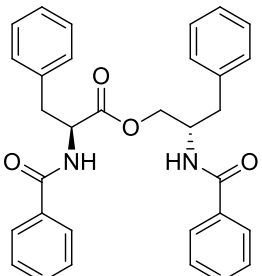
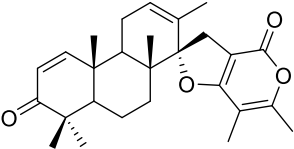
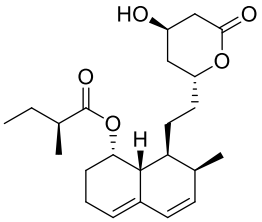
Cuadro 3. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Brevicompacta*.

POLICÉTIDOS			
Especie	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Ácido micofenólico (32)		
<i>P. brevicompactum</i>		Inmunosupresor	Patel et al., 2016
	Citreoisocumarina (33)		
<i>Penicillium buchwaldii</i>		Desconocida	Frisvad et al., 2013
	Asperentina (34)		
<i>Penicillium buchwaldii</i>		Antifúngica	Hanson, 2008
	Fenoles tipo Raistrick (35-37)		
<i>P. brevicompactum</i>		Desconocida	Andersen, 1991

Cuadro 3. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Brevicompecta* (cont.).

ALCALOIDES			
Especie	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Brevianamida A (38)		
<i>P. brevicompactum</i>		Insecticida	Finefield et al., 2012
	Ciclopenina (39) y ciclopol (40)		
<i>Penicillium</i> spp.	 <p style="text-align: center;">39 R= -H 40 R= -OH</p>	Fitotóxicos	Cutler et al., 1984
	Comunesina A (41)		
<i>Penicillium</i> spp.		Insecticida	Zuo y Ma, 2011
	Janthitrem B (42)		
<i>Penicillium</i> spp.		Neurotóxico	Wilkins et al., 1992
	Aurantioclavina (43)		
<i>Penicillium</i> spp.		Desconocida	Frisvad et al., 2013

Cuadro 3. Ejemplos representativos de metabolitos secundarios biodinámicos de especies selectas de la sección *Brevicompacta* (cont.).

ALCALOIDES			
Especie	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Ref.
	Viridicatol (44)		
<i>Penicillium</i> spp.		Antiinflamatorio	Ko et al., 2015
	Paspalina (45)		
<i>Penicillium</i> spp.		Desconocida	Frisvad et al., 2013
	Asperfenamato (99)		
<i>Penicillium</i> spp.		Antitumoral	Frisvad et al., 2013
TERPENOIDES			
	Breviona A (46)		
<i>P. brevicompactum</i>		Herbicida	Macías et al., 2014
	Compactina (47)		
<i>Penicillium</i> spp.		Hipocolesterolemiantes	Chakravarti y Sahai, 2004

2.2 Los biopesticidas

2.2.1 Aspectos generales

Desde los inicios de la agricultura, hace más de 10 mil años, el ser humano ha tenido que hacer frente a una serie de problemas que afectan la productividad y/o la calidad de los cultivos, entre ellos, los factores bióticos como malezas, animales (insectos, roedores, aves, etc.) o microorganismos (hongos, bacterias, virus, etc.). En los últimos 50 años, el control de estos organismos considerados plagas, se ha basado mayoritariamente en el uso de productos químicos sintéticos o plaguicidas (Oerke, 2006), no obstante, estas sustancias son potencialmente tóxicas para los humanos y para otros organismos, además de persistir en el medio ambiente (Mrema et al., 2013). Por esta razón, la industria agroquímica se está enfocando cada vez más a la búsqueda de nuevos *biopesticidas* para el control de las distintas plagas que afectan a los cultivos de interés comercial (Seiber et al., 2014).

Los biopesticidas son plaguicidas derivados de fuentes naturales tales como animales, plantas, microorganismos y minerales. De acuerdo con esta definición, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) los clasifica en tres categorías: 1) Los biopesticidas bioquímicos, que son aquellas sustancias de origen natural utilizadas para el control de plagas; 2) los protectores incorporados (PIPs), que son plantas modificadas genéticamente para que produzcan y liberen sustancias tóxicas para la plaga; 3) los agentes de control biológico, que son microorganismos como bacterias u hongos que eliminan o controlan de manera específica ciertas plagas (www.epa.gov/pesticides/biopesticides). Así, los metabolitos secundarios derivados de plantas o microorganismos, que se utilicen para el control de cualquier plaga, se incluyen en la primera categoría (Seiber et al., 2014).

Con base en una revisión de Cantrell y colaboradores (2012), en el periodo comprendido de 1997 a 2010, se registraron por la EPA 168 nuevos principios activos como biopesticidas, incluyendo entre estos, 92 productos naturales derivados de distintos organismos, lo que corresponde a más del 35% de todos los plaguicidas convencionales y biopesticidas registrados (Figura 2). Hasta abril de 2016, existían 299 biopesticidas registrados por la misma agencia.

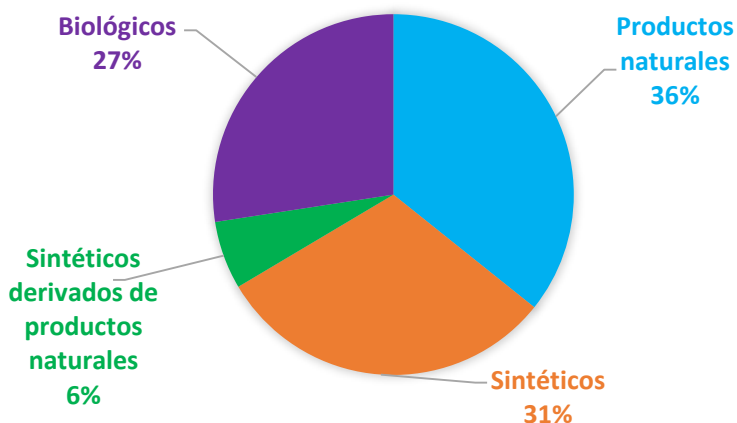


Figura 2. Ingredientes activos registrados como plaguicidas convencionales o biopesticidas de 1997 a 2010 (Adaptado de Cantrell et al., 2012).

Además de derivar de fuentes naturales, es deseable que los biopesticidas cuenten con características tales como: baja toxicidad para los organismos que no son blanco, principalmente mamíferos, baja persistencia en el medio ambiente, que sean utilizables en cultivos orgánicos, y finalmente, que se produzcan a través de una tecnología verde (Seiber et al., 2014).

2.2.2 Productos naturales como fuente potencial de agentes agroquímicos

En el año 2015 los Doctores William C. Campbell y Satoshi Ōmura fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de las avermectinas, una serie de lactonas macrocíclicas producidas por *Streptomyces avermitilis* que poseen potente actividad antihelmíntica, insecticida y acaricida (Burg et al., 1979). Estos productos naturales no solo han servido para el desarrollo de fármacos antiparasitarios como la ivermectina (Campbell, 2012), sino que también, fungen como principios activos en algunos pesticidas como la abamectina, la cual consta de una mezcla de avermectina B1a (**48**) y B1b (**49**) (Pitterna et al., 2009).

Sin duda alguna otro de los ejemplos que destaca la importancia de los productos naturales como fuente de prototipos para el desarrollo de agentes agroquímicos son los

piretroides. Estas sustancias insecticidas, ampliamente utilizadas en la agricultura y en aerosoles domésticos, se desarrollaron con base en las piretrinas I (**50**) y II (**51**) obtenidas de las flores del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) [Matsuda, 2012].

Otros ejemplo importantes de agentes agroquímicos de origen natural son el spinosad, un agente insecticida utilizado en numerosos cultivos, constituido por espinosinas A (**52**) y D (**53**), aisladas del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Kirst, 2010); las fitoalexinas producidas por diversas plantas como el 3*R*-(-)-vestitol (**54**), las cuales tienen propiedades insecticidas y antifúngicas (Jeandet, 2015); los agentes aleloquímicos de *Callistemon citrinus* como la leptospermona (**55**), la cual sirvió de prototipo para el desarrollo de los herbicidas comerciales mesotrione y tembotrione (Owens et al., 2013); y finalmente, algunos monoterpenoides derivados de aceites esenciales de plantas como el eucaliptol (**56**) y el geraniol (**57**), que pueden tener propiedades herbicidas, insecticidas o fungicidas (Petroski y Stanley, 2009).

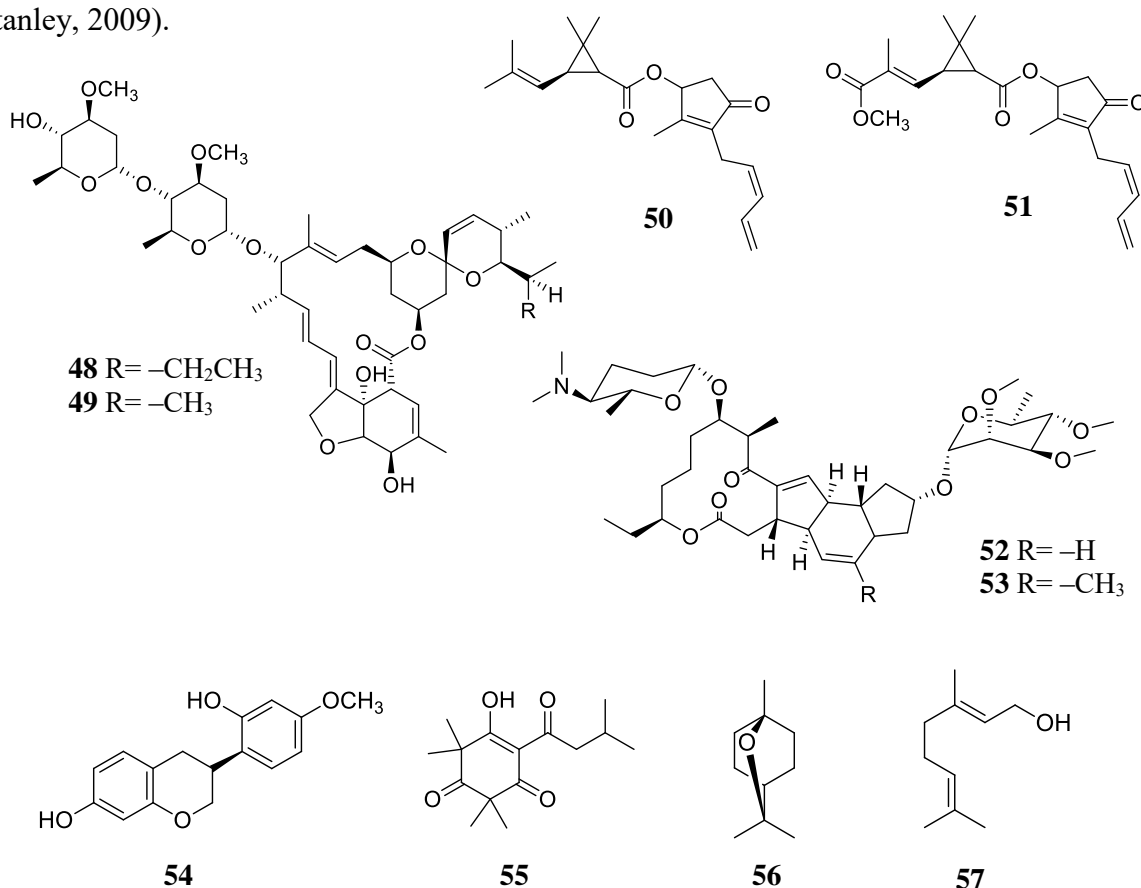


Figura 3. Ejemplos selectos de agentes agroquímicos de origen natural.

2.2.3. Control de malezas

Dentro de los organismos considerados como plagas, las malezas son las que provocan las mayores pérdidas económicas en la agricultura (Oerke, 2006). Una maleza es cualquier planta indeseable o problemática, que crece de manera abundante y que afecta los intereses del hombre en un lugar y tiempo determinado. Existen diversos métodos para el control de las malezas incluyendo métodos físicos basados en la eliminación mecánica, los métodos biológicos mediante el uso de agentes de control como bacterias u hongos, y el control químico a través del uso de herbicidas (www.fao.org).

Un herbicida es una sustancia o mezcla de sustancias utilizada para matar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas indeseables (<http://www.inecc.gob.mx>). En la actualidad existe un amplio número de herbicidas sintéticos que se emplean en todo el mundo; no obstante, estos tienden a producir efectos adversos en humanos y en el medio ambiente y además, suelen generar resistencia en las plagas (Petroski y Stanley, 2009).

2.2.4 Productos naturales como fuente potencial de herbicidas

Los herbicidas de origen natural ofrecen una alternativa más amigable con el medio ambiente y son más seguros para el ser humano (Gupta y Dikshit, 2010). Actualmente existen en el mercado algunos herbicidas de origen natural tales como el glufosinato (58) y el bialaphos (59) que derivan de los microorganismos *Streptomyces hygroscopicus* y *S. viridochromogenes*, respectivamente (Duke et al., 2000); algunos otros se encuentran en desarrollo por empresas agroquímicas como la mevalocidina (60), descubierta a partir del hongo *Fusarium* sp. (Gerwick et al., 2013), y la thaxtomina A (61) de *Streptomyces* sp. (King y Calhoun, 2009).

Asimismo, existen diversos reportes de agentes fitotóxicos de origen fúngico que pueden ser una valiosa herramienta para el diseño de bioherbicidas (Cimmino et al., 2015). En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se han reportado algunas fitotoxinas obtenidas de diversos ascomicetos como la malbrancheamida A (62), aislada a partir del hongo coprófilo *Malbranchea aurantiaca* (Martínez-Luis et al., 2006); las naftopiranonas 63 y 64 aisladas de *Guanomyces polythrix* (Macías et al., 2001); la vermelhotina (65) del hongo

MEXU26343 (Leyte-Lugo et al., 2012); y la nonenólida **66** de *Phoma herbarum* (Rivero-Cruz et al., 2003).

En otros grupos de trabajo se han reportado otras fitotoxinas como la ascaulitoxina (**67**) de *Ascochyta caulina* (Evidente et al., 1998); el agropirenonol (**68**) y agropirenonal (**69**) de *Ascochyta agropyrina* (Andolfi et al., 2012); la citochalasinina (**70**) y diversos derivados de la misma que son producidos por algunas especies fúngicas (Cimmino et al., 2015); y las palmarumicinas (**71**) y las preusomerinas (**72**) de *Edenia gomez-pompe* (Macías-Rubalcava et al., 2014), entre otros.

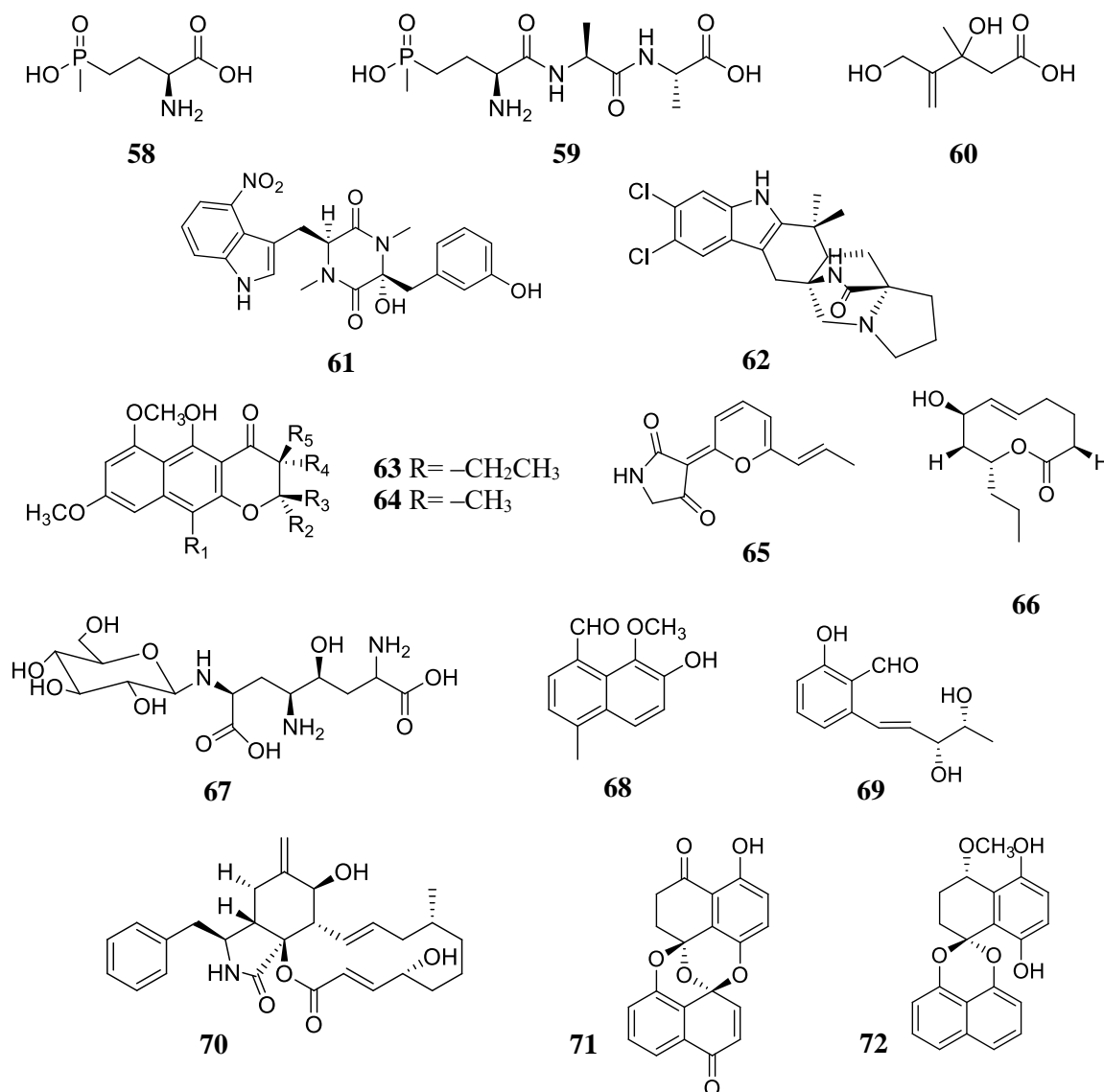


Figura 4. Ejemplos representativos de agentes fitotóxicos de origen natural.

2.3 Las α -glucosidasas

2.3.1 Aspectos generales

Las α -glucosidasas, también nombradas maltasas-glucoamilasas (número EC 3.2.1.20), son un grupo de enzimas fundamentales para el metabolismo primario de los carbohidratos que pertenecen a la familia de las glicosil-hidrolasas (GH). En mamíferos estas enzimas se encuentran en las microvellosidades del intestino delgado en donde catalizan la exohidrólisis de enlaces glicosídicos no reductores de tipo α (1 \rightarrow 4) de diversos sustratos, incluyendo polisacáridos, oligosacáridos y glicoconjugados para la liberación de α -D-glucosa y su posterior utilización (Ren et al., 2011). Otras enzimas relacionadas son la sacarasa-isomaltasa (EC 3.2.1.10) la cual cataliza la ruptura de enlaces α (1 \rightarrow 6), y la α -amilasa (EC 3.2.1.1) que actúa en la endohidrólisis de enlaces α (1 \rightarrow 4) [Borges de Melo, et al., 2006].

La hidrólisis que catalizan las α -glucosidasas se lleva a cabo de forma específica dependiendo del número de unidades de azúcar presentes en el sustrato y de la configuración de los grupos hidroxilos, y ocurre a través de una catálisis ácida en donde un aminoácido actúa como donador de protones, mientras que otro realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico, formando así un intermediario glicosil-enzima que finalmente se hidroliza con la participación de una molécula de agua (Figura 5).

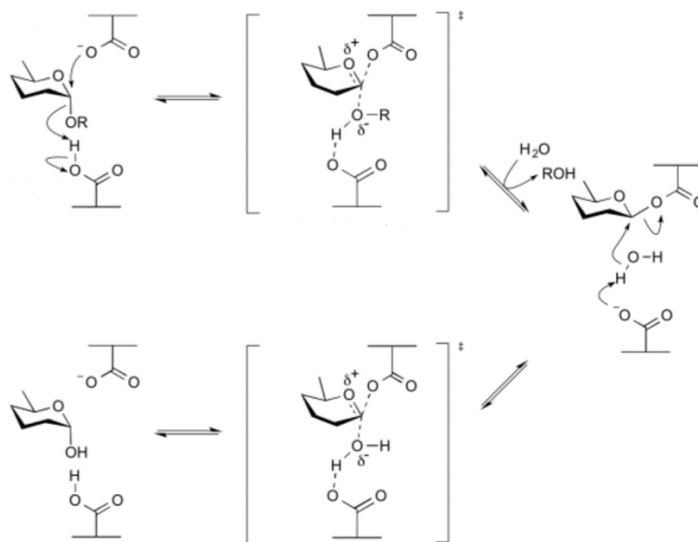


Figura 5. Mecanismo de exohidrólisis catalizado por las enzimas α -glucosidasas (adaptado de Davies y Henrissat, 1995).

2.3.2 Inhibidores de α -glucosidasas

Debido a su importancia en el metabolismo de carbohidratos, las α -glucosidasas (y enzimas relacionadas) constituyen un blanco molecular en la terapia farmacológica de la diabetes mellitus tipo II (DMT2), ya que su inhibición permite retardar la absorción intestinal de glucosa y así evitar la hiperglucemia postprandial, además de estimular la secreción de incretina GLP1 (DeFronzo et al., 2015).

En los años 90 Canadá aprobó el primer fármaco inhibidor de las enzimas α -glucosidasas: la acarbosa (**73**), un oligosacárido obtenido de *Actinoplanes utahensis*. Posteriormente, este fármaco fue aprobado por la FDA y en la actualidad se sigue utilizando en todo el mundo como parte de la estrategia farmacológica para la terapia de la DMT2, ya sea solo o en combinación con otros agentes terapéuticos como la metformina o la glibenclamida (Israili, 2011). Asimismo, otros fármacos que son inhibidores de las α -glucosidasas desarrollados para el mismo propósito son el miglitol (**74**) y la voglibosa (**75**), ambos derivados de fuentes naturales (Dabhi et al., 2013).

Con el alarmante aumento en la prevalencia de la DMT2 a nivel mundial, la búsqueda de nuevas entidades químicas que permitan el desarrollo de agentes terapéuticos eficaces se ha incrementado considerablemente. Así, de forma particular, un número importante de productos naturales derivados tanto de plantas como de microorganismos han sido reportados como inhibidores de α -glucosidasas (Figura 6), incluyendo entre estos disacáridos como la kojibiosa (**76**); pseudoaminoazúcares como la acarbosa (**73**) y la voglibosa (**75**); tiosacáridos como el kotalanol (**77**); alcaloides polihidroxilados como la 1-desoxinojirimicina (**78**) y el miglitol (**74**), entre otros.

De forma particular, algunos productos naturales aislados de ascomicetos se han descrito como inhibidores de α -glucosidasas dentro de los que se encuentran el aspergilusol A (**79**) del hongo *Aspergillus aculeatus* (Ingavat et al., 2009); la pinazafilona B (**80**) y penifupirona (**81**) del hongo endófito *Penicillium* sp. HN29-3B1 (Liu et al., 2015); las thielavinas A, J y K (**82-84**) del hongo endófito MEXU27095 (Rivera-Chávez et al., 2013); las hidroximeleinas **85** y **86** del hongo *Xylaria feejeensis* (Rivera-Chávez et al., 2015); las minimoidionas A (**87**) y B (**88**) de *Preussia minimoides* (Rangel-Grimaldo et al., 2016), entre otros.

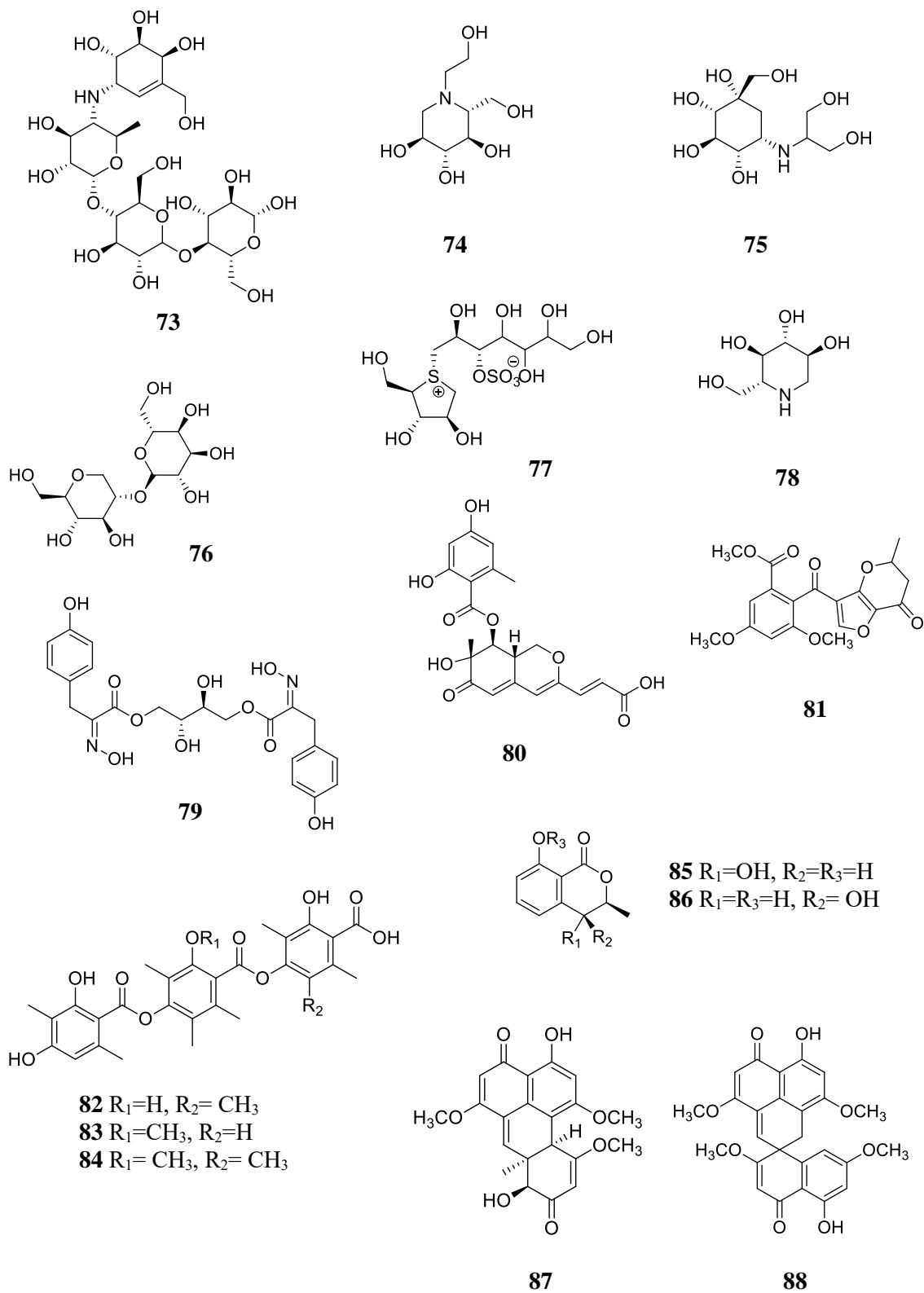


Figura 6. Ejemplos representativos de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas derivados de plantas o microorganismos.

3. HIPÓTESIS

Los criterios de selección quimiotaxónico y ecológico, en conjunto con los resultados de evaluaciones biológicas preliminares, sugieren que los aislamientos fúngicos G1-a14 y G1-B35 obtenidos de la cueva Chontalcoatlán son candidatos idóneos para estudios de bioprospección con miras al descubrimiento de agentes herbicidas o antidiabéticos potenciales.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), las malezas constituyen una amenaza importante para los intereses y actividades del hombre. Estas plantas son frecuentemente descritas como dañinas a los sistemas de producción de cultivos y también a los procesos industriales y comerciales. Este daño puede ser medido como pérdida del rendimiento agrícola por unidad de área cultivable, o también, reflejado en la productividad de una empresa comercial. De manera general se acepta que las malezas ocasionan una pérdida directa aproximada del 10% de la producción agrícola. Así por ejemplo, en el caso de los cereales, esta pérdida es del orden de más de 150 millones de toneladas al año (www.fao.org). Para combatir este problema se usan herbicidas principalmente de origen sintético; sin embargo, estos productos generan contaminación ambiental y resistencia, por ende es necesaria la búsqueda continua de nuevos productos que disminuyan los efectos no deseados de los herbicidas convencionales. En este sentido, los microorganismos, en particular las bacterias y hongos, han demostrado ser una fuente relevante de agentes fitotóxicos con un buen potencial para el desarrollo de nuevos herbicidas amigables con el medio ambiente (Cimmino et al., 2015).

Estos microorganismos son también frecuentemente estudiados con el fin de descubrir productos de interés terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades, y entre los problemas de salud contemporáneos que requieren de nuevos tratamientos se encuentra la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Esta es una enfermedad crónica y multifactorial caracterizada por la producción y/o uso ineficiente de la insulina, dando lugar a un estado de hiperglucemia que con el tiempo daña a diversos tejidos (DeFronzo et al., 2015). De acuerdo con las estadísticas más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), uno de cada once adultos tiene DMT2, es decir, cerca de 415 millones de personas en todo el mundo padecen esta enfermedad (www.idf.org). En particular, México ocupa el sexto lugar a nivel mundial de prevalencia de DMT2. Esta alarmante situación ha intensificado la búsqueda de nuevas moléculas líderes para el desarrollo de agentes terapéuticos novedosos para atacar la enfermedad en sus diferentes fases.

Con base en las consideraciones mencionadas anteriormente, el objetivo general del presente proyecto consiste en obtener nuevos agentes bioactivos a partir de hongos selectos de la biodiversidad fúngica de México, con la finalidad de contribuir al descubrimiento de productos naturales útiles para el desarrollo de agentes herbicidas y/o antidiabéticos, en particular de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas de utilidad en la condición prediabética y en fases iniciales de la enfermedad. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Obtener el material fúngico a partir de un nicho ecológico novedoso.
- Seleccionar las especies fúngicas más apropiadas para la obtención de agentes bioactivos fitotóxicos y/o inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.
- Aislar los principios bioactivos a partir de los extractos orgánicos de las especies seleccionadas mediante un estudio biodirigido utilizando los mismos ensayos de selección.
- Determinar la estructura molecular de los compuestos bioactivos empleando las técnicas adecuadas. Este procedimiento probablemente conduzca al descubrimiento de estructuras químicas novedosas.
- Realizar los bioensayos pertinentes con la finalidad de determinar la actividad biológica de los productos puros.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material fúngico

5.1.1 Toma de muestras de guano de murciélago

Las muestras de guano se recolectaron en el río subterráneo Chontalcoatlán situado en el municipio de Pilcaya, en el estado de Guerrero, México (localización: 18° 38' 52" N-99° 31' 4" W) en febrero de 2013. Se tomaron dos muestras en distintas locaciones de la caverna utilizando una espátula estéril y de acuerdo con el procedimiento descrito por Derewacz y colaboradores (Derewacz et al., 2014). Las muestras, etiquetadas como G1-a y G1-b, se depositaron y transportaron en tubos de ensayo estériles para su posterior procesamiento.

5.1.2 Tratamiento de las muestras G1-a y G1-b

Cada muestra se resuspendió en 3 mL de agua estéril y se agitó vigorosamente en un agitador tipo vórtex; se tomaron alícuotas de 0.5 mL que se transfirieron a seis cajas Petri estériles de 5 cm de diámetro. Se añadió medio papa-dextrosa agar (PDA) a tres de las cajas y medio agua-agar (AA) a las otras tres restantes. Ambos medios se complementaron previamente con sulfato de estreptomicina (30 mg/L) y rosa de bengala (50 mg/L) de acuerdo con el procedimiento descrito por Choi y colaboradores (Choi *et. al.*, 1999). Los medios se homogeneizaron cuidadosamente y se dejaron solidificar. Se incubó a temperatura ambiente con periodos normales de luz/oscuridad y bajo condiciones aerobias durante dos semanas o hasta observar el crecimiento de colonias fúngicas.

5.1.3 Obtención de cultivos axénicos

Las colonias fúngicas se separaron cuidadosamente utilizando un asa microbiológica estéril bajo condiciones asépticas. Cada colonia aislada se transfirió a medio PDA en cajas Petri de 5 cm y se identificó con una clave alfanumérica (G1-a1, G1-b1, etc.). Las colonias aisladas se dejaron en incubación durante dos semanas a T. amb. y con periodos normales de

luz/oscuridad. Se descartaron aquellos aislamientos en donde se observará el crecimiento de dos o más especies fúngicas. Los aislamientos se clasificaron a *grosso modo* con base en sus características morfológicas macroscópicas, obteniendo un total de 17 cultivos fúngicos axénicos diferentes. Los aislamientos se resembraron periódicamente en medio PDA para su mantenimiento.

5.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron en placas de aluminio (modo analítico) o vidrio (modo preparativo) de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de Merck® (tamaño de partícula 3.5-7.0 ASTM y de 0.25 mm de espesor), empleando las técnicas convencionales de la CCF. Como eluyente se utilizaron diversas mezclas de disolventes orgánicos (hexano, CH₂Cl₂ y CH₃OH). La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV a 254 y 365 nm. Como agentes reveladores se utilizaron soluciones de sulfato sérico amoniacal en ácido sulfúrico y el reactivo de Dragendorff.

Los fraccionamientos por cromatografía en columna abierta (CCA) se efectuaron en columnas de vidrio de diversas dimensiones que se empacaron con gel de sílice Kieselgel 60 de Merck® (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 ASTM) o Sephadex LH-20 de Pharmacia-Biotech®. Como fase móvil se utilizaron diferentes sistemas de elución. Para el gel de sílice se utilizaron mezclas binarias de polaridad creciente preparadas con hexano, CH₂Cl₂ o CH₃OH. En el caso del gel de Sephadex LH-20, se utilizaron mezclas de CH₃OH y CH₂Cl₂.

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters® equipado con un detector UV de arreglo de fotodiodos (PDA-2996) o en un cromatógrafo Waters® equipado con un PDA-2998 acoplado a un detector de luz dispersada tras evaporación (ELSD-2121). Los análisis se realizaron empleando columnas de fase reversa tales como: Symmetry® (C₁₈, 5 µm, 4.6 × 250 mm), SymmetryPrep® (C₁₈, 7 µm 7.8 × 300 mm), Gemini® (C₁₈, 5 µm, 21.2 × 250 mm) y Gemini® (C₁₈, 5 µm, 4.6 × 250 mm). Como fase móvil se utilizaron diversas mezclas de agua, agua acidificada al 0.1% con ácido fórmico, CH₃CN y CH₃OH. El manejo de los equipos y la

adquisición de datos se realizaron con el programa Empower versión 2.0 o 3.0. Para la modalidad preparativa se utilizó un colector de fracciones modelo FC-2152.

5.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se presentan sin corrección. Los espectros de RMN se registraron en cualquiera de los siguientes equipos: Varian Unity Inova a 500 (^1H) y 125 (^{13}C) MHz; Bruker Avance III a 400 (^1H) y 100 (^{13}C) MHz; o Varian a 400 (^1H) y 100 (^{13}C) MHz. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia para los desplazamientos químicos (δ , reportados en ppm) y diversos disolventes deuterados. Los espectros de masas de alta resolución se generaron por el método de ionización por electrospray (HRESIMS) en un espectrómetro Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL o bien, en un espectrómetro JEOL SX-102 por el método de impacto electrónico (EIMS). Los espectros de IR se obtuvieron por reflectancia total atenuada (ATR) utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400 FT-IR. Los espectros de UV se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu U106 en CH_3OH . Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Perkin-Elmer 343 a 25 °C bajo la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) en CH_3OH o agua. Los espectros de dicroísmo circular se adquirieron en un aparato JASCO modelo J720. Por último, los análisis de difracción de rayos X se realizaron en un difractómetro Bruker D8 Venture con una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$; las estructuras se resolvieron por el método SHELXS-2013 y se refinaron por mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 . Estos análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM, en el Instituto de Química, UNAM, o en la Universidad de Carolina del Norte, Greensboro, E.U.A.

5.4 Obtención de los extractos orgánicos en pequeña escala

Las especies fúngicas obtenidas del guano de murciélago se cultivaron en tubos Falcon con 15 mL de medio líquido de papa-dextrosa y se incubaron en agitación (100 rpm) durante ocho días a temperatura ambiente. Con los cultivos líquidos se inocularon 17 matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio de arroz el cual se preparó con 25 g de arroz

comercial y 60 mL de agua seguido de esterilización en autoclave. Los medios sólidos se incubaron durante 21 días a temperatura ambiente con periodos normales de luz-oscuridad.

Para la extracción de los medios sólidos, los cultivos se sometieron a un proceso de maceración con una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH 9:1 (60 mL \times 3). Los extractos se filtraron sobre papel filtro, se trataron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida. Para cada extracto se realizó un fraccionamiento primario por medio de reparto con 20 mL de una mezcla de CH_3CN - CH_3OH 1:1 y hexano (20 mL \times 2). Las fases de CH_3CN - CH_3OH se recolectaron y se reunieron para posteriormente concentrar el disolvente a presión reducida. Las fracciones primarias se pesaron y se analizaron por CCD.

5.5 Estudio químico de la especie *Penicillium* sp. G1-a14

5.5.1 Fermentación, extracción y fraccionamiento

El hongo *Penicillium* sp. G1-a14 se cultivó en dos tubos Falcon conteniendo 15 mL de medio líquido papa-dextrosa en agitación durante ocho días a T. amb. Los inóculos se vertieron en dos matraces Fernbach con medio de arroz (250 g). Los medios sólidos se incubaron a T. amb. durante 30 días con fotoperiodos de 12/12 horas. La extracción del medio de cultivo se llevó a cabo tres veces empleando 500 mL de una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH (9:1). El disolvente se eliminó *in vacuo* para obtener 3 g de un extracto café oscuro. Se realizó un fraccionamiento primario mediante un proceso de reparto con CH_3CN - CH_3OH (1:1) y hexano en volúmenes iguales. Las fases de CH_3CN - CH_3OH se combinaron y se evaporó el disolvente *in vacuo* para obtener 1.5 g de una fracción desgrasada. Un gramo de esta última se sometió a un fraccionamiento por CCA sobre gel de Sephadex LH-20 empleando como fase móvil CH_3OH - CH_2Cl_2 (9:1). De este fraccionamiento se obtuvieron 5 fracciones secundarias (F1-5).

5.5.2 Aislamiento, purificación e identificación de los eremofilanos 89-92

La resolución de la fracción activa F4 (350 mg) por CCA sobre gel de sílice empleando como fase móvil un gradiente de hexano- CH_2Cl_2 (100:0 \rightarrow 0:100) y CH_2Cl_2 -

CH₃OH (100:0 → 50:50) permitió la obtención de 10 fracciones (F4_{I-X}). A partir de la F4_{IX} se aislaron 18.8 mg del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**).

Los eremofilanos **90** (4.3 mg) y **91** (10.2 mg) se purificaron a partir de la fracción F4_V mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de tipo preparativa con una columna Gemini C₁₈ (5 μm, 21.2 × 250 mm), utilizando como fase móvil una mezcla de CH₃OH-H₂O (acidificada con 0.1% de ácido fórmico) 1:1, incrementando linealmente hasta 80% de CH₃OH durante 30 minutos con un flujo constante de 18 mL/min. Finalmente, a partir de F4_{VII} se obtuvieron 15.8 mg del eremofilano **92**. Los eremofilanos **90-92** se caracterizaron como isopetasol, sporogen AO-1 y dihidrosporogen AO-1, respectivamente, por comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos previamente reportados en la literatura.

3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**): sólido blanco cristalino (CHCl₃); pf. 193°C; [α]²⁰_D -13.68 (*c* 1.9, H₂O); UV (H₂O) λ_{max} (log ε) 255.2 (4.2) nm; IR (ATR) ν_{max} 1650 y 3500 cm⁻¹; ¹H-RMN y ¹³C-RMN: ver Cuadro 5; ESIMS *m/z* 273 [M + Na]⁺ (82), 251 (61), 233 (65), 215 (100), 188 (5), 161 (4), 122 (5); HRESIMS *m/z* 251.1646 [M + H]⁺ (calcd. para C₁₅H₂₃O₃, 251.1642).

Isopetasol (**90**): sólido blanco amorfo; [α]²⁰_D +68.3 (CH₃Cl, *c* 1.9). UV (CH₃OH) λ_{max} (log ε) 243 (3.9), 278 (3.5) nm. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 0.99 (3H, s, H-14), 1.12 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, H-15), 1.86 (3H, d, *J*= 1.3 Hz, H-13), 2.10 (3H, *d*, *J*= 2.1 Hz, H-12), 2.92 (1H, d, *J*= 13.7 Hz, H-6), 3.59 (1H, td, *J*= 10.8, 4.3 Hz, H-3), 5.78 (1H, br s, H-9). ¹³C-RMN δ_C (ppm): 10.6 (C-15), 17.1 (C-14), 22.0 (C-12), 22.5 (C-13), 30.3 (C-1), 35.3 (C-2), 41.2 (C-6), 42.0 (C-5), 49.1 (C-4), 71.6 (C-3), 127.0 (C-9), 127.7 (C-7), 143.7 (C-11), 166.6 (C-10), 192.6 (C-8). EIMS *m/z*: 248 [M+H]⁺, 216 [M-H₂O]⁺, 201, 161, 147, 91.

Sporogen AO-1 (**91**): sólido blanco amorfo; [α]²⁰_D +217 (*c* 0.21, CH₃Cl); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 1.21 (3H, s, H-14), 1.25 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, H-15), 1.86 (3H, br s, H-13), 3.32 (1H, s, H-6), 3.62 (1H, td, *J*= 10.8, 4.3 Hz, H-3), 5.11 (2H, d, *J*= 5.8 Hz, H-12), 5.76 (1H, br s, H-9). ¹³C-RMN δ_C (ppm): 11.1 (C-15), 18.6 (C-14), 19.6 (C-13), 30.8 (C-1), 35.2 (C-2), 41.0 (C-5), 44.3 (C-4), 63.6 (C-7), 68.4 (C-6), 71.1 (C-3), 114.8 (C-12),

121.6 (C-9), 139.6 (C-11), 163.5 (C-10), 193.6 (C-8). EIMS m/z : 271 $[M+Na]^+$, 233, 230, 204, 189.

Dihidrosporogen AO-1 (**92**): sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{20} +104$ (c 0.84, CH_3OH). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm): 1.01 (3H, s, H-14), 1.16 (3H, d, $J= 6.5$ Hz, H-15), 1.62 (1H, dq, $J= 10.5, 6.5$ Hz, H-4), 1.87 (3H, br s, H-13), 3.07 (1H, s, H-6), 3.51 (1H, td, $J= 10.9, 4.3$ Hz, H-3), 4.51 (1H, t, $J= 3.0$ Hz, H-8), 5.05 (1H, m, H-12), 5.17 (1H, br s, H-12), 5.25 (1H, br t, $J= 2.0$ Hz, H-9). ^{13}C -RMN δ_C (ppm): 11.0 (C-15), 17.4 (C-14), 19.4 (C-13), 30.1 (C-1), 35.6 (C-2), 38.6 (C-5), 43.6 (C-4), 65.4 (C-8), 65.6 (C-7), 67.9 (C-6), 71.9 (C-3), 113.8 (C-12), 119.9 (C-9), 140.9 (C-10), 142.6 (C-11). EIMS m/z : 273.14 $[M+Na]^+$.

5.6 Estudio químico de la especie *Penicillium spathulatum* B35

5.6.1 Fermentación, extracción y fraccionamiento

El hongo *Penicillium spathulatum* G1-b35 se cultivó en cinco tubos Falcon con 15 mL de medio líquido papa-dextrosa en agitación durante ocho días a T. amb. Posteriormente, se inocularon cinco matraces Fernbach con medio de arroz (200 g) que se incubaron a T. amb. durante 40 días. La extracción del medio de cultivo se llevó a cabo exhaustivamente con una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH (8:2) mediante procesos de maceración. El disolvente se eliminó *in vacuo* para obtener 16 g de un extracto negro. Se realizó un fraccionamiento primario mediante un proceso de reparto con CH_3CN - CH_3OH (1:1) y hexano en volúmenes iguales. La fase de CH_3CN - CH_3OH se evaporó a sequedad para obtener 5.5 g de una fracción desgrasada, misma que fue analizada por CCD empleando como solución reveladora el reactivo de Dragendorff.

5.4 g de la fracción desgrasada se sometieron a un fraccionamiento por CCA sobre gel de sílice (700 mL) utilizando un gradiente de elución de CH_2Cl_2 y CH_3OH (100:0→0:100) para generar 10 fracciones (Fr I-X). A partir de la Fr II precipitó un sólido amarillento con hexano. El precipitado se separó por decantación y se lavó varias veces con el mismo disolvente. La separación de este precipitado por medio de CLAR en el modo preparativo, utilizando como fase móvil una mezcla de CH_3CN - H_2O (80:20) y una columna de fase reversa Gemini C_{18} , (5 μ m, 21.2 × 250 mm), permitió el aislamiento de la

benzomalvina A (**94a**, $t_R = 5.8$; **94b**, $t_R = 4.9$) como una mezcla inseparable de atropoisómeros (150 mg), y el asperfenamato (**99**, 15 mg, $t_R = 7.5$). Por otra parte, a partir de la Fr V (25 mg) se separaron 5 mg de la polihidroxiانtraquinona halogenada novedosa **100** por medio de CCA sobre Sephadex LH-20 con $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9:1) como eluyente. La resolución de la Fr VIII (450 mg) por CCA sobre Sephadex LH-20 con $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9:1) permitió la separación de la quinolactacina A1 (**95**) y A2 (**96**) como una mezcla de epímeros (80 mg), y de la quinolonimida (**98**, 20 mg). Finalmente, a partir de la Fr IX se separó la quinolactacina B (**97**, 15 mg) como un racemato por medio de CCA sobre gel sílice utilizando un gradiente de elución de CH_2Cl_2 y CH_3OH (100:0→0:100). Los compuestos **94-99** se caracterizaron mediante la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos previamente reportados previamente.

Benzomalvina A (**94**): sólido blanco amorfo; $[\alpha]_D^{20} -106$ (c 1.0, CH_3OH). UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 234 (4.3), 269 (3.9), 280 (7.8), 312 (3.5), 323 (3.4) nm. ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 3.09 (3H, s, H-27), 3.42 (1H, dd, $J = 14.6, 6.9$ Hz, H-20), 3.80 (1H, dd, $J = 14.6, 7.9$ Hz, H-20), 4.88 (1H, t, $J = 7.4$, H-19), 7.00- 8.33 (H arom); ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 27.9 (C-27), 33.1 (C-20), 58.3 (C-19), 121.7- 149.9 (C arom), 51.8 (C-18), 161.2 (C-10), 167.3 (C-3). HRESIMS m/z : 382.1531 $[\text{M} + \text{H}^+]^+$.

Quinolactacina A1 (**95**): sólido blanco cristalino; $[\alpha]_D^{20} +17.9$ (c 0.13, DMSO). UV (CH_3OH) λ_{max} : 216, 257, 316. IR (ATR): 3197, 2964, 2934, 2876, 1693, 1063, 1546, 1518, 1464, 1421, 1269. 1218, 755, 531. ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 0.52 (3H, d, $J = 6.6$, 1'- CH_3), 1.08 (3H, t, $J = 7.3$, H-3'), 1.51 (1H, m, H-2'), 1.69 (1H, m, H-2'), 2.10 (1H, m, H-1'), 3.77 (3H, s, 4- CH_3), 4.89 (1H, d, $J = 2.5$, H-3), 7.29 (1H, dd, $J = 7.6, 7.5$, H-7), 7.47 (1H, d, $J = 8.2$, H-5), 7.66 (1H, ddd, $J = 8.2, 7.5, 1.4$, H-6), 8.23 (1H, d, $J = 7.9$, H-8). ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 11.7 (C-3'), 12.2 (1'- CH_3), 28.1 (C-2'), 36.1 (4- CH_3), 36.8 (C-1'), 58.4 (C-3), 110.7 (C-9a), 115.5 (C-5), 124.2 (C-7), 126.7 (C-8) 127.9 (C-8a), 132.3 (C-6), 140.9 (C-4a), 164.3 (C-3a), 169.9 (C-1), 172.5 (C-9). HRESIMS m/z : 271.1436 $[\text{M} + \text{H}^+]^+$.

Quinolactacina A2 (**96**): sólido blanco cristalino; UV (CH_3OH) λ_{max} : 216, 257, 316. IR (ATR): 3197, 2964, 2934, 2876, 1693, 1063, 1546, 1518, 1464, 1421, 1269. 1218, 755, 531.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 0.66 (3H, t, $J=7.3$, H-3'), 0.84 (1H, m, H-2'), 0.98 (1H, m, H-2'), 1.25 (3H, d, $J=6.6$, 1'- CH_3), 2.10 (1H, m, H-1'), 3.78 (3H, s, 4- CH_3), 4.77 (1H, d, $J=2.5$, H-3), 7.36 (1H, dd, $J=7.6, 7.5$, H-7), 7.51 (1H, d, $J=8.2$, H-5), 7.62 (1H, ddd, $J=8.2, 7.5, 1.4$, H-6), 8.30 (1H, d, $J=7.9$, H-8). ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 11.7 (C-3'), 17.9 (1'- CH_3), 21.2 (C-2'), 36.1 (4- CH_3), 36.8 (C-1'), 60.4 (C-3), 110.7 (C-9a), 115.5 (C-5), 124.2 (C-7), 126.7 (C-8), 127.9 (C-8a), 132.3 (C-6), 140.9 (C-4a), 164.3 (C-3a), 169.9 (C-1), 172.5 (C-9). HRESIMS m/z : 271.1436 $[\text{M} + \text{H}^+]^+$.

Quinolactacina B (**97**): sólido blanco cristalino; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} 0$ (c 0.2, CH_3OH). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 0.55 (3H, d, $J=6.7$, H-2'), 1.24 (3H, $J=6.9$, 1'- CH_3), 2.58 (1H, m, H-1'), 3.92 (3H, s, 4- CH_3), 4.84 (1H, s, H-3), 7.50 (1H, m, H-7), 7.82 (2H, m, H-5/H-6), 8.37 (1H, m, H-8). ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 12.7 (C-2'), 19.7 (1'- CH_3), 29.6 (C-1'), 35.5 (4- CH_3), 59.8 (C-3), 109.9 (C-9a), 116.5 (C-5), 124.7 (C-7), 125.9 (C-8), 127.8 (C-8a), 132.9 (C-6), 141.6 (C-4a), 164.7 (C-3a), 170.4 (C-1), 173.6 (C-9). ESIMS m/z : 257.12 $[\text{M} + \text{H}^+]^+$.

Asperfenamato (**99**): sólido blanco amorfo; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -98.6$ (c 0.76, CH_3Cl). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 2.94 (2H, ddd, $J=7.4, 13.7, 22.0$, H-7), 3.25 (2H, ddd, $J=6.7, 13.9, 33.6$, H-7'), 4.04 (1H, dd, $J=4.3, 11.3$, H-9), 4.54 (1H, dd, $J=3.4, 11.3$, H-9), 4.62 (1H, m, H-8), 4.92 (1H, q, $J=6.7$, H-8'), 6.58 (1H, d, $J=6.6$, NH-8'), 6.66 (1H, d, $J=6.6$, NH-8), 7.2-7.7 (m, H arom). ^{13}C -RMN δ_{C} (ppm): 37.3, 37.5, 50.28, 54.5, 65.4, 126.8-137.1 (H arom), 167.1, 167.4, 171.9. ESIMS m/z : 507.79 $[\text{M} + \text{H}^+]^+$.

2-Cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**): sólido rojo amorfo, p_f 194 °C; R_f 0.45, silica gel 60 F₂₅₄, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +51.5$, (c 0.007, CH_3OH); UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ) nm: 218.5 (4.26), 256.5 (3.99), 308.5 (3.85) and 433 (3.5) nm; IR (ATR) ν_{max} 759, 1008, 1256, 1381, 1622 and 2920 cm^{-1} ; ^1H -RMN y ^{13}C -RMN: ver Cuadro 7; HRESIMS m/z 349.0457 $[\text{M} + \text{H}^+]^+$ (calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Cl}$ 349.0473).

5.7 Identificación de los hongos coprófilos *Penicillium* sp. G1-a14 y *Penicillium spathulatum* G1-b35

La identificación y clasificación taxonómica de las especies fúngicas que se estudiaron en el presente trabajo se llevó a cabo por el Dr. Huzefa A. Raja (Universidad de Carolina del Norte, Greensboro, E.U.A.). Para la identificación molecular se amplificaron y secuenciaron distintas regiones del ADN obtenido a partir de cultivos axénicos de las especies fúngicas. Las secuencias se depositaron en el GenBank y se analizaron utilizando el programa de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del NCBI GenBank. Una muestra de referencia de cada especie se encuentra depositada en la colección fúngica del departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

5.8 Evaluación *in vitro* del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos, fracciones y productos puros

5.8.1 Ensayo bioautográfico de fitotoxicidad

Se emplearon placas de vidrio de 3 × 20 cm recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (0.63-0.2 mm, 230 mesh). En cada placa se aplicó 1 mg de la muestra (extracto o fracción) y se eluyó empleando los métodos convencionales de CCD. Concluido el proceso de elución, se dejó evaporar el disolvente para después cubrir la placa con 15 mL de una suspensión de agar bacteriológico al 1%. Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli* se trataron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante un minuto y posteriormente se lavaron exhaustivamente con agua destilada. Las semillas se colocaron hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie de agar. Las placas se incubaron en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 36 horas para *A. hypochondriacus* o 48 horas para *E. crus-galli*. Después de la incubación se determinó si existían zonas de inhibición de la germinación o del crecimiento radicular de las especies vegetales.

5.8.2 Ensayo de fitotoxicidad en caja Petri

La actividad fitotóxica de los extractos orgánicos y de los metabolitos aislados se evaluó sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* mediante un bioensayo en caja Petri. Para ello, se prepararon soluciones de los extractos orgánicos (50, 100, 150, and 200 µg/mL) y de los compuestos puros (25, 50, 75, and 100 µg/mL) en una suspensión de agar al 2%. Cinco mL de las distintas diluciones preparadas en agar se vertieron sobre cajas Petri de 5 cm de diámetro. Posteriormente, se colocaron de 10 a 20 semillas sobre la superficie del agar. Cada experimento se realizó por triplicado y se utilizó tricolorina A y glifosato (Sigma®) como controles positivos. Las cajas se incubaron a 28 °C en una atmósfera húmeda durante 36 horas para *A. hypochondriacus* o 48 horas para *E. crus-galli*. Transcurrido el periodo de incubación, se midió la longitud de las radículas (mm) y se comparó contra el control negativo (CH₃OH). El porcentaje de inhibición del crecimiento radicular se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left(\frac{L_c - L_t}{L_c} \right) \times 100$$

Ecuación 1

donde L_c es la longitud promedio de las radículas del control negativo y L_t es la longitud de las semillas tratadas con el compuesto de prueba o el extracto. Los valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) se calcularon mediante un ajuste lineal basado en el porcentaje de inhibición del crecimiento radicular.

5.9 Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de los extractos orgánicos, fracciones y productos puros sobre las enzimas α-glucosidasas

Para determinar la actividad inhibitoria sobre las α-glucosidasas de los extractos, fracciones o metabolitos aislados se utilizó un bioensayo espectrofotométrico en placas de 96 pozos con dos tipos de enzimas, la α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma®), o bien, un extracto enzimático obtenido a partir de intestino de rata (Rivera-Chávez, et al.,

2015). En el caso de la α -glucosidasa de levadura, la enzima se preparó a una concentración de 1 U/mL en solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 100 mM, pH 7). Para la preparación del extracto enzimático de mamífero, 40 mg de polvo liofilizado de intestino de rata (Sigma®) se resuspendieron en 1 mL de PBS, se centrifugó a 6400 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Los extractos, fracciones y compuestos puros se pesaron en tubos Eppendorf y se disolvieron en CH₃OH. Se colocaron alícuotas de 0-10 μ L de las soluciones de prueba en los pozos y se incubaron durante 10 minutos con 10 μ L de la solución de α -glucosidasa de levadura o con 20 μ L del extracto enzimático de rata. Posteriormente, se adicionaron 10 μ L de una solución de *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*NPG, 5 mM para α -glucosidasa de levadura y 10 mM para extracto enzimático de rata) preparada en PBS. El volumen final de reacción se ajustó a 100 μ L por pozo con PBS. Se realizó la primera lectura de absorbancia (t_0) a 405 nm con un lector de placas de 96 pozos BioRad® 680. Se incubó durante 20 minutos a 37 °C y posteriormente se realizó la segunda lectura de absorbancia (t_{20}). Se realizaron tres réplicas por experimento y se utilizó acarbosa (Sigma®) como control positivo. Para el control del equipo, así como para la adquisición y manejo de los datos se utilizó el programa MicroPlate Manager 6. El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática se calculó en comparación con un blanco (enzima sin inhibidor) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left(1 - \frac{A_{405 \text{ m}}}{A_{405 \text{ b}}} \right) \times 100$$

Ecuación 2

donde $A_{405 \text{ m}}$ es la absorbancia corregida de la muestra ($A_{405 \text{ } t_{20}} - A_{405 \text{ } t_0}$) y $A_{405 \text{ b}}$ es la absorbancia corregida del blanco. La concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática, es decir, la concentración inhibitoria media (CI_{50}), se calculó mediante un ajuste no lineal empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{P_{max}}{1 + \left(\frac{I}{CI_{50}} \right)^s}$$

Ecuación 3

donde P_{max} es el porcentaje máximo de inhibición, I es la concentración de inhibidor, CI_{50} es la concentración inhibitoria media y s es el grado de cooperatividad. El análisis de los datos y el cálculo de la CI_{50} se realizaron con el programa Origin 8.0

5.10 Estudios *in vivo*

5.10.1 Animales de experimentación

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones machos de la cepa ICR de un peso aproximado de 20-25 g, adquiridos de Envigo RMS S.A. de C.V. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio (temperatura 21 ± 2 °C, alimento y agua *ad libitum*, 70-80% de humedad relativa y ciclos de 12 h /12 h de luz/oscuridad) de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999. Los protocolos de experimentación utilizados en el presente trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, Facultad de Química, UNAM) con las claves FQ/CICUAL/132/16 y FQ/CICUAL/136/16.

Los animales se privaron de alimento cuatro horas previas al desarrollo de los experimentos con acceso libre al agua. Para la administración de los tratamientos se utilizó solución salina isotónica comercial (cloruro de sodio al 0.9 %, Pisa[®]) como vehículo (VEH) y se empleó un control positivo apropiado para cada experimento. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal a través de una pequeña incisión en la cola. Al concluir los experimentos, los animales se sacrificaron mediante hipoxia en una cámara de CO₂.

5.10.2 Inducción de hiperglucemia en ratones

La inducción experimental de hiperglucemia se llevó a cabo mediante la administración por vía intraperitoneal (*i.p*) de nicotinamida (NA, 50 mg/kg; Sigma[®]) a ratones normoglucémicos con ayuno previo de cuatro horas. Quince minutos después, se administró por vía *i.p*. una dosis de estreptozotocina (STZ, 120 mg/kg; Sigma[®]) disuelta en solución amortiguadora de citratos (100 mM, pH 4.5). Ambas soluciones fueron administradas a razón de 0.1 mL/10 g de peso. Siete días después de este tratamiento, se determinaron los niveles de glucosa en sangre empleando el método enzimático de la glucosa

oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2®). Se consideraron como animales hiperglucémicos aquellos que presentaron niveles superiores a los 200 mg/dL (Maciello et al., 1998).

5.10.3 Prueba oral de tolerancia a la sacarosa

Las pruebas conducentes a establecer la eficacia preclínica de la benzomalvina A (94) como un agente antihyperglucémico se basaron en modelos ampliamente descritos en la literatura utilizando ratones sanos e hiperglucémicos (NA-STZ). Todos los tratamientos se administraron por vía intragástrica (*p.o.*) usando sondas de acero inoxidable (3.0 × 0.3") a razón de 0.2 mL/10 g de peso. Se utilizaron 30 animales que se dividieron en cinco grupos ($n = 8$). Al primer grupo se le administró el vehículo (VEH), al segundo, el control positivo acarbosa (5.0 mg/kg) y a los grupos restantes, se les administró una suspensión de benzomalvina A (94) a las dosis de 3.2, 10.0 y 31.6 mg/kg. Treinta minutos después de la administración de los tratamientos, se administró una carga de sacarosa *p.o.* (3.0 g/kg). Posteriormente, se midieron los niveles de glucosa en sangre a las 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 h. Se determinó el porcentaje de variación de glucemia utilizando la siguiente ecuación:

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

Ecuación 4

donde G_i es la glucemia basal (0 horas) y G_t es la glucemia a los distintos tiempos de muestreo (Ovalle-Magallanes et al., 2015).

5.10.4 Evaluación de la actividad antihyperalgésica de la benzomalvina A (94)

El efecto antihyperalgésico de la benzomalvina A (94) se estableció mediante el modelo de la formalina en ratones hiperglucémicos (NA-STZ) de acuerdo con los protocolos previamente descritos (Sakurada et al., 1995). Los animales de experimentación se colocaron en un cilindro abierto de acrílico transparente de 20 × 40 cm durante 30 minutos a 25 °C.

Luego de la adaptación, los animales recibieron por vía intraplantar (*i. pl.*) 40 μ L de una suspensión de benzomalvina A (**94**) a las dosis de 3.2, 10 o 31.6 μ g/pata, el control positivo gabapentina (GBP, 31.6 μ g/pata) o el vehículo (VEH). Los animales se colocaron nuevamente en el cilindro. Treinta minutos después de los tratamientos, los ratones recibieron 40 μ L de una solución de formaldehído (1.0%) en la misma pata y se regresaron al cilindro para su observación. El comportamiento hiperalgésico inducido por la formalina se determinó como el tiempo que ocupa el animal en lamer o morder la pata inyectada por periodos de 5 minutos durante 30 minutos. Se calculó el área bajo la curva (ABC) para el curso temporal total (0-30 min) y para los cursos temporales en la primera fase (0-10 min) y la segunda fase (10-30 min) utilizando la regla de los trapezoides de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ABC = \sum_{t_0}^{t_n} \left(\frac{t_0 + t_i}{2} \right) (5) + \left(\frac{t_i + t_j}{2} \right) (5) + \dots$$

Ecuación 5

donde los subíndices 0, *i*, *j*, *n*, representan los tiempos de lamida (*t*) a los 0, 5, 10, ... *n* minutos de medición.

5.10.5 Análisis estadísticos

Los resultados de los experimentos *in vivo* está expresados como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM) del porcentaje de variación de glucemia o del área bajo la curva considerando una *n* = 6. Las diferencias significativas ($*p < 0.05$) entre los tratamientos se calcularon con el programa GraphPad Prism 6.0, usando un análisis de varianza (ANADEVA) y alguna prueba *post hoc* (Dunnett o Bonferroni).

5.11 Estudios computacionales

5.11.1 Preparación de las estructuras

Las estructuras de los todos los compuestos estudiados se construyeron y minimizaron con el programa Spartan'10 (Wavefunction Inc.). Se realizó una búsqueda

conformacional con el mismo programa, utilizando un campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF). Los conformeros obtenidos se minimizaron y optimizaron en el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc.) por medio de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP o B3LYP/6-311+G(2d,p), según corresponda. Las estructuras optimizadas sirvieron como base para los cálculos teóricos de rotación óptica, dicroísmo circular, desplazamientos químicos, o bien, para los estudios de acoplamiento molecular.

5.11.2 Cálculos teóricos de rotación óptica, dicroísmo circular y desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C

Para cada molécula se realizó una selección de conformeros considerando una ventana energética de 0 a 5 kcal/mol con respecto al ΔG . Los valores de ΔG se obtuvieron con el programa Gaussian 09 a partir de los cálculos de frecuencia vibracional como la suma de las energías electrónica y térmica. Posteriormente, se calculó la fracción molar correspondiente a cada conformero dentro de la población total mediante la distribución de Boltzmann utilizando el programa FracMol.

Los valores de rotación óptica se calcularon para cada conformero utilizando el programa Gaussian 09 bajo un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. El valor de rotación óptica para una molécula dada se determinó con base en la distribución poblacional de conformeros de acuerdo con la siguiente expresión:

$$[\alpha]_{calc} = \sum_{i=1}^M n_i [\alpha]_i$$

Ecuación 6

donde M es el número total de conformeros considerados, n_i es la fracción molar del i ésimo conformero, $[\alpha]_i$ es el valor de rotación óptica del i ésimo conformero y $[\alpha]_{calc}$ es el valor de rotación óptica calculada para la molécula en cuestión.

Los espectros de dicroísmo circular se calcularon a partir de las fuerzas de rotación dipolares ($R_{velocity}$) y de las energías de excitación (nm) obtenidas con el programa Gaussian

09, utilizando la teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) bajo un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. Se consideraron 15 estados excitados para cada conformero y una vez determinada la distribución poblacional, se construyó la gráfica de $\Delta\varepsilon$ vs λ con base en la siguiente ecuación (Nugroho y Morita, 2014):

$$\Delta\varepsilon(\sigma) = \frac{1}{2.296 \times 10^{-39}} \times \frac{1}{\Delta\sigma \sqrt{\pi}} \sum_i \sigma_i R_i e \left[\left(-\frac{\sigma - \sigma_i}{\Delta\sigma} \right)^2 \right]$$

Ecuación 7

donde σ es el número de onda (cm^{-1}), $\Delta\sigma$ es la mitad del ancho de la banda a la altura 1/e del pico, y σ_i y R_i son el número de onda de excitación y la fuerza de rotación en el i ésimo estado, respectivamente.

Por último, los cálculos de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C se realizaron con el programa Gaussian 09 bajo un nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p) utilizando el método GIAO (Gauge-independent atomic orbitals). Se determinaron las constantes de desplazamiento isotrópicas (σ) de cada núcleo con base en la distribución poblacional de conformeros de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\sigma_{calc} = \sum_{i=1}^M n_i [\sigma]_i$$

Ecuación 8

donde M es el número total de conformeros considerados, n_i es la fracción molar del i ésimo conformero, σ_i es el valor de la constante de desplazamiento isotrópica del i ésimo conformero y σ_{calc} es el valor de la constante isotrópica para un determinado núcleo en la molécula. Posteriormente los valores de σ_{calc} se escalaron a ppm (δ_{calc}) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\text{a) } \delta_{H\ calc} = \frac{32.0216 - \sigma_{calc}}{1.0674} \quad \text{b) } \delta_{C\ calc} = \frac{181.9576 - \sigma_{calc}}{1.0368}$$

Ecuaciones 9a y 9b

donde $\delta_{H\text{ calc}}$ y $\delta_{C\text{ calc}}$ son los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente (Lodewick et al., 2012).

5.11.3 Estudios de acoplamiento molecular

Las estructuras cristalográficas de las proteínas utilizadas en los estudios de acoplamiento molecular se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB). Se utilizó la isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 3A4A), el dominio *N*-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana (PDB: 3LPP), el dominio *N*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (PDB: 2QMJ) y el dominio *C*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (PDB: 3TOP). Las proteínas se prepararon en el programa AutoDock Tools 1.5.6 (ADT, www.mgtools.scripps.edu), donde se adicionaron todos los átomos de hidrógeno y las cargas de Kollman.

Por otra parte, los ligandos evaluados en los estudios de acoplamiento molecular, previamente optimizados por DFT, se prepararon con el programa ADT añadiendo las cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y estableciendo los ángulos de torsión.

Una vez preparadas las proteínas y los ligandos, se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento molecular (docking) utilizando el programa AutoDock Vina 1.1.2 (Trot y Olson, 2010) bajo los parámetros de exhaustividad y número de poses del propio programa. Inicialmente se realizó un estudio ciego usando una caja (gridbox) del tamaño de la proteína completa con la finalidad de determinar los sitios de interacción de menor energía. Una vez determinada la posición de menor energía, se realizó un refinamiento de los resultados con un gridbox de menor tamaño centrado en el ligando. Los resultados obtenidos de cada docking se analizaron con los programas ADT, PyMol (www.pymol.org) y LigPlot Plus (www.ebi.ac.uk).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención del material fúngico

El presente trabajo se desarrolló en el marco de un proyecto de investigación que tiene por objetivo describir metabolitos secundarios biodinámicos a partir de especies fúngicas selectas. El estudio comenzó con la obtención del material fúngico a partir de muestras de guano que fueron recolectadas en el río subterráneo Chontalcoatlán. El tratamiento adecuado de dichas muestras, permitió la obtención de diversos cultivos fúngicos axénicos (Figura 7), los cuales sirvieron como punto de partida para la selección de aquellos con actividad biológica.

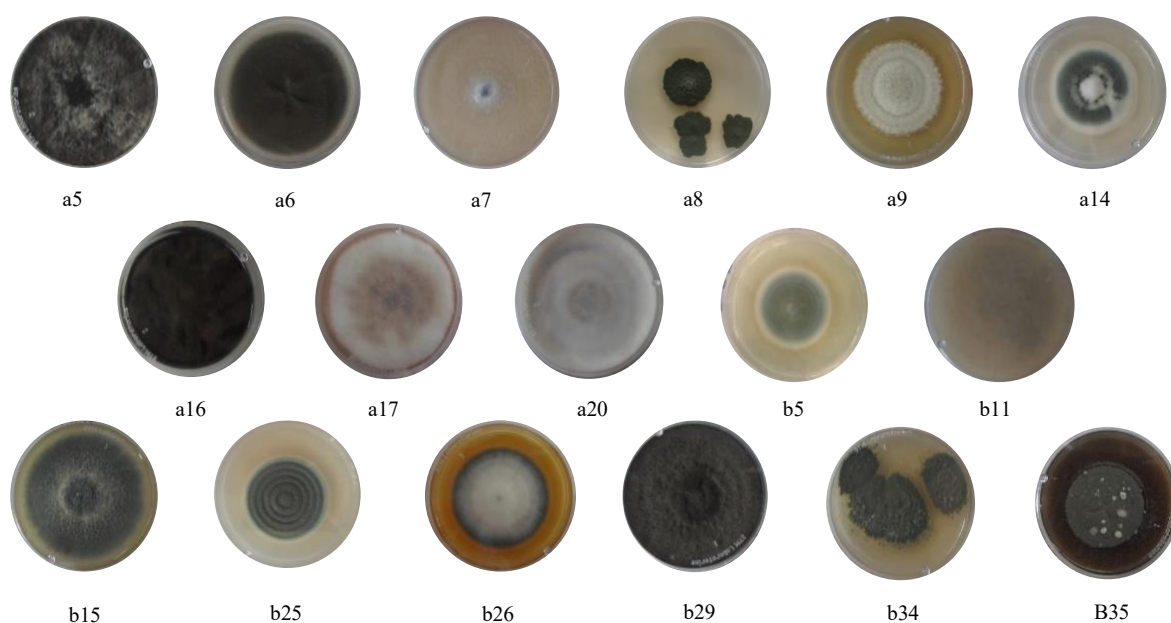


Figura 7. Cultivos fúngicos axénicos obtenidos a partir de las muestras de guano de murciélago G1-a y G1-b.

6.2 Selección de las especies fúngicas

Los microorganismos se cultivaron en pequeña escala en un medio sólido a base de arroz (25 g) durante 21 días. Para la obtención de los extractos orgánicos, se emplearon procesos de maceración y reparto con disolventes orgánicos. Posteriormente, se llevó a

cabo la selección de las especies fúngicas con base en los rendimientos, la complejidad cromatográfica, así como la actividad biológica de los extractos obtenidos (Cuadro 4). Para evaluar la actividad fitotóxica, se emplearon los bioensayos de inhibición del crecimiento radicular y la germinación sobre las especies vegetales *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Echinocloa crus-galli* (L.) Beauv. Por otra parte, para evaluar la actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa, se utilizó un ensayo enzimático espectrofotométrico con enzima de levadura.

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos orgánicos y actividad biológica

Aislamiento	Rendimiento (mg/g)	Actividad fitotóxica		Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa	
		% Inhibición a 50 ppm (AH) ^a	% Inhibición a 50 ppm (EC) ^b	% Inhibición a 50 ppm	% Inhibición a 250 ppm
G1-a5	35.0	33.2	38.5	52.1	69.7
G1-a6	130.2	41.2	12.5	58.5	61.5
G1-a7	85.3	24.9	NA	NA	NA
G1-a8	95.8	65.2	34.7	41.1	98.2
G1-a9	298.9	NA	NA	41.6	58.7
G1-a14	248.9	54.9	19.4	55.5	81.6
G1-a16	177.6	23.5	29.6	63.7	56.3
G1-a17	197.2	66.8	19.6	28.5	72.6
G1-a20	76.6	NA	NA	NA	NA
G1-b5	447.3	52.2	26.4	38.6	62.0
G1-b11	31.8	NA	NA	NA	NA
G1-b15	560.4	15.2	33.6	17.6	84.6
G1-b25	52.3	33.5	48.6	NA	NA
G1-b26	125.5	21.4	NA	69.1	85.7
G1-b29	143.1	NA	NA	NA	NA
G1-b34	21.2	28.0	32.1	11.7	60.5
G1-B35	528.2	46.8	37.6	25.5	95.7

^a) *A. hypochondriacus*. ^b) *E. crus-galli*.

De acuerdo con los resultados descritos en el Cuadro 4, los aislamientos G1-a14 y G1-b35 presentaron una actividad biológica prometedora y un rendimiento adecuado, por lo

que estos se seleccionaron para su posterior estudio químico biodirigido. Una vez seleccionadas las especies fúngicas, se prepararon los extractos en mediana escala con la finalidad de generar la cantidad suficiente de biomasa para la obtención de los metabolitos secundarios bioactivos. El aislamiento y purificación de los principios biodinámicos se llevó a cabo a través de procesos de fraccionamiento empleando las técnicas cromatográficas convencionales. Los productos puros se caracterizaron utilizando un conjunto de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quirópticos y computacionales.

Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran integrados en dos partes; la primera comprende los resultados referentes al estudio químico de la especie *Penicillium* sp. G1-a14 como fuente potencial de agentes fitotóxicos, mismos que se publicaron en el *Journal of Natural Products* (Del Valle et al., 2015). La segunda parte, describe el estudio químico y farmacológico de *Penicillium spathulatum* B35 con miras a la obtención de agentes inhibidores de las α -glucosidasas; los resultados correspondientes se integraron en un segundo artículo publicado en la revista *Planta Medica* (Del Valle et al., 2016). De forma adicional, en los Anexos A-5 a A-7 se describen brevemente otros resultados, producto del estudio químico de otras especies que se aislaron en el presente trabajo, pero cuyos metabolitos no demostraron un efecto importante como herbicidas o como inhibidores de α -glucosidasas, o bien son considerados micotoxinas.

6.3 Estudio de la especie *Penicillium* sp. G1-a14

6.3.1 Identificación molecular de la especie fúngica

Las características macroscópicas y microscópicas del hongo G1-a14 (Figura 8) permitieron determinar que la especie pertenece al género *Penicillium* (Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes, Ascomycota) [Visagie et al., 2014]. Para la identificación a nivel molecular, en primer lugar se realizó la extracción del ADN a partir de cultivos del hongo G1-a14 en medio PDA. Se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS1 y 2, el ADN ribosomal 5.8S, y las regiones D1 y D2 de la subunidad ribosomal grande (LSU, 28S), empleando técnicas ampliamente descritas (Raja et al., 2015). El análisis BLAST de las secuencias ITS y LSU, indicó que la cepa G1-a14 tiene similitud con las siguientes especies del género *Penicillium* sección *Citrina*: *P. copticola* (GenBank JN617685,

coincidencias = 364/386, 94%); *P. terrigenum* (GenBank JN617684, coincidencias = 364/386, 94%); *P. roseopurpureum* (GenBank AF455437, coincidencias = 364/386, 94%); y *P. sanguifluum* (GenBank JN617689, coincidencias = 359/386, 93%).



Figura 8. Cultivo axénico de dos semanas en medio PDA de *Penicillium* G1-a14.

6.3.2 Estudio químico biodirigido

El extracto orgánico obtenido a partir del cultivo en pequeña escala de la especie *Penicillium* sp. G1-a14 inhibió de manera importante el crecimiento y la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. Asimismo, este efecto se confirmó con el ensayo bioautográfico de fitotoxicidad. Como se puede apreciar en la Figura 9, el cromatograma resultante presentó zonas de inhibición del crecimiento radicular y la germinación, indicando que el extracto orgánico de esta especie contiene metabolitos secundarios fitotóxicos.

El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico en mediana escala condujo al aislamiento de un sesquiterpenoide reportado por primera vez en la literatura el cual se caracterizó como el 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**); además se obtuvieron tres eremofilanos conocidos identificados como el isopetasol (**90**), el sporogen AO-1 (**91**) y el dihidrosporogen AO-1 (**92**). La comparación de los datos espectroscópicos con aquellos reportados previamente en la literatura permitió su identificación (Sugama, et al., 1983; Yurchenko et al., 2013; Le et al., 2013). Los espectros de los productos **92-94** se encuentran en los Anexos A-13 a A-18 del presente documento.

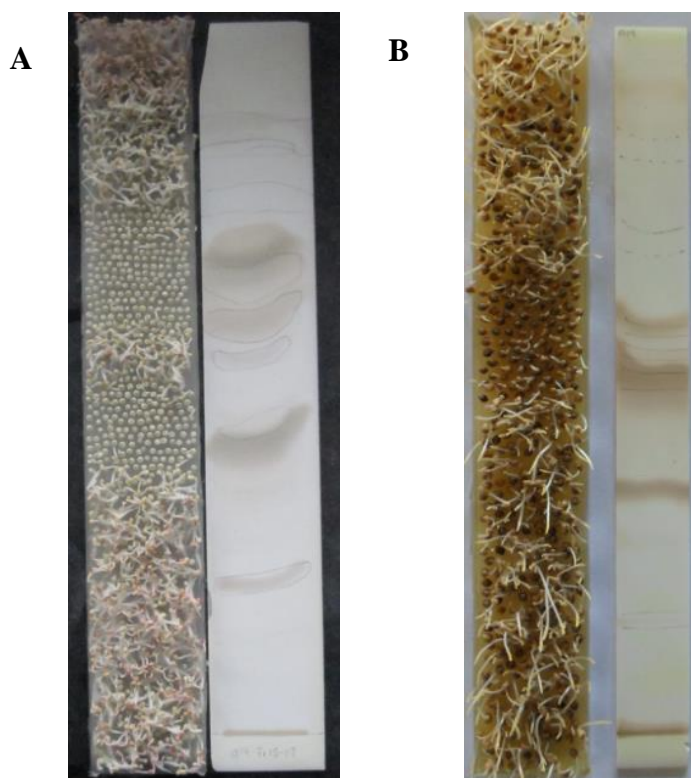


Figura 9. Bioautografía del extracto orgánico de *Penicillium* sp. G1-a14 contra *Amaranthus hypochondriacus* (A) y *Echinochloa crus-galli* (B).

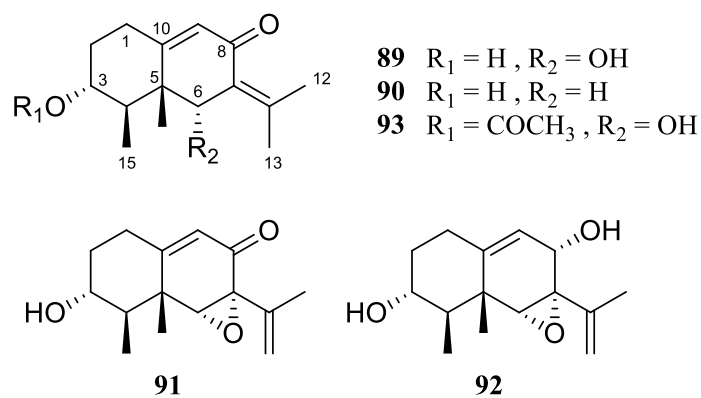


Figura 10. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de la especie *Penicillium* sp. G1-a14.

6.3.3 Elucidación estructural del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**)

El compuesto **89** se aisló como un sólido cristalino ópticamente activo, soluble en CH₂Cl₂, CH₃OH y poco soluble en agua. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas (HRESIMS) como C₁₅H₂₂O₃. El análisis de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (Cuadro 5, Figura 11 y 12) indicó la presencia de dos metilos, dos metilenos, dos metilos sobre doble ligadura, dos metinos base de oxígeno y una cetona α,β-insaturada. Estas características espectroscópicas sugirieron que el compuesto **89** es el derivado desacetilado del 3-acetil-9,7(11)-dien-6α-hidroxi-8-oxoeremofilano (**93**), descrito previamente por Huang y colaboradores a partir de la especie *Penicillium* sp. BL27-2 (Huang et al., 2008). Las principales diferencias que se encontraron entre los espectros de **89** y **93** fueron las señales para H-3 y C-3, que en **89** se encontraron desplazadas diamagnéticamente. Las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales COSY y HMBC (Figura 13A), además de un análisis por difracción de rayos X (Figura 13B), permitieron establecer inequívocamente la estructura del compuesto **89**.

Como se observa en la Figura 13B, el anillo de ciclohexenona adopta una conformación de sobre, mientras que el anillo de ciclohexano muestra una conformación de silla. Además, se observan los dos grupos hidroxilo en C-3 y C-6 orientados en la misma dirección sugiriendo que la configuración de los centros estereogénicos del producto **89** podría ser 3*R*,4*R*,5*R*,6*R* o 3*S*,4*S*,5*S*,6*S*. Asimismo, las correlaciones observadas en el experimento NOESY (Figura 14) confirmaron la orientación relativa de los protones H-3 y H-6. Los espectros bidimensionales se encuentran en los Anexos A-8 a A-11 del presente documento.

Cuadro 5. Datos espectroscópicos del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**)

Posición	δ_C , tipo ^a	δ_H , (mult, <i>J</i> en Hz) ^b	HMBC	NOESY
1	31.8, CH ₂	2.41, m 2.50, m	2, 5, 3, 9, 10	2, 3, 9, 14
2	35.5, CH ₂	2.05, m 1.45, m	1, 3, 4, 10	
3	72.0, CH	3.56, td (4.1, 10.9)	1, 2, 4, 15	2, 14, 15
4	41.7, CH	2.14, m	2, 3, 5, 6, 14, 15	
5	47.1, C	-		
6	73.0, CH	4.70, s	1, 4, 5, 7, 8, 11, 14	13, 14, 15
7	133.3, C	-		
8	193.2, C	-		
9	125.8, CH	5.74, d (1.6)	1, 5, 7, 11	1
10	166.0, C	-		
11	147.0, C	-		
12	23.0, CH ₃	2.07, s	6, 7, 8, 11, 13	
13	21.9, CH ₃	1.95, s	7, 8, 11, 12	
14	18.0, CH ₃	1.08, s	4, 5, 6, 10, 11	
15	10.4, CH ₃	1.10, d (6.7)	3, 4, 5	

^a100 MHz. ^b400 MHz. Adquiridos en Metanol-*d*₄. Desplazamientos químicos (δ en ppm).

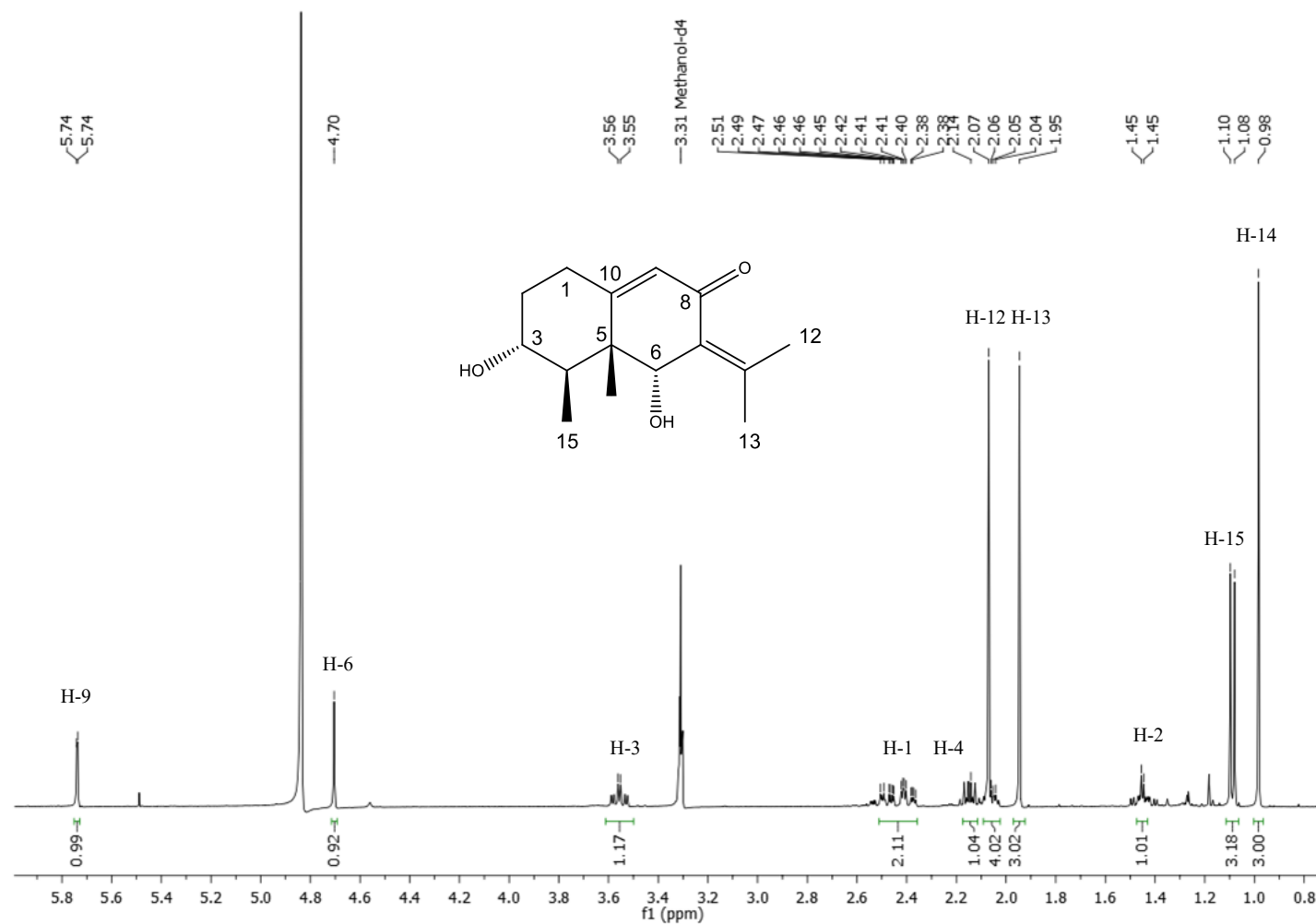


Figura 11. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**, Metanol- d_4 , 400 MHz).

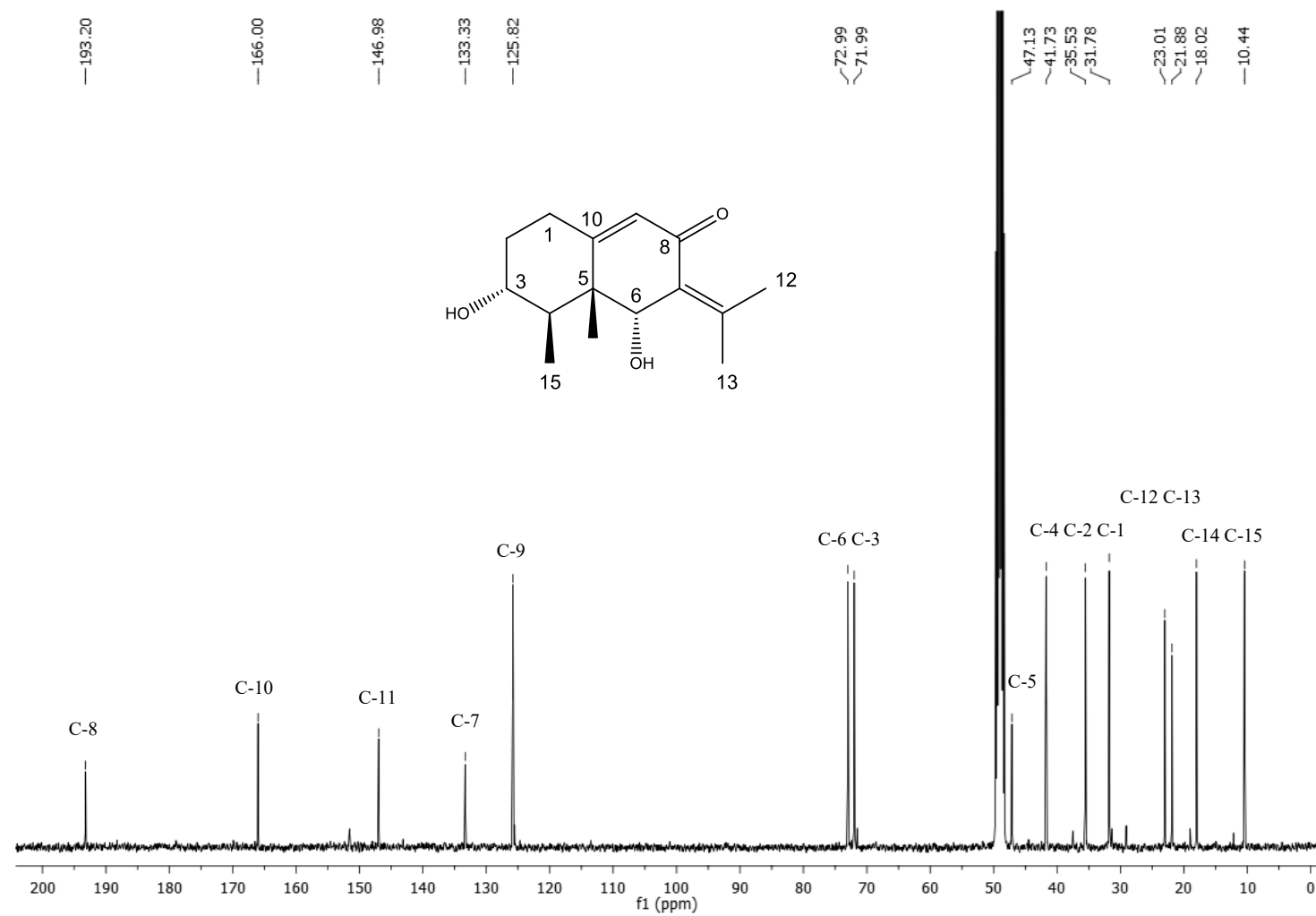


Figura 12. Espectro de ^{13}C -RMN del 3R,6R-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**, Metanol- d_4 , 100 MHz).

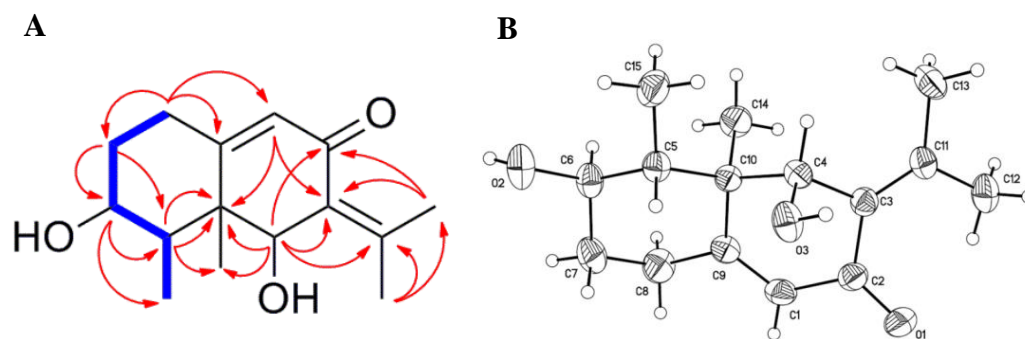


Figura 13. A) Correlaciones observadas en los espectros bidimensionales COSY (barras azules) y HMBC (flechas rojas). B) Estructura cristalográfica del compuesto **89**.

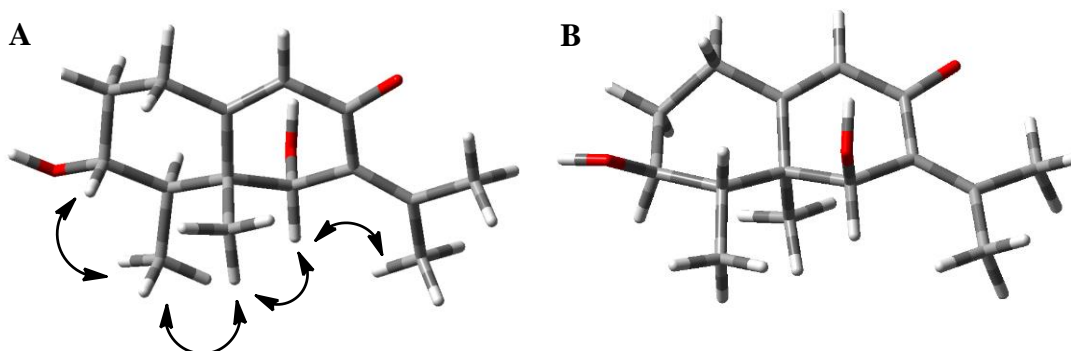


Figura 14. Estructuras de mínima energía de los dos posibles enantiómeros $3R,4R,5R,6R$ (A) y $3S,4S,5S,6S$ (B) del producto natural **89**.

Con la finalidad de determinar la configuración absoluta de los centros estereogénicos del compuesto **89**, se realizó la comparación del espectro de dicroísmo circular (DC) experimental del producto natural con los espectros calculados para los enantiómeros $3R,4R,5R,6R$ y $3S,4S,5S,6S$. Para el cálculo de los espectros teóricos, en primera instancia, se realizó un análisis conformacional de ambos enantiómeros mediante el protocolo de Monte Carlo, utilizando el programa Spartan'10. Todos los conformeros obtenidos se optimizaron geoméricamente por DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP empleando el programa Gaussian'09. Después de la optimización, se calcularon los espectros de DC mediante Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT) bajo el mismo nivel de teoría.

Los resultados obtenidos de los cálculos teóricos indican que el espectro para el enantiómero *3R,4R,5R,6R* muestra un buen ajuste con el espectro experimental de **89**, el cual presenta dos efectos Cotton negativos y uno positivo en 218, 287 y 252 nm, respectivamente (Figura 15). Por otra parte, el espectro calculado para el enantiómero *3S,4S,5S,6S* es exactamente opuesto al experimental, y presenta dos efectos Cotton positivos y uno negativo en 214, 302 y 254 nm, respectivamente. Con base en estos resultados, la configuración absoluta del compuesto **89** se estableció como *3R,4R,5R,6R*. Es importante mencionar que en el trabajo de Huang y colaboradores no se determinó la configuración absoluta del derivado acetilado de **89**, por lo que, una de las principales contribuciones de este trabajo radica en la determinación de la configuración absoluta de derivados del isopetasol (**90**).

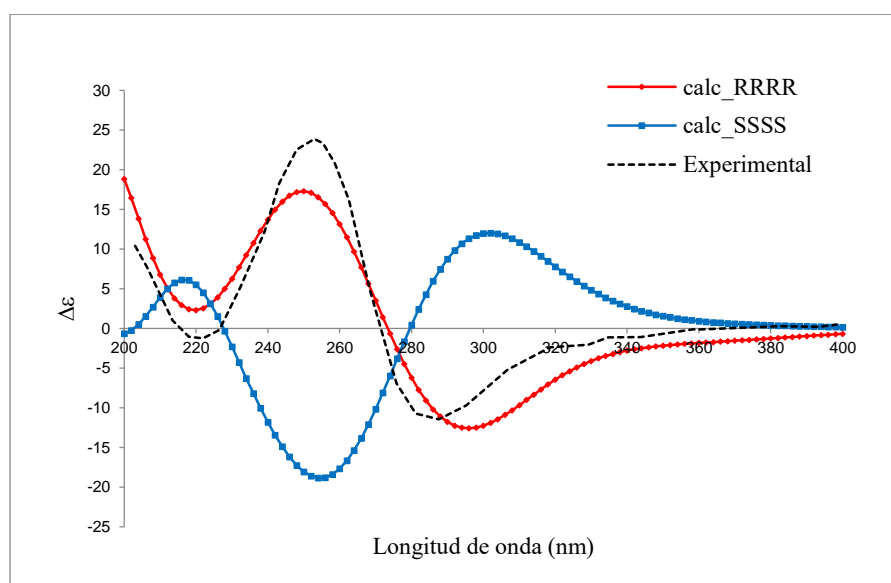


Figura 15. Comparación del espectro experimental de DC de **89** (negro) con los calculados por TD-DFT para los enantiómeros *3R,4R,5R,6R* (rojo) y *3S,4S,5S,6S* (azul).

6.3.4 Evaluación de la actividad fitotóxica de los eremofilanos **89-92**

La actividad fitotóxica del extracto orgánico y de los metabolitos aislados del hongo *Penicillium* sp. G1-a14 fue evaluada sobre el crecimiento radicular y la germinación de *A.*

hypochondriacus y *E. crus-galli* mediante un bioensayo en caja Petri. Los resultados obtenidos de este estudio indicaron que los eremofilanos **91** y **92** inhibieron de manera significativa ($p < 0.05$) el crecimiento radicular y la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* (Figura 16) y *E. crus-galli*. El eremofilano **89** no inhibió el crecimiento de ninguna de las dos semillas en concentraciones arriba de 1 mM. Por otra parte, no se determinó la actividad fitotóxica del eremofilano **90** debido a la escasa cantidad obtenida de muestra. En el Cuadro 6 se resumen los valores de IC_{50} del extracto y de los compuestos evaluados. Como se puede apreciar, los eremofilanos **91** y **92** inhiben la germinación de las semillas de manera comparable a la de la tricolorina A, un producto natural con propiedades inhibitoras del crecimiento vegetal muy notable y que fue obtenido por vez primera de *Ipomoea tricolor* (Pereda-Miranda et al., 1993). Por otro lado, el efecto inhibitorio fue mucho mayor a la del glifosato, uno de los plaguicidas más utilizados en todo el mundo para el control de malezas (Seiber et al., 2014)

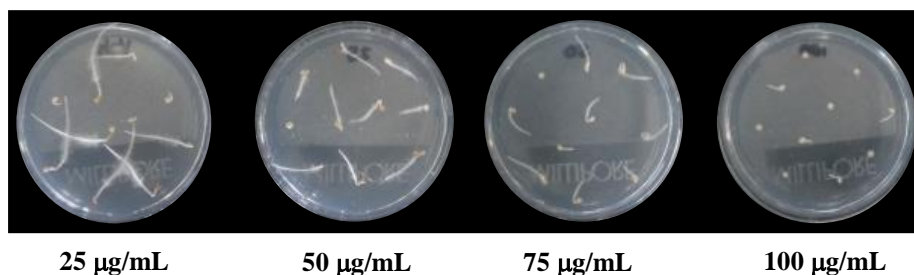


Figura 16. Efecto fitotóxico del compuesto **92** sobre *A. hypochondriacus*.

Cuadro 6. Actividad fitotóxica (CI_{50}) del extracto y los metabolitos **91** y **92** de *Penicillium* sp. G1-a14

Compuesto	CI_{50}	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>
Extracto ^a	46.18	184.74
91 ^b	0.17	0.17
92 ^b	0.17	0.30
Tricolorina A ^{b,c}	0.10	0.03
Glifosato ^{b,c}	>250	>250

^aEn µg/mL. ^bEn mM. ^cControl positivo.

Es importante mencionar que otros eremofilanos, aislados de plantas y hongos, han demostrado propiedades fitotóxicas en diferentes ensayos (Sugawara et al., 1993; Martínez-Luis et al., 2006; Reina et al., 2012). Quizás los más investigados por su actividad herbicida son los que pertenecen a especies vegetales del género *Ligularia* y al hongo fitopatógeno *Drechslera gigantea*. La mayoría de los productos activos aislados de *Ligularia* son de tipo furanoeremofilano, siendo uno de los más activos el 6 β -angeloiloxi-10 β -hidroxifuranoeremofilano, el cual inhibió de manera significativa el crecimiento de *Lemna paucicostata*. Asimismo, se observó que este producto inhibe el transporte de electrones durante la fotosíntesis (Cantrell et al., 2007). Por otra parte, los eremofilanos aislados de *Drechslera gigantea* son más simples y guardan una mayor relación estructural con los aislados en el presente estudio, puesto que también son derivados del petasol. Estos productos producen necrosis y manchas foliares en dicotiledóneas. Los efectos fitotóxicos de estos productos fueron dependientes del grado de oxidación de las moléculas, ya que a mayor oxidación, se observó una menor actividad, sin embargo, la presencia o ausencia de grupos epóxido no tuvo impacto en la actividad (Bunkers et al., 1990). Estos resultados contrastan con los efectos fitotóxicos encontrados en el presente estudio, donde los productos epoxidados fueron los más activos. A la fecha no se ha desarrollado ningún herbicida con este tipo de estructura, quizás por falta de estrategias de síntesis apropiadas.

En resumen, el estudio químico biodirigido de la especie fúngica *Penicillium* sp. G1-a14, condujo al aislamiento de un eremofilano novedoso (**89**) cuya estructura se elucidó empleando diversas técnicas. Además, se aislaron los eremofilanos isopetasol (**90**), sporogen AO-1 (**91**) y dihidrosporogen AO-1 (**92**). Los compuestos **91** y **92** mostraron un gran potencial como agentes fitotóxicos sobre las malezas *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*, las cuales, de acuerdo con la FAO, se encuentran dentro de las principales especies causantes de pérdidas agrícolas en el mundo (www.fao.org). Estos resultados representan una contribución original al estudio de las especies fúngicas del género *Penicillium* sección *Citrina*.

6.4. Estudio de la especie *Penicillium spathulatum* B35

6.4.1 Identificación molecular de la especie fúngica

Las características macroscópicas y microscópicas del hongo G1-B35 (Figura 17) permitieron determinar que la especie pertenece al género *Penicillium* (Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes, Ascomycota) [Visagie et al., 2014]. Para la identificación molecular se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS 1 y 2 y el ADN ribosomal 5.8S, empleando técnicas previamente descritas (Raja et al., 2015). De acuerdo con el análisis BLAST, la cepa B35 tuvo similitudes con las secuencias ITS de *P. spathulatum* [GenBank JX313157 (CBS 116972); coincidencias = 493/494 (99%)] y *P. spathulatum* [GenBank JX313162 (CBS 116977); coincidencias = 492/494 (99%)].

Para la identificación a nivel de especie, se amplificó y secuenció el gen *RPB2* (polimerasa ribosomal). El análisis de alineamiento BLAST indicó que este gen tiene una similitud del 97% con *P. spathulatum* [GenBank JN406636 (CBS 117192); coincidencias = 686/707 (97%)]. Para el análisis filogenético se reconstruyó una matriz de datos de secuencias de *RPB2* empleando aquellas descritas previamente para *P. spathulatum* (Frisvad et al., 2013). Este análisis se llevó a cabo por el método de máxima verosimilitud, indicando que la cepa G1-B35 forma un grupo monofilético con la cepa de *P. spathulatum* (CB 117192) dentro de la sección *Brevicompecta* (Figura 18). Así, con base en estos resultados, se concluyó que la especie G1-B35 es *Penicillium spathulatum* Frisvad & Samson. Las secuencias se depositaron en el GenBank con las claves ITS: KX156615; RPB2: KX138224 y KX138225.

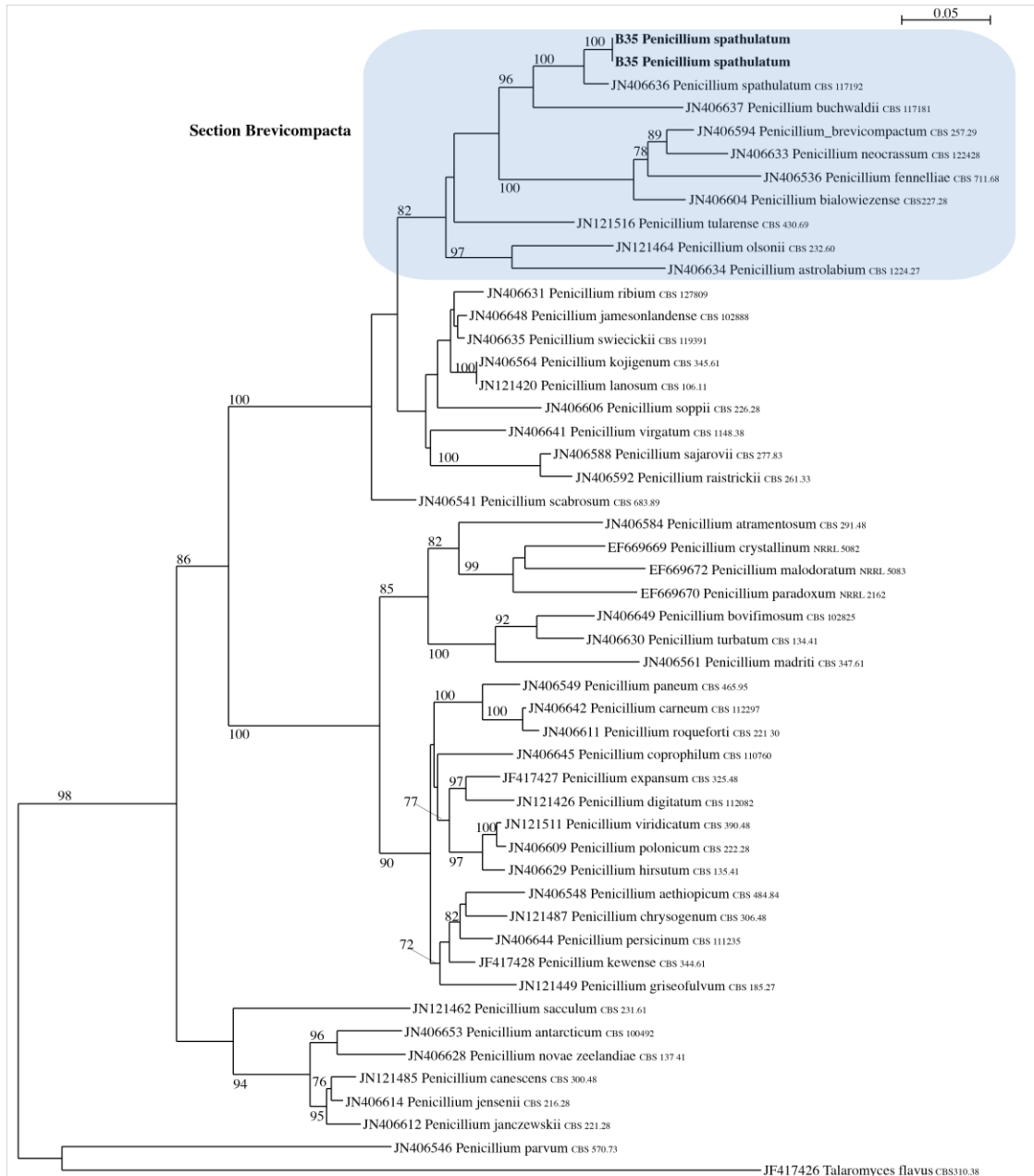


Figura 17. Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud ($-\ln L = 11316.32$) mediante el análisis de una matriz de datos de 50 secuencias de *RPB2* (1014 bp). Los valores de remuestreo (bootstrap) del ML se representan en los internodos (sólo se muestran valores $> 70\%$). *Talaromyces flavus* (CBS 310.38) se utilizó como un grupo externo.

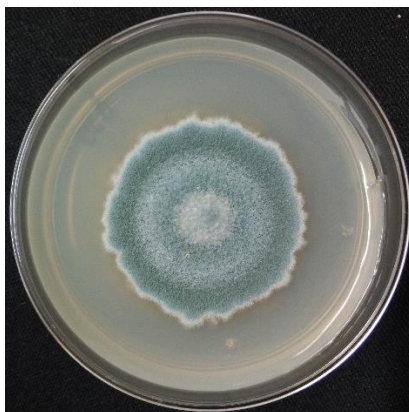


Figura 18. Cultivo axénico de dos semanas en medio PDA de *Penicillium spathulatum* G1-B35.

6.4.2 Estudio químico biodirigido

El hongo *Penicillium spathulatum* B35 se seleccionó como fuente potencial de inhibidores de α -glucosidasas con base en los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* descrito en la Parte experimental. El extracto orgánico presentó un efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolasa de la α -glucosidasa de levadura de forma dependiente de la concentración con una CI_{50} de 56.5 $\mu\text{g/mL}$. Una vez seleccionado el hongo *P. spathulatum* B35, se procedió a la obtención del extracto orgánico en mediana escala. El fraccionamiento de éste permitió el aislamiento de la benzomalvina A (**94**), las quinolactacinas A1 (**95**), A2 (**96**), y B (**97**), la quinolonimida (**98**), el asperfenamato (**99**) y una polihidroxiantraquinona halogenada novedosa (**100**) [Figura 19].

Los compuestos **94-97** y **99** se caracterizaron con base en la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos (Anexos A-21 a A-31) con aquellos reportados previamente (Sun et al, 1994; Sun et al., 1995; Takahashi et al., 2000, Kim et al., 2001, Yuan et al., 2010). Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la benzomalvina A (**94**) pusieron de manifiesto una mezcla de señales atribuible a la presencia de los conformeros **94a** y **94b**. Cabe recalcar que la separación de estos fue imposible mediante las técnicas cromatográficas convencionales debido a la rápida interconversión que sufren en solución. El comportamiento conformacional dinámico de la benzomalvina A (**94**) fue ampliamente estudiado por Sugimori y colaboradores, indicando que la mezcla de conformeros **94a** y

94b alcanza un equilibrio después de algunas horas de permanecer en solución (Sugimori et al., 1998).

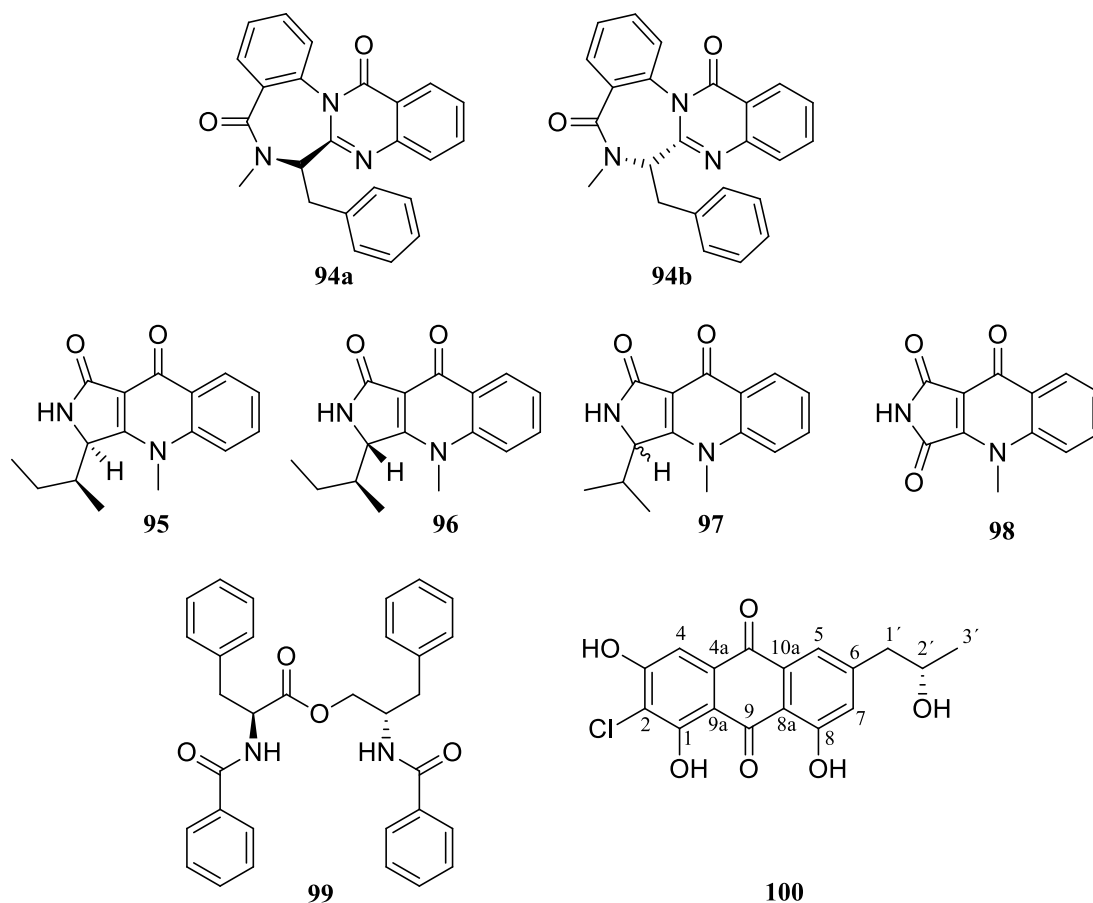


Figura 19. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de *Penicillium spathulatum* B35.

Mediante estudios computacionales utilizando DFT a un nivel de teoría B3LYP, se realizó la optimización y la minimización de los conformeros obtenidos en la búsqueda conformacional de **94**. Los resultados de este estudio indicaron que el conformero más estable es el **94a**, con un $\Delta G = 0.17$ kcal/mol, mientras que para el conformero **94b** el valor calculado de energía libre fue de 0.49 kcal/mol (Figura 20). Es importante considerar que ambos conformeros coexisten en solución en una proporción de 4:2 y que estos resultados son consistentes con lo encontrado por Sugimori y colaboradores (1998). Por otra parte, Sun y colaboradores (Sun et al., 1995) nombraron al conformero **94b** con el nombre trivial

de benzomalvina D, no obstante, para evitar confusión, en el presente trabajo sólo se menciona a la benzmoalvina A (**94**), considerando que ambos conformeros coexisten en solución en una proporción de equilibrada.

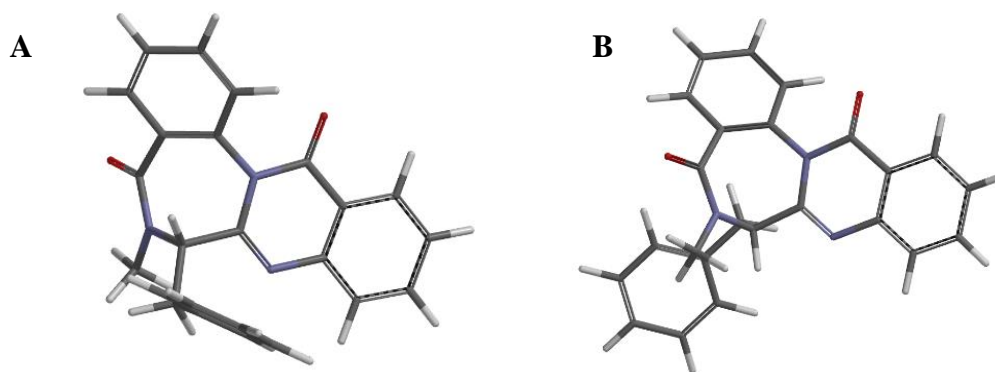


Figura 20. Estructuras de mínima energía de los conformeros **94a** (A) y **94b** (B) de la benzomalvina A (**94**).

Por otra parte, los compuestos **95** y **96** se aislaron como una mezcla inseparable de epímeros; una vez separados por las técnicas cromatográficas convencionales, estos eventualmente se contaminaban uno con el otro. De acuerdo con Clark y colaboradores, las quinolactacinas A1 (**95**) y A2 (**96**) sufren una rápida epimerización en C-3 (Figura 21), además de ser inestables oxidándose al producto **98** y finalmente al ácido quinolónico [Clark et al.,2006].

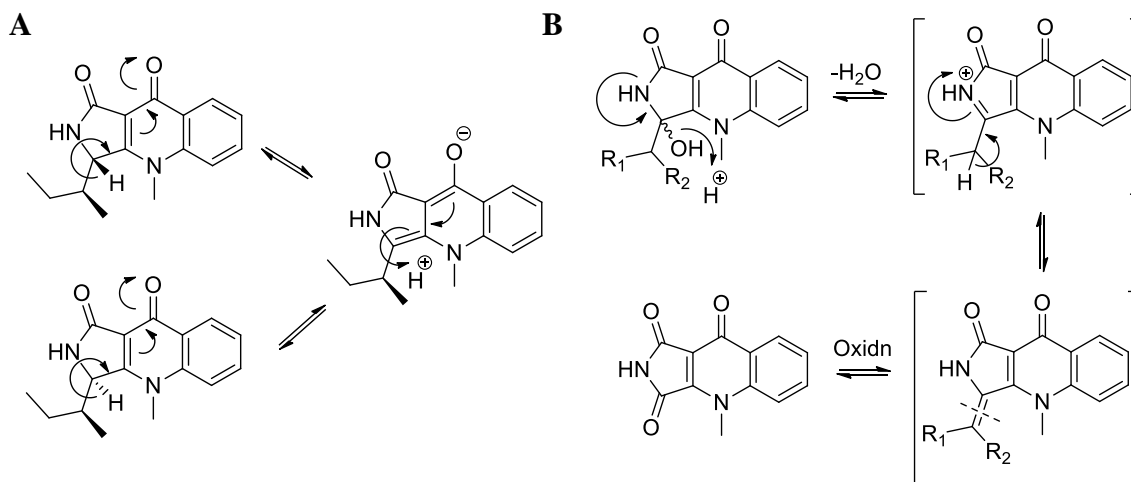


Figura 21. Mecanismo de epimerización (A) y descomposición (B) de los productos **95** y **96** (adaptado de Clark y colaboradores).

Las estructuras de los compuestos **95**, **96** y **98** se confirmaron inequívocamente por medio de un análisis de rayos X (Figura 22). Como se puede apreciar en la Figura 22A, la co-cristalización de los epímeros **95** y **96** permitió confirmar que estos productos difieren en la configuración del centro estereogénico C-3 y no en C-1' como se describió erróneamente en otros estudios (Kim et al., 2001; Zhang et al., 2003).

De manera adicional, la configuración absoluta de los centros estereogénicos C-3 y C-1' de los epímeros **95** y **96**, se asignó por primera vez mediante la comparación de los espectros de DC, calculados por TD-DFT, con aquellos reportados en la literatura (Kim et al., 2001). De acuerdo con los resultados ilustrados en la Figura 23, la configuración de la quinolactacina A1 (**95**) se asignó como $3R,1'S$, mientras que la de la quinolactacina A2 (**96**) como $3S,1'S$.

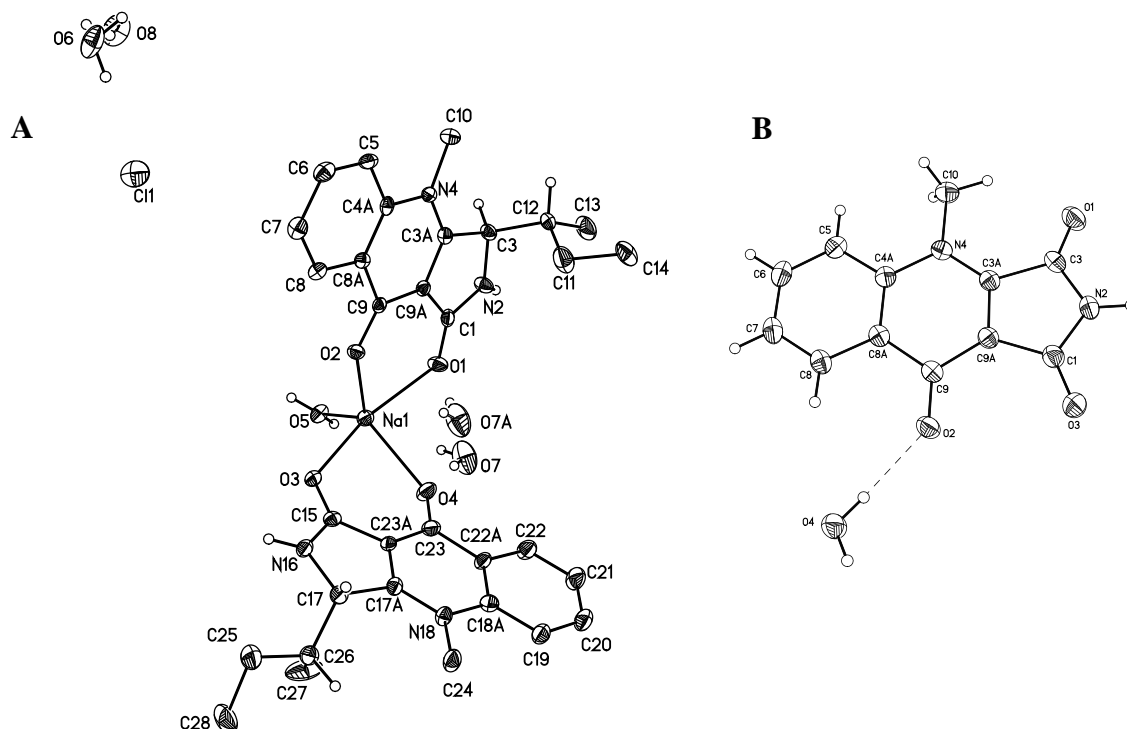


Figura 22. A) Estructura co-cristalográfica de las quinolactacinas A1 (**95**) y A2 (**96**). B) estructura cristalográfica de la quinolonimida (**98**).

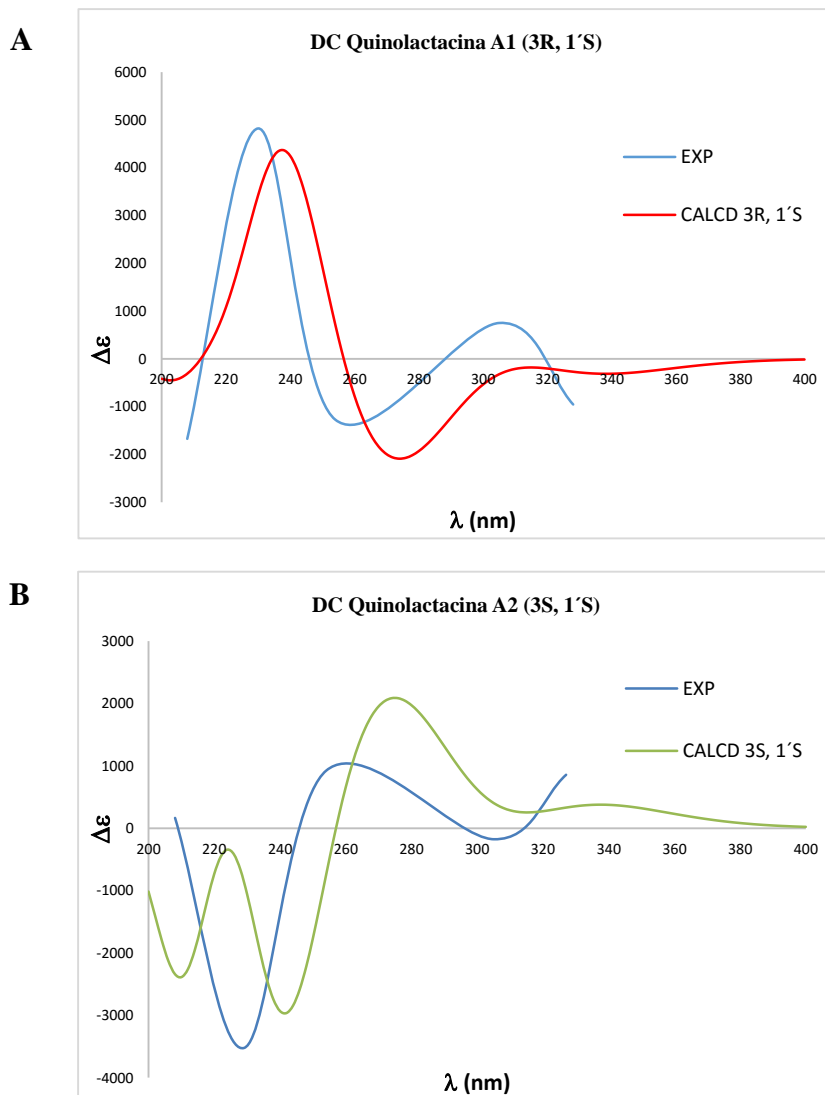


Figura 23. Comparación de los espectros experimentales de DC de **95** y **96** (azul) con los calculados por TD-DFT para los epímeros $3R,1'S$ (rojo) y $3S,1'S$ (verde).

6.4.3 Elucidación estructural de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**)

El compuesto **100** se separó como un sólido rojo ópticamente activo. Su fórmula molecular se determinó como $C_{17}H_{14}O_6Cl$ por medio de espectrometría de masas (HRESIMS). La abundancia relativa ($\sim 33\%$) del pico $[M+H+2]^+$ con respecto a la del ion pseudomolecular $[M+H]^+$ indicó la presencia de un átomo de cloro. El análisis de los

espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Cuadro 7, Figuras 24 y 25) permitió determinar la presencia de dos grupos carbonilos conjugados, un metilo, un metileno y un grupo carbinol secundario; además se observaron 12 carbonos aromáticos, tres de los cuales se encontraban protonados. Estas características espectroscópicas sugieren que el compuesto **100** tiene el mismo núcleo de antraquinona encontrado en la nalgiolaxina, aislada previamente de *P. nalgiovense* (Birch y Stapleford, 1967). La posición de los sustituyentes en el núcleo de antraquinona se estableció por medio del análisis de los espectros bidimensionales COSY y HMBC (Figura 26).

La configuración absoluta del centro estereogénico C-2' se estableció por medio de cálculos teóricos de rotación óptica para los dos posibles enantiómeros *R* y *S* utilizando DFT. Las estructuras de ambos enantiómeros se construyeron con el programa Spartan'10. Se realizó un análisis conformacional empleando el protocolo de Monte Carlo; los conformeros resultantes se optimizaron y minimizaron con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP en el programa Gaussian 9. Posteriormente se calculó el valor de rotación óptica de cada enantiómero bajo el mismo nivel de teoría y se comparó con el valor experimental. Los resultados indicaron que la configuración absoluta de C-2' es *S* ya que el valor experimental ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +51.54$, c 0.007, CH_3OH) se asemeja en signo y magnitud al valor calculado para el enantiómero *S* ($[\alpha]_{\text{D}} +48.36$, CH_3OH), así como al valor del derivado deshalogenado (+)-2'*S*-isorhodoptilometrina (Figuroa et al., 2014), mientras que para el enantiómero *R*, el valor calculado fue opuesto en signo ($[\alpha]_{\text{D}} -52.85$, CH_3OH).

Con la finalidad de confirmar la estructura propuesta para la antraquinona novedosa **100**, se realizaron los cálculos computacionales de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C por DFT bajo un nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p). Los datos obtenidos se compararon con los desplazamientos químicos experimentales del compuesto **100** (Cuadro 7) indicando que la estructura propuesta es correcta (Lodewyk et al., 2012; Willoughby et al., 2014).

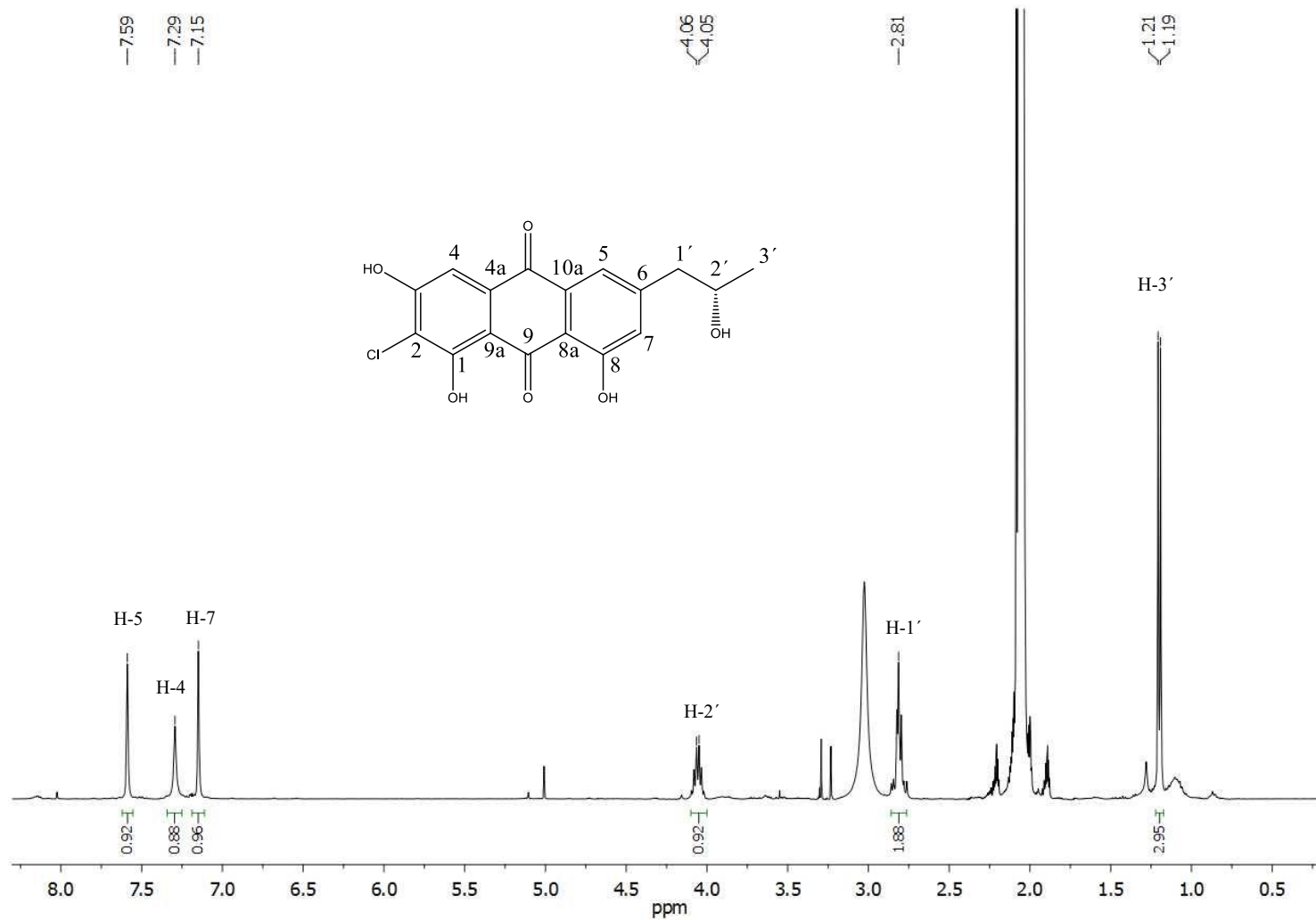


Figura 24. Espectro de ¹H-RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**, Acetona-*d*₆, 400 MHz).

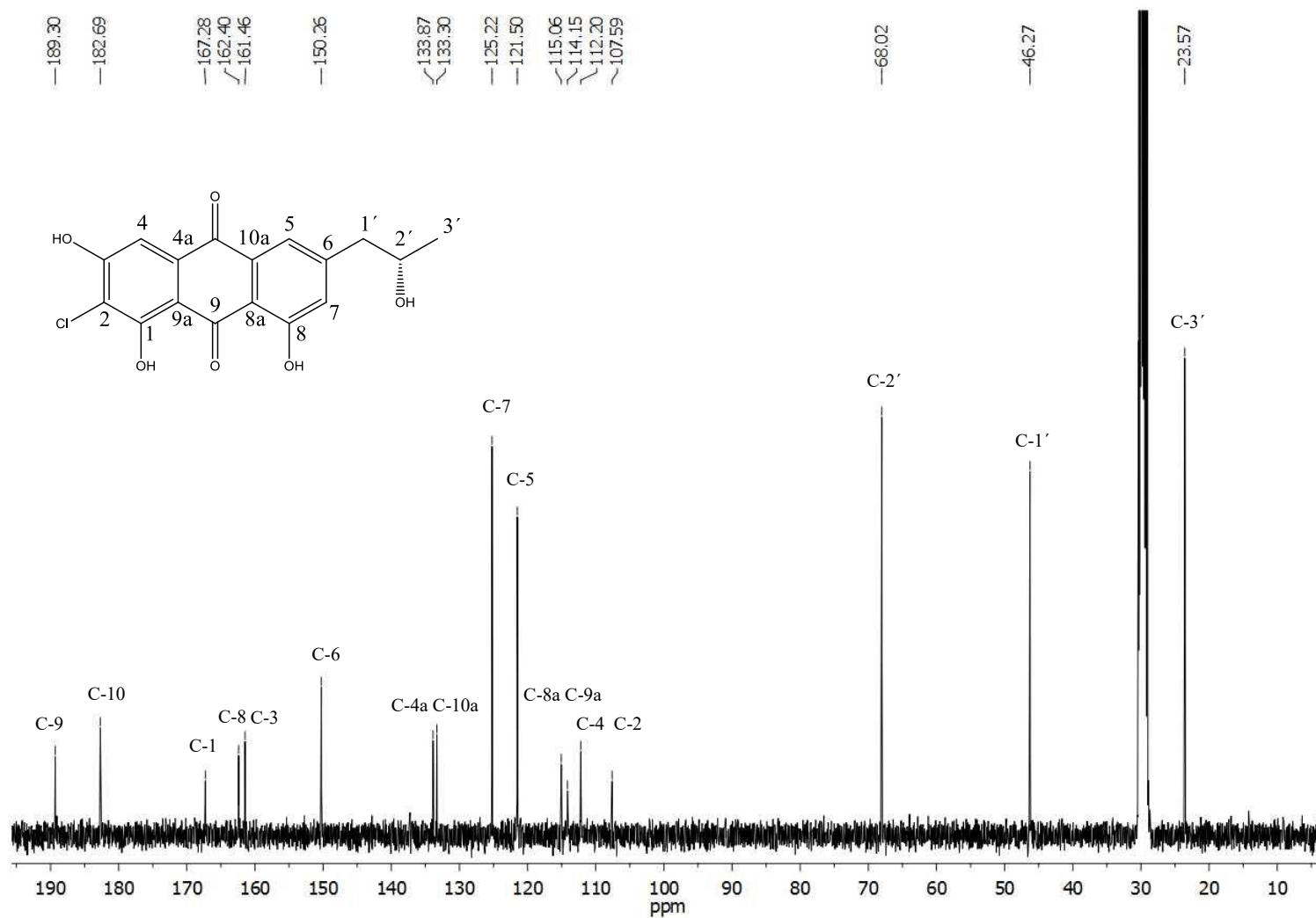


Figura 25. Espectro de ¹³C-RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**, Acetona-d₆, 400 MHz).

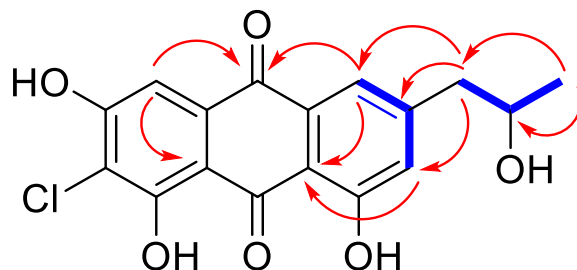


Figura 26. Correlaciones observadas en los espectros bidimensionales COSY (barras azules) y HMBC (flechas rojas) para el compuesto **100**.

Cuadro 7. Datos espectroscópicos experimentales y teóricos de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**).

Posición	δ_C exp ^a	δ_C calcd ^b	δ_H exp ^a	δ_H calcd ^b	$ \Delta\delta_H $
1	160.3	160.3	-	-	
2	113.9	119.1	-	-	
3	162.1	159.4	-	-	
4	108.2	107.4	7.18	7.34	0.16
4a	132.5	132.6	-	-	
5	120.9	121.1	7.53	7.58	0.05
6	149.8	152.5	-	-	
7	124.7	125.4	7.07	7.05	0.02
8	162.1	163.5	-	-	
8a	113.7	113.7	-	-	
9	190.4	189.4	-	-	
9a	109.0	110.1	-	-	
10	181.3	182.1	-	-	
10a	133.0	131.6	-	-	
1'	45.2	46.9	2.73	2.76	0.03
2'	67.6	73.1	3.97	3.99	0.02
3'	22.0	21.9	1.16	1.25	0.09
					MAE^c = 0.06

Datos en ppm

^aDatos experimentales obtenidos en Metanol-*d*₄ a 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C.

^bDatos calculados bajo un nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p) en CH₃OH.

^cError absoluto medio de los datos experimentales contra los datos calculados.

6.4.4 Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasas de los compuestos aislados de *P. spathulatum* B35

Todos los compuestos aislados a partir del extracto orgánico de *P. spathulatum* se evaluaron *in vitro* sobre la actividad de la α -glucosidasa de levadura mediante el ensayo descrito en la Parte experimental. Los resultados mostraron que la benzomalvina A (**94**), la mezcla de epímeros **95** y **96**, y los compuestos **97** y **99** inhibieron a la enzima de manera dependiente de la concentración (Figura 27), siendo más potentes que la acarbosa (control positivo). En el Cuadro 8, se resumen los valores de CI_{50} obtenidos. Cabe hacer hincapié en que el compuesto **98**, el cual en estudios previos se ha descrito como el producto de descomposición de las quinolactacinas (Clark et al., 2006), no fue activo como inhibidor de α -glucosidasa de levadura en este estudio. Esta inestabilidad química descartó cualquier estudio posterior para los compuestos **95**, **96** y **97**, pese a su potente actividad inhibitoria.

Cuadro 8. Valores de CI_{50} sobre α -glucosidasa de levadura de los metabolitos aislados de *P. spathulatum*.

Compuesto	CI_{50} (μ M)
94	383.2 \pm 11.9
95-96	273.3 \pm 7.6
97	57.3 \pm 1.0
99	8.3 \pm 0.3
Acarbosa^a	659.3 \pm 31.2

^aControl positivo

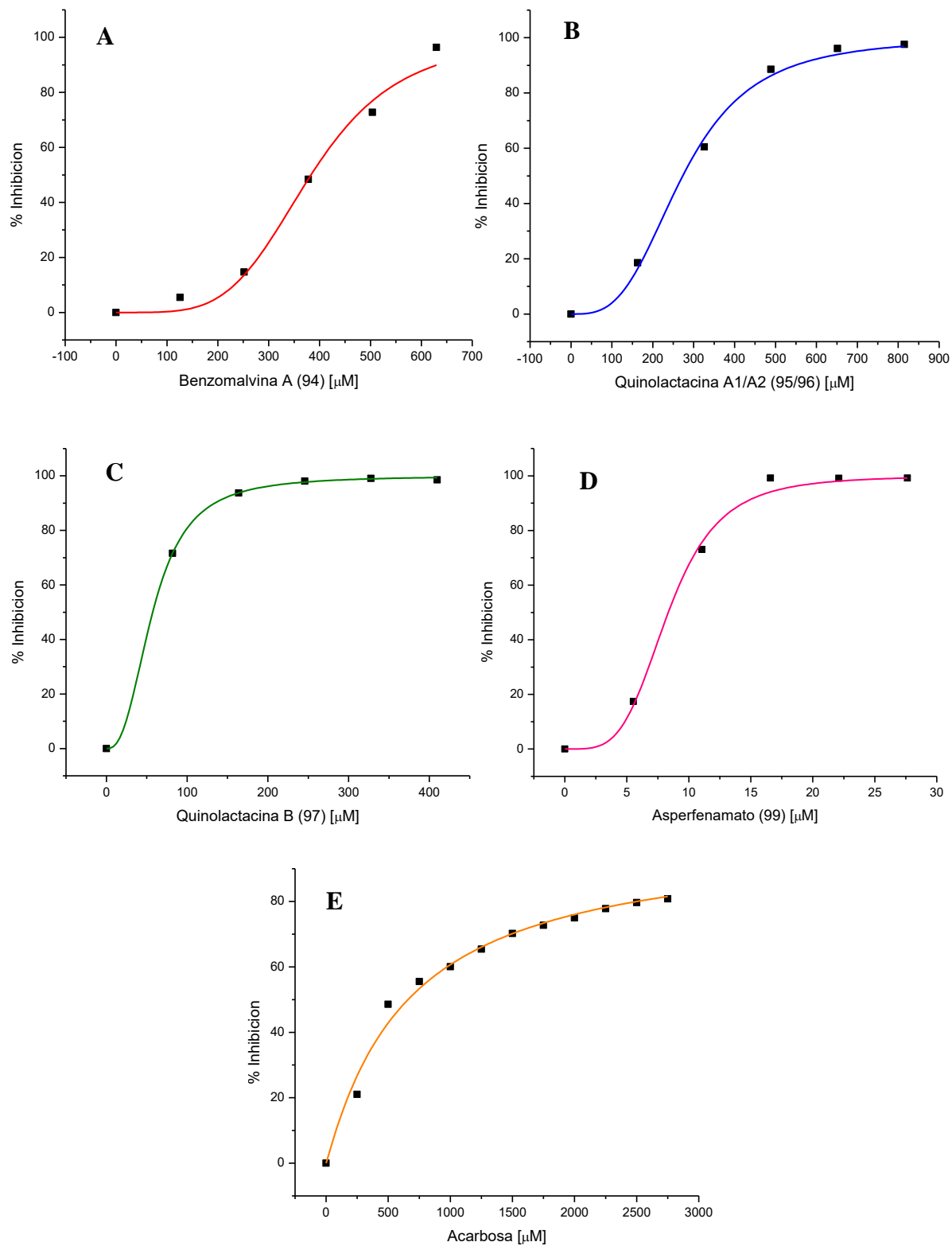


Figura 27. Curvas de concentración-respuesta del efecto inhibitorio de los compuestos **94** (A), **95-96** (B), **97**, (C), **99** (D) y acarbosa (E) sobre la α -glucosidasa de levadura.

Con base en los resultados mostrados, los compuestos **94** y **99** se evaluaron también sobre α -glucosidasa de intestino delgado de rata empleando el ensayo *in vitro* descrito en la Parte experimental. Los resultados demostraron que ambos compuestos provocan una inhibición de la actividad enzimática de cerca del 30% a una concentración de 630.25 y 454.01 μ M, respectivamente; sin embargo, no fue posible determinar la CI_{50} debido a la baja solubilidad en medio acuoso de estos metabolitos.

6.4.5 Evaluación del potencial antihiper glucémico *in vivo* de la benzomalvina A (94)

La benzomalvina A (**94**), el alcaloide producido en mayor cantidad por el microorganismo *P. spathulatum* B35, fue evaluado *in vivo* para confirmar el efecto inhibitorio de las enzimas α -glucosidasas mediante una prueba de tolerancia oral a la sacarosa. El estudio se realizó en dos conjuntos de animales, sanos e hiper glucémicos. La hiper glucemia se indujo a través de la administración de nicotinamida (NA, 50 mg/kg) y estreptozotocina (STZ, 120 mg/kg). Este tratamiento permite obtener una condición de hiper glucemia parecida a la que se manifiesta en la DMT2 (Masiello et al., 2006).

La benzomalvina A (**94**) se evaluó a las dosis de 3.1, 10 y 31.6 mg/kg. Los resultados de la prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones sanos indicaron que el compuesto **94** reduce los niveles de glucosa en sangre después de 30 minutos de la administración oral de una carga de sacarosa (3 g/kg) a todas las dosis evaluadas (Figura 28A); mientras que en ratones hiper glucémicos, solamente la dosis de 10 mg/kg presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) del pico postprandial (Figura 28B). La inhibición del pico postprandial fue comparable a la de la acarbosa (5 mg/kg) utilizada en este ensayo como control positivo.



Figura 28. Efecto antihiper glucémico de la benzomalvina A (**94**) en ratones sanos (**A**) y en ratones hiper glucémicos (**B**) en las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa.

6.4.6 Estudios de acoplamiento molecular

Con la finalidad de determinar de manera teórica el probable sitio de interacción de los confórmers de la benzomalvina A, **94a** y **94b** con las enzimas α -glucosidasas, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (docking). Para ello, se utilizaron las estructuras cristalográficas obtenidas del Protein Data Bank (PDB) de la isomaltasa de *Saccaromyces cerevisiae* (código: 3A4A), la porción *N*-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana (3LPP) y la porción *C*-terminal (3TOP) y *N*-terminal (2QMJ) de la maltasa-glucoamilasa humana. Como ligandos se utilizaron los confórmers de más baja energía de **94a** y **94b** descritos previamente. Para realizar los estudios de acoplamiento se emplearon los programas AutoDock Tools 1.5.6 y AutoDock Vina 1.1.2 (Trot et al., 2010.). Los resultados indicaron que **94a** y **94b** se unen a la enzima isomaltasa de levadura (3A4A) en sitios diferentes al sitio de unión de la acarbosa (Figura 29). Para el atropoisómero **94a**, se observaron interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Lys373, Gly564, Pro567 y Lys568 y una interacción de tipo π - π con Phe563 y el núcleo quinazolinico de **94a** (Figura 30A). Para el atropoisómero **94b**, se observaron interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Glu497, Phe563, Gly564, Asn565 y Lys569; y también dos enlaces de hidrógeno con los residuos Lys373 y Lys568 (Figura 30B).

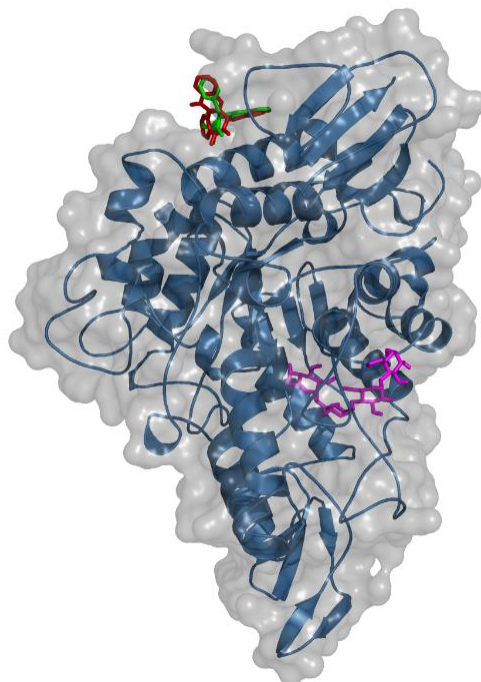


Figura 29. Modelo estructural generado para los complejos de benzomalvina A (**94a** bastones verdes y **94b** bastones rojos), y acarbosa (bastones rosas) con isomaltasa de levadura (3A4A).

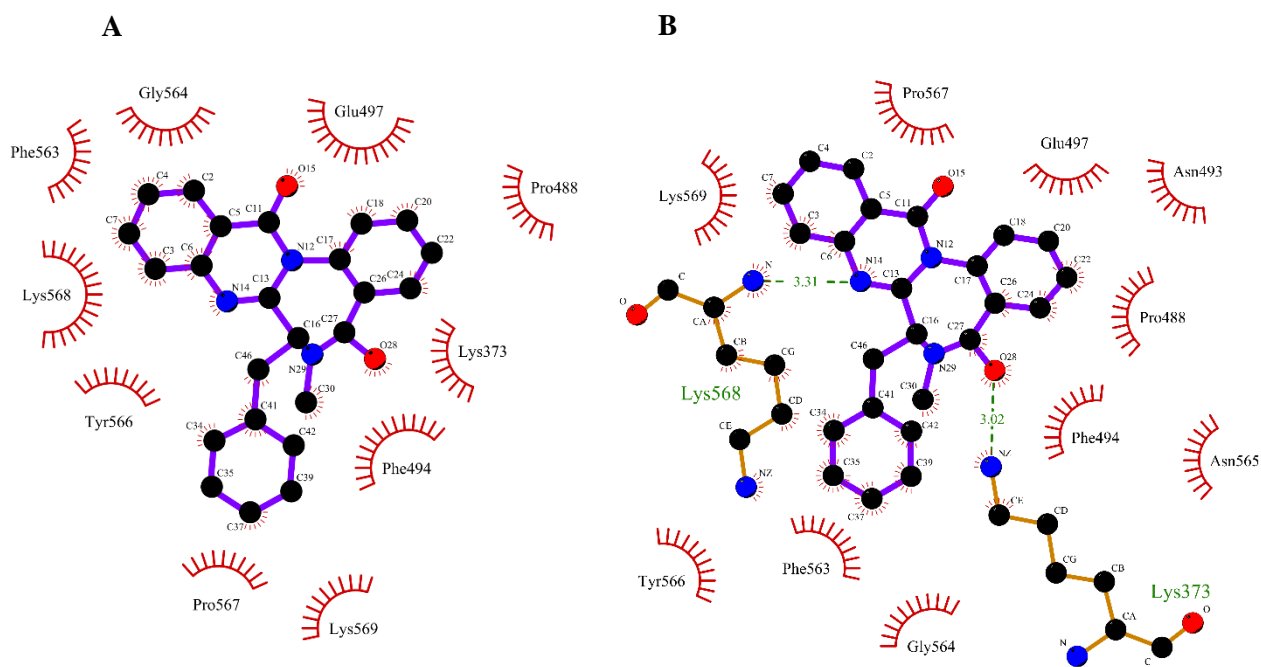


Figura 30. Modelos de interacción de **94a** (A) y **94b** (B) con los residuos de 3A4A.

Para la enzima humana 3LPP, los resultados indicaron que **94a** y **94b** se unen en el mismo sitio que el inhibidor competitivo kotalanol (Figura 31A), mostrando interacciones hidrofóbicas con los residuos Leu233, Trp327, Trp435, Met473, Phe479, Arg555, Asp571, Phe604 y Ser631 para el atropoisómero **94a**; y Asp231, Gln232, Leu233, Trp327, Trp435, Phe479, Lys509, Asp571, Phe604 y Ser631 para **94b**. Por otra parte, para la enzima 2QMJ, ambos atropoisómeros **94a** y **94b** se unen en el mismo sitio de la acarbosa (Figura 31B) con interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Tyr299, Asp327, Trp406, Asp443, Phe450, Asp542, Arg526, Phe575, Gln603 y Tyr605 para **94a**; y Asp203, Trp406, Met444, Phe450, Lys480, Arg526, Asp542 y Phe575 para **94b**. Finalmente, para la enzima 3TOP, los resultados indicaron que solo el atropoisómero **94a** se une en el mismo sitio de la acarbosa (Figura 31C) con interacciones hidrofóbicas entre Asp1157, Pro1159, Trp1369, Phe1427, Lys1460, Asp1526, Phe1559, Phe1560 y Thr1586.

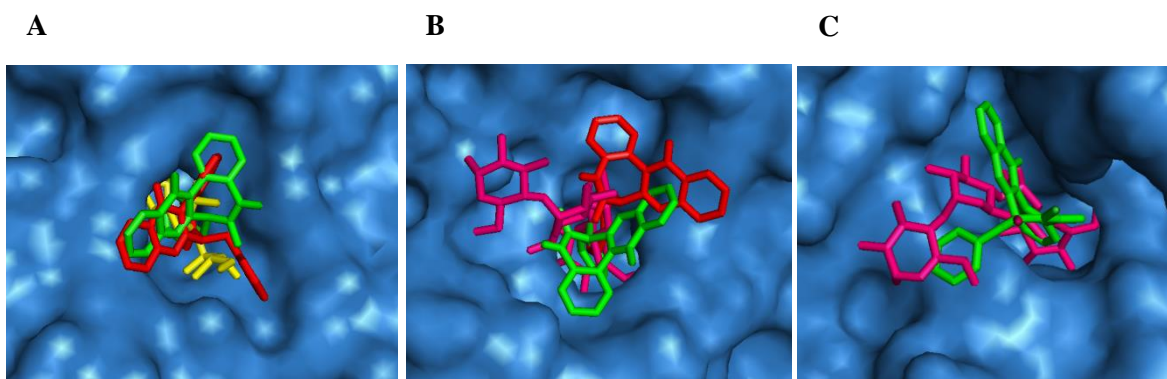


Figura 31. Modelo estructural generado para los complejos de benzomalvina A (**94a**, bastones verdes y **94b**, bastones rojos), kotalanol (bastones amarillos) y acarbosa (bastones rosas) con sacarasa-isomaltasa humana (**A**); con la porción *N*-terminal de maltasa-glucoamilasa humana (**B**); y con la porción *C*-terminal de maltasa-glucoamilasa humana (**C**).

6.4.7 Evaluación del potencial antihiperálgico *in vivo* de la benzomalvina A (**94**)

Las benzomalvinas son un tipo de alcaloides bioactivos poco comunes en la naturaleza que poseen un esqueleto único de quinazolino-benzodiazepina. En estudios previos se demostró que la benzomalvina A (**94**) tiene actividad inhibitoria *in vitro* sobre la

sustancia P con valores de K_i de 12, 42 y 43 μM en receptores de neurocinina (NK1) de cuyo, rata y humano, respectivamente (Sun et al., 1999). Como estos receptores están involucrados en la transmisión del dolor y en procesos inflamatorios neurogénicos, es altamente probable que **94** tenga propiedades antinociceptivas y/o antihiperalgésicas (Sakurada et al., 1995). Así, para poder responder parcialmente a este cuestionamiento, se evaluó la actividad antihiperalgésica de **94** en ratones hiperglucémicos (NA-STZ), considerando que la hiperalgnesia es una de las complicaciones neuropáticas causadas por la DMT2.

Para este estudio se utilizó el modelo de hiperalgnesia inducido por formalina. Los distintos grupos de ratones hiperglucémicos se trataron por vía intraplantar con benzomalvina A (**94**) a las dosis de 3.1, 10 y 31.6 $\mu\text{g/pata}$. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta evaluación, el comportamiento hiperalgésico inducido por la formalina mostró un patrón bifásico característico (Figura 32A), con una fase inicial aguda de aproximadamente 10 minutos (fase I), posteriormente un periodo relativamente inactivo, seguido de otra fase de actividad moderada (fase II). El tratamiento con el compuesto **94** a la dosis de 31.6 $\mu\text{g/pata}$ inhibió de manera significativa ($p < 0.05$) la respuesta hiperalgésica durante la fase I (Figura 32B). Por otra parte, las dosis de 10 y 31.6 $\mu\text{g/pata}$ inhibieron la respuesta hiperalgésica durante la fase II (Figura 32C). El efecto antihiperalgésico de **94** fue comparable con el de la gabapentina (GBP).

Con la finalidad de determinar si la actividad observada era debida a la interacción de **94** con receptores de benzodiazepinas GABA_A , se realizó otro experimento utilizando el antagonista flumazenil (FLU). En éste se observó que el pre-tratamiento con FLU (6 $\mu\text{g/pata}$) no disminuye el efecto antihiperalgésico de **94** (31.6 $\mu\text{g/pata}$) durante el ensayo de la formalina (Figura 33), indicando que su acción no involucra a este tipo de receptores. Evidentemente se deberán explorar otros mecanismos, incluyendo su efecto sobre los receptores NK1 para determinar el modo de acción antihiperalgésico de este compuesto.

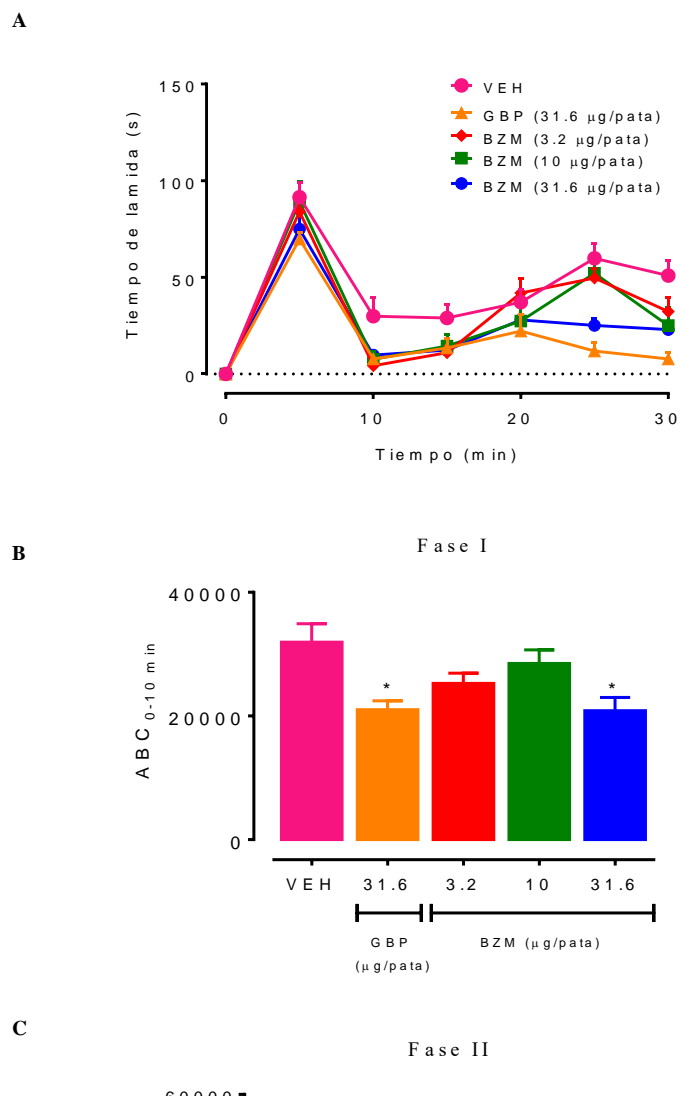


Figura 32. Curso temporal del comportamiento hiperalgésico inducido por la formalina (A). Efecto antihiperálgico de la benzomalvina A (94, BZM) sobre la fase I (B) y sobre la fase II (C).

Figura 33. Efecto antihiperalgésico de la benzomalvina A (**94**, BZM) con el pretratamiento de flumazenil (FLU) durante la fase I (**A**) y la fase II (**B**) en la prueba de formalina.

En resumen, la investigación del hongo coprófilo *Penicillium spathulatum*, condujo al aislamiento de una antraquinona novedosa caracterizada por técnicas espectroscópicas, espectrométricas, quirópticas y computacionales como la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**). Además, se aislaron la benzomalvina A (**94**) como una mezcla inseparable y equilibrada de conformeros **94a** y **94b**, las quinolactacinas A1 (**95**), A2 (**96**) y B (**97**), la quinolonimida (**98**) y el asperfenamato (**99**). Todos estos alcaloides mostraron una potente actividad *in vitro* como inhibidores de α -glucosidasas. Las propiedades antihiperglucémicas de **94** se confirmaron *in vivo* mediante una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones sanos e hiperglucémicos (NA-STZ). De manera adicional, los estudios de acoplamiento molecular predijeron que los conformeros **94a** y **94b** se unen con gran afinidad a las α -glucosidasas tanto de levadura como de humano. Finalmente, se evaluó el potencial antihiperalgésico *in vivo* de la benzomalvina A (**94**).

7. CONCLUSIONES

- Los criterios de selección quimiotaxonómico y ecológico, así como los resultados de las evaluaciones biológicas preliminares, permitieron obtener especies fúngicas que demostraron ser fuentes potenciales de agentes herbicidas o antidiabéticos.
- El estudio químico biodirigido del hongo coprófilo, *Penicillium* sp. G1-a14 condujo al aislamiento del producto **89**, un nuevo análogo del isopetasol (**90**). De manera adicional, se obtuvieron los eremofilanos isopetasol (**90**), sporogen AO-1 (**91**) y dihidrosporogen AO-1 (**92**). Los compuestos epoxidados **91** y **92** mostraron actividad como agentes fitotóxicos sobre las malezas *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. Estos resultados contrastan con lo reportado previamente en otros eremofilanos fitotóxicos de tipo petasol, en donde se observó que la presencia del grupo epóxido no guarda relación con la actividad fitotóxica.
- La investigación química de *Penicillium spathulatum* B35 condujo al aislamiento de una antraquinona novedosa caracterizada como la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**), así como de la benzomalvina A (**94**), las quinolactacinas A1 (**95**), A2 (**96**) y B (**97**), la quinolonimida (**98**) y el asperfenamato (**99**). Estos resultados son consistentes con lo reportado previamente por Frisvad y colaboradores para la especie *Penicillium spathulatum* (Frisvad et al. 2013), confirmando una vez más, que la quimiotaxonomía es una herramienta adicional valiosa para la identificación de las especies del género *Penicillium*.
- Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* permitieron determinar que los alcaloides **94-97** y **99** presentan una potente actividad como inhibidores de α -glucosidasas.
- Las propiedades antihiperglucémicas de **94** se confirmaron *in vivo* mediante una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones sanos e hiperglucémicos (NA-STZ). Los resultados indicaron que este producto natural puede constituir un prototipo estructural novedoso para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la DMT2.
- Se confirmó que la benzomalvina A (**94**) tiene potencial antihiperalgésico *in vivo*, ya que, en estudios previos *in vitro*, se observó que este quinazolino-benzodiazepina tiene propiedades sobre receptores involucrados con el dolor.

- Los resultados obtenidos en la presente investigación representan una contribución original al estudio quimiotaxonómico del género *Penicillium*, particularmente de las especies que pertenecen a las secciones *Citrina* y *Brevicompecta*. Asimismo, éstos permiten confirmar que la exploración de nichos ecológicos novedosos puede conducir al descubrimiento de especies fúngicas como fuentes potenciales de compuestos bioactivos y/o novedosos.

8. REFERENCIAS

- Abe, M.; Imai, T.; Ishii, N.; Usui, M.; Okuda, T.; Oki, T. Quinolactacide, a new quinolone insecticide from *Penicillium citrinum* Thom F 1539. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69, 1202–1205.
- Andersen, B. Consistent production of phenolic compounds by *Penicillium brevicompactum* for chemotaxonomic characterization. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1991, 60, 115–23.
- Andolfi, A.; Cimmino, A.; Vurro, M.; Berestetskiy, A.; Troise, C.; Zonno, M. C.; Motta, A.; Evidente, A. Agropyrenol and agropyrenal, phytotoxins from *Ascochyta agropyrina* var. *nana*, fungal pathogen of *Elitrigia repens*. *Phytochemistry.* 2012, 79, 102–108.
- Berchtold, M. W.; Villalobo, A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1843, 398–435.
- Birch, A. J.; Stapleford, K. S. J. The structure of Nalgiolaxin. *J. Chem. Soc. C.* 1967, 2570–2571.
- Borges de Melo, E.; Silveira-Gomes, A.; Carvalho, I. α - and β -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron.* 2006, 62, 10277–10302.
- Bu, Y. Y.; Yamazaki, H.; Ukai, K.; Namikoshi, M. Penicillimide, an open-chain hemisuccinimide from Okinawan marine-derived *Penicillium copticola*. *J. Antibiot.* 2015, 68, 537–539.
- Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman R.; Kong, Y. L.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley E. O.; Oiwa, R.; Ōmura, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 361–367.
- Bunkers, G.; Kenfield, D.; Strobel, G. Sugawara, F. Structure-activity relationships of the eremophilanes produced by *Drechslera gigantea*. *Phytochemistry.* 1990, 29, 1471–1474.
- Bycroft, B. W.; Shute, R. E. Chemistry and biosynthesis of penicillins and cephalosporins. En: Peberdy, J. F. Editor. *Penicillium and Acremonium.* 1987. Springer US, New York. p.p. 113–160.
- Campbell, W. C. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012, 13, 853–65.
- Cantrell, C. L.; Duke, S. O.; Fronczek, F. R.; Osbrink, W. L. A. Mamonov, L. K.; Vassilyev, J. I.; Wedge, D. E.; Dayan, F. E. Phytotoxic eremophilanes from *Ligularia macrophylla*. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10656–10663.
- Cantrell, C. L.; Dayan, F. E. Duke S. O. Natural products as sources of new pesticides. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 1231–1242.

- Cao, P.; Yang, J.; Miao, C. P.; Yan, Y.; Ma, Y. T.; Li, X. N.; Zhao, L. X.; Huang, S. X. New duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and structure revision of the duclauxin family. *Org. Lett.* 2015, 17, 1146–1149.
- Chakravarti, R.; Sahai, V. Compactin—a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64, 618–624.
- Choi, Y. W.; Hyde, K. D.; Ho, W. H. Single spore isolation from fungi. *Fungal Divers.* 1999, 3, 29–38.
- Cimmino, A.; Masi, M.; Evidente, M.; Superchi, S.; Evidente, A. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. *Nat. Prod. Rep.* 2015, 32, 1629–1653.
- Clark, B.; Capon, R. J.; Lacey, E.; Tennant, S.; Hill, J. H. Quinolactacins revisited: from lactams to imide and beyond. *Org. Biomol. Chem.* 2006, 4, 1512–1519.
- Cox, R. J.; Al-Fahad, A. Chemical mechanisms involved during the biosynthesis of tropolones. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17, 532–6.
- Cutler, H. G.; Crumley, F. G.; Cox, R. H.; Wells, J. M.; Cole, R. J. The biological properties of cyclopenin and cyclophenol. *Plant Cell Physiol.* 1984, 25, 257–263.
- Dabhi, A. S.; Bhatt, N. R.; Shah, M. J. Voglibose: an alpha glucosidase inhibitor. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013, 7, 3023–3027.
- Daengrot, C.; Rukachaisirikul, V.; Tansakul, C.; Thongpanchang, T.; Phongpaichit, S.; Bowornwiriyan, K.; Sakayaroj, K. Eremophilane sesquiterpenes and diphenyl thioethers from the soil fungus *Penicillium copticola* PSU-RSPG138. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 615–622.
- Datta, S. C.; Ghosh, J. J. Effect of citreoviridin, a mycotoxin from *Penicillium citreoviride*, on kinetic constants of acetylcholinesterase and ATPase in synaptosomes and microsomes from rat brain. *Toxicon.* 1981, 19, 555–562.
- Davies, G.; Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 1995, 3, 853–859.
- Dayan, F. E.; Duke, S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant Physiol.* 2014, 166, 1090–1105.
- DeFronzo, R. A.; Ferrannini, E.; Groop, L.; Henry, R. R.; Herman, W. H.; Holst, J. J.; Hu, F. B.; Kahn, C. R.; Raz, I.; Shulman, G. I.; Simonson, D. C.; Testa, M. A.; Weiss, R. Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Disease Primers* 2015, 1, 1–22.
- Del Valle, P.; Figueroa, M.; Mata, R. Phytotoxic eremophilane sesquiterpenes from the coprophilous fungus *Penicillium* sp. G1-a14. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 339–342.
- Del Valle, P.; Martínez, A. L.; Figueroa, M.; Raja, H. A.; Mata, R. Alkaloids from the fungus *Penicillium spathulatum* as α -glucosidase inhibitors. *Planta Medica.* 2016, 82, 1286–1294.
- Derewacz, D. K.; McNeese, C. R.; Scalmani, G.; Covington, C. L.; Shanmugam, G.; Marnett, L. J.; Polavarapu, P. L.; Bachmann, B. O. Structure and stereochemical determination of hypogeamicins from a cave-derived actinomycete. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 1759–1763.
- Du, L.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. Unusual C25 steroid isomers with bicycle[4.4.1]A/B rings from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum*. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 1343–1351.

- Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Romagni J. G.; Rimando, A. D. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Res.* 2000, 40, 99– 111.
- El-Neketi, M.; Ebrahim, W.; Lin, W.; Gedara, S.; Badria, F.; Saad, H. E. A.; Lai, D.; Proksch, P. Alkaloids and polyketides from *Penicillium citrinum*, an endophyte isolated from the moroccan plant *Ceratonia siliqua*. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 1099–1104.
- Environmental Protection Agency (EPA, USA). Biopesticides: <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides> (Consultado el 18 de septiembre de 2016).
- Fan, Y.; Wang, Y.; Liu, P.; Fu, P.; Zhu, T.; Wang, W.; Zhu, W. Indole-diterpenoids with anti-H1N1 activity from the aciduric fungus *Penicillium camemberti* OUCMDZ-1492. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 1328–1336.
- Finefield, J. M.; Frisvad, J. C.; Sherman, D. H.; Williams, R. M. Fungal origins of the bicycle[2.2.2]diazaoctane ring system of prenylated indole alkaloids. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 812–833.
- Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology.* 1929, 10, 226–236.
- Frisvad, J. C.; Andersen, B.; Thrane, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.* 2008, 112, 231–240.
- Frisvad, J. C.; Houbraken, J.; Popma, S.; Samson, R. A. Two new *Penicillium* species *Penicillium buchwaldii* and *Penicillium spathulatum*, producing the anticancer compound asperphenamate. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013, 339, 77– 92.
- Gao, J. M.; Yang, S. X.; Qin, J. C. Azaphilones: chemistry and biology. *Chem. Rev.* 2013, 113, 4755– 4811.
- Gayathri, L.; Dhivya, R.; Dhanasekaran, D.; Periasamy, V. S.; Alshatwi, A. A.; Akbarsha, M. A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: *In vitro* study in HepG2 cell. *Food Chem. Tox.* 2015, 83, 151-163.
- Gerwick, B. C.; Brewster, W. K.; Deboer, G. J.; Fields, S. C.; Graupner, P. R.; Hahn, D. R.; Pearce, C. J.; Schmitzer, P. R.; Webster, J. D. Mevalocidin: a novel, phloem mobile phytotoxin from *Fusarium* DA056446 and *Roselina* DA092917. *J. Chem. Ecol.* 2013, 39, 253–261.
- González-Andrade, M.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R.; Sosa-Peinado, A. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytic. Biochem.* 2009, 387, 64–70.
- González-Andrade, M.; Del Valle, P.; Macías-Rubalcava, M. L.; Sosa-Peinado, A.; González, M. C.; Mata, R. Calmodulin inhibitors from *Aspergillus stromatoides*. *Chem. Biodivers.* 2013; 10, 328–337.
- Gupta, S; Dikshit, K. Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. *J. Biopest.* 2010, 3, 186–188.
- Hamlyn, P. F.; Wales, D. S.; Sagar, B. F. Extracellular enzymes of *Penicillium*. En: Peberdy, J. F. Editor. *Penicillium and Acremonium*. 1987. Springer US, New York. p.p. 245–284.
- Hanson, J. R. Editor. *The Chemistry of Fungi*. 2008. Ed. RCS Publishing.

- Hoffmeister, D.; Keller, N. P. Natural products of filamentous fungi; enzymes, genes and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* 2007, 24, 393–416.
- Hou, X. M.; Wang, C. Y.; Gu, Y. C.; Shao, C. L. Penimethavone A, a flavone from a gorgonian-derived fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Prod. Res.* 2016, 2274–2277,
- Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus.* 2011(a), 2, 87–95.
- Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal diversity.* 2010, 44, 117–133.
- Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Stud. Mycol.* 2011(b), 70, 53–138.
- Houbraken, J.; Samson, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Stud. Mycol.* 2011, 70, 1–51.
- Houbraken, J.; Wang, L.; Lee, H. B.; Frisvad, J. C. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia.* 2016, 36, 299–314.
- Huang, Y. F.; Qiao, L.; Lv, A. L.; Pei, Y. H.; Tian, L. Eremophilane sesquiterpenes from the marine fungus *Penicillium* sp. BL27-2. *Chin. Chem. Lett.* 2008, 19, 562–564.
- Ingavat, N.; Dobereiner, J.; Wiyakrutta, S.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. Aspergilusol A, an α -glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 2049–2052.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Información general sobre los herbicidas:
http://www.inecc.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres_1.pdf (Consultado el 18 de septiembre de 2016).
- Israili, Z. H. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* 2011, 18, 117–152.
- Jeandet, P. Phytoalexins: current progress and future prospects. *Molecules.* 2015, 20, 2770–2774.
- Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. *Tetrahedron* 2012, 68, 8245–8250.
- Kim, W. G.; Song, N. K.; Yoo, I. D. Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 2001, 54, 831–835.
- King, R. R.; Calhoun, L. A. The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry* 2009, 70, 833–841.
- Kirst, H. A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J. Antibiot.* 2010, 63, 101–111.
- Ko, W.; Sohn, J. H.; Kim, Y. C.; Oh, H. Viridicatol from marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5295 exerts anti-inflammatory effects through inhibiting NF-KB signaling pathway on lipopolysaccharide-induced RAW264.7 and BV2 cells. *Nat. Prod. Sci.* 2015, 21, 240–247.

- Kozlovskii, A. G.; Zhelifonova, V. P.; Antipova, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013, 49, 1–10.
- Kozlovsky, A. G.; Zhelifonova, V. P.; Antipova, T. V.; Adanin, V. M.; Ozerskaya, S. M. Quinocitrinines A and B, new quinolone alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a permafrost fungus. *J. Antibiot.* 2003, 56, 488–491.
- Le, D. H.; Takenaka, Y.; Hamada, N.; Tanahashi, T. Eremophilane-type sesquiterpenes from cultured lichen mycobionts of *Sarcographa tricosia*. *Phytochemistry*. 2013, 91, 242–248.
- Li, S. M. Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 2010, 27, 57–78.
- Liao, L.; Lee, J. H.; You, M.; Choi, T. J.; Park, W.; Lee, S. K.; Oh, D. C.; Oh, K. B.; Shin, J. Penicillipyrones A and B, meroterpenoids from a marine-derived *Penicillium* sp. fungus. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 406–410.
- Link, H. F. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio Ima. Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin 3: 3–42.
- Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J. Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic and synthetic organic chemistry. *Chem. Rev.* 2012, 112, 1839–1862.
- Lu, Z. Yu.; Lin, Z. J.; Wang, W. L.; Du, L.; Zhu, T. J.; Fang, Y. C.; Gu, Q. Q.; Zhu, W. M. Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 543–546.
- Lui, Y.; Yang, Q.; Xia, G.; Huang, H.; Li, H.; Ma, L.; Lu, Y.; He, L.; Xia, X.; She, Z. Polyketides with α -glucosidase inhibitory activity from a mangrove endophytic fungus, *Penicillium* sp. HN29-3B1. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 1816–822.
- Ma, Y. M.; Liang, X. A.; Kong, Y.; Jia, B. Structural diversity and biological activities of indole diketopiperazine alkaloids from fungi. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 6659–6671.
- Macías, F. A.; Carrera, C.; Galindo, J. C. G. Brevianes revisited. *Chem. Rev.* 2014, 114, 2717–2732.
- Macías, M.; Gamboa A.; Ulloa M.; Toscano R. A. Mata R. Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry* 2001, 58, 751–758.
- Macías-Rubalcava, M. L.; Ruiz-Velasco, M. E.; Meléndez-González, C.; King-Díaz, B.; Lotina-Hennsen, B. Selected phytotoxins and organic extracts from endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as light reaction of photosynthesis inhibitors. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2014, 138, 17–26.
- Maciello, P.; Christophe, B.; Gross, R.; Roye, M.; Manteghetti, M.; Hillaire-Buys, D.; Novelli, M.; Ribes, G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administrated streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes.* 1998, 47, 224–229.
- Mantle, P. G. Secondary metabolites of *Penicillium* and *Acremonium*. En: Peberdy, J. F. Editor. *Penicillium and Acremonium*. 1987. Springer US, New York. p.p. 161–243.

- Martínez-Luis, S.; Rodríguez, R.; Acevedo, L.; González, M. C.; Lira-Rocha, A.; Mata, R. Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron*, 2006, 62, 1817–1822.
- Mata, R.; Figueroa, M.; González-Andrade, M.; Rivera-Chávez, J. A.; Madariaga, M.; Del Valle, P. Calmodulin inhibitors from natural sources: an update. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 576–586.
- Matsuda, K. Pyrethrin biosynthesis and its regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Top Curr. Chem.* 2012, 314, 73–81.
- Matsuda, Y.; Awakawa, T.; Mori, T.; Abe, I. Unusual chemistries in fungal meroterpenoid biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016, 31, 1–7.
- Meepagala, K. M.; Johnson, R. D., Duke, S. O. Curvularin and dehydrocurvularin as phytotoxic constituents from *Curvularia Intermedia* infecting *Pandanus amaryllifolius*. *J. Aric. Chem Environ.* 2016, 5, 12–22.
- Meng, L. H.; Li, X. M.; Lv, C. T.; Li, C. S.; Xu, G. M.; Huang, C. G.; Wang, B. G. Sulfur-containing cytotoxic curvularin macrolides from *Penicillium sumatrense* MA-92, a fungus obtained from the rhizosphere of the mangrove *Lumnitzera racemosa*. *J Nat Prod.* 2013, 76, 2145–2149.
- Meng, L. H.; Liu, Y.; Li, X. M.; Xu, G. M.; Ji, N. Y.; Wang, B. G. Citrifelins A and B, citrinin adducts with a tetracyclic framework from cocultures of marine-derived isolates of *Penicillium citrinum* and *Beauveria feline*. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 2301–2305.
- Morino, T, K.; Shimada, A Masuda, N Yamashita, M Nishimoto, T Nishikiori, S Saito. Structural determination of stevastelins, novel depsipeptides from *Penicillium* sp. *J Antibiot.* 1996, 49, 564–568.
- Motohashi K.; M.; Hashimoto, J.; Inaba, S.; Khan, S. T.; Komaki, H.; Nagai, A.; Takagi, M.; Shin-ya, K. New sesquiterpenes, JBIR-27 and -28, isolated from a tunicate-derived fungus, *Penicillium* sp. SS080624SCf1. *J. Antibiot.* 2009, 62, 47–250.
- Mrema, E. J.; Rubino, F. M.; Brambilla, G.; Moretto, A.; Tsatsakis, A. M.; Colosio, C. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology.* 2013, 307, 74–88.
- Murao, S.; Hayashi, H.; Takiuchi, K.; Arai, M. Okaramine A, a novel indole alkaloid with insecticidal activity, from *Penicillium simplicissimum* AK-40. *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52, 885–886.
- Nakazaki K.; Hayashi, K.; Hosoe, S.; Tashiro, T.; Kuse, M.; Takikawa, H.; First synthesis of decaturin C, an antiinsectant diterpenoid isolated from *Penicillium thiersii*. *Tetrahedron* 2012, 68, 9029–9034.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 629–661.
- Nicoletti, R.; Ciavatta, M. L.; Buommino, E.; Tufano, M. A. Antitumor extrolites produced by *Penicillium* species. *Int. J. Biomed. Pharma. Sci.* 2008, 2, 1–23.
- Nicoletti, R.; Manzo, E.; Ciavatta, M. L. Occurrence and bioactivities of funicone-related compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 1430–1444.
- Nicoletti, R.; Trincone, A. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Mar. Drugs.* 2016, 14, 37.

- Nugroho, A. E.; Morita, H. Circular dichroism calculation for natural products. *J. Nat. Med.* 2014, 68, 1–10.
- Oerke, E. C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 2006, 144, 31–43.
- Okuda, T.; Klich, M. A.; Seifert, K. A.; Ando, K. Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. En: Samson, R. A.; Pitt, J. I. Eds. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. 2000. Harwood Academic Publishers. p.p. 83–99.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Manejo de malezas para países en desarrollo: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s05.htm#TopOfPage> (Consultado el 18 de septiembre de 2016).
- Orjala, J.; Oberlies, N. H.; Pearce, C.J., Swanson S.M.; A. Kinghorn, D. Discovery of potential anticancer agents from aquatic cyanobacteria, filamentous fungi, and tropical plants. En: Tringali, C. Ed. Bioactive compounds from natural sources 2a ed. Natural products as lead compounds in drug discovery. 2011. CRC Press. p.p. 37–64.
- Ovalle-Magallanes, B.; Medina-Campos, O. N.; Pedraza-Chaverri, J.; Mata, R. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*. 2015, 110, 111–119.
- Owens, D. K.; Nanayakkara, N. P.; Dayan, F. E. In planta mechanism of action of leptospermone: impact of its physico-chemical properties on uptake, translocation, and metabolism. *J. Chem. Ecol.* 2013, 39, 262–270.
- Patel, G.; Patil, M. D.; Soni, S.; Khobragade, T. P.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*—A comparison of two methods of optimization. *Biotech. Rep.* 2016, 11, 77–85.
- Pearce, C. Where are the new medicines? The case for terrestrial microorganisms. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2011, 2, 136–137.
- Perrone, G.; Samson, R. A.; Frisvad, J. C.; Susca, A.; Gunde-Cimerman, N.; Epifani, F.; Houbraken, J. *Penicillium salamii*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. *Int. J. Food. Microbiol.* 2015, 193, 91–98.
- Peterson, S. W. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST?. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. 95, 339–344.
- Petroski, R. J.; Stanley, D. W. Natural compounds for pest and weed control. *J. Agric. Chem.* 2009, 57, 8171–8179.
- Pitt J. I. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. En: DeVries, J.; Trucksess, M. W.; Jackson, L. S. Eds. Mycotoxins and food safety. CRC Press, Londres. 2002. p.p. 29–41.
- Pitt J. I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. 1980. Academic Press, London.
- Pitt, J. I.; Hocking, A. D. Fungi and food spoilage, 3a ed. 2009. Springer, Londres.
- Pitt, J. I.; Samson, R. A.; Frisvad, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. En: Samson R. A.; Pitt, J. I. Eds. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. CRC Press, Londres. 2000. p.p. 9–46.
- Pitterna, T.; Cassayre, J.; Hüter, O. F.; Jung, P. M. J., Maienfisch, Peter.; Kessabi, F. M.; Quaranta, L.; Tobler, H. New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 4085–4095.

- Reina, M.; Santana, O.; Dominguez, D. M.; Villarroel, L.; Fajardo, V.; Rodríguez, M. L.; González-Coloma, A. Defensive sesquiterpenes from *Senecio candidans* and *S. magellanicus*, and their structure-activity relationships. *Chem. Biodivers.* 2012, 9, 625–643.
- Raja, H. A.; Kaur, A.; El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Kumar, R.; Deep, G.; Agarwal, R.; Faeth, S. H.; Cech, N. B.; Oberlies, N. H. Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn. (milk thistle). *Mycology* 2015, 6, 8–27.
- Rangel-Grimaldo, M.; Rivero-Cruz, I.; Madariaga-Mazón, A.; Figueroa, M.; Mata, R. α -glucosidase inhibitors from *Preussia minimoides*. *J. Nat. Prod.* 2016, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00574.
- Ren, L.; Cao, X.; Geng, P.; Bai, F.; Bai, G. Study of the inhibition of two human maltase-glucoamylases catalytic domains by different α -glucosidase inhibitors. *Carbohydr. Res.* 2011, 346, 2688–92.
- Rivera-Chávez, J.; Figueroa, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; Mata, R. α -glucosidase inhibitors from a *Xylaria feejeensis* associated with *Hintonia latiflora*. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 730–735.
- Rivera-Chávez, J.; González-Andrade, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; Mata, R. Thielavins A, J and K: α -glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophyte fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 2013, 94, 198–205.
- Sakurada, T.; Katsumata, K.; Yogo, H.; Tan-Ho, K.; Sakurada, S.; Ohba, M.; Kisara, K. The neurokinin-1 receptor antagonist, sendide, exhibits antinociceptive activity in the formalin test. *Pain* 1995, 60, 175–180.
- Sasaki, M.; Tsuda, M.; Sekiguchi, M.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. Perinadine A, a novel tetracyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Org. Lett.* 2005, 7, 4261–4264.
- Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS.* 2012, 109, 6241–6246.
- Seiber, J. N.; Coats, J.; Duke, S. O.; Gross, A. D. Biopesticides: state of art and future opportunities. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 11613–11619.
- Shang, Z.; Khalil, Z.; Li, L.; Salim, A. A.; Quezada, M.; Kalansuriya, P.; Capon, R. J. Roseopurpurins: chemical diversity enhanced by convergent biosynthesis and forward and reverse Michael additions. *Org. Lett.* 2016, 18, 4340–4343.
- Shin H. J.; Pil, G. B.; Heo, S. J.; Lee, H. S.; Lee, J. S.; Lee, Y. J.; Lee, J.; Won, H. S. Anti-inflammatory activity of tanzawaic acid derivatives from a marine-derived fungus *Penicillium steckii* 108YD142. *Mar. Drugs.* 2016, 14.
- Smith, M. E.; Henkel, T. W.; Rollins, J. A. How many fungi make sclerotia?. *Fungal Ecology.* 2015, 13, 211–220.
- Sugama, K.; Hayashi, K.; Nakagawa, T.; Mitsushashi, H.; Yoshida, N. Sesquiterpenoids from *Petasites fragans*. *Phytochemistry.* 1983, 22, 1619–1622.
- Sugawara, F.; Hallock, Y. F.; Bunkers, G. D.; Kenfield, D. S.; Strobel, G.; Yoshida, S. Phytoactive eremophilanes produced by the weed pathogen *Drechslera gigantea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993, 57, 236-239.

- Sugimori, T.; Okawa, T.; Eguchi, S.; Kakehi, A.; Yashima, E.; Okamoto, Y. The first total synthesis of (–)-benzomalvin A and benzomalvin B via the intramolecular aza-Wittig reactions. *Tetrahedron*. 1998, 54, 7997–8008.
- Sun, H. H.; Barrow, C. J.; Cooper, R. Benzomalvin D, a new 1,4-benzodiazepine atropisomer. *J. Nat. Prod.* 1995, 58, 1575–1580.
- Sun, H. H.; Barrow, C. J.; Sedlock, D. M.; Gillum, A. M.; Cooper, R. Benzomalvins, new substance P inhibitors from a *Penicillium* sp. *J. Antibiot.* 1994, 47, 515–522.
- Takahashi, S.; Kakinuma, N.; Iwai, H.; Yanagisawa, T.; Nagai, K.; Suzuki, K.; Tokunaga, T.; Nakagawa, A. Quinolactacins A, B, and C: Novel quinolone compounds from *Penicillium* sp. EPF-6. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.* 2000, 53, 1252–1256.
- Takikawa, H. Synthetic studies on breviones and structurally related natural products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006, 70, 1082–1088.
- Toledo, T. R.; Dejadi, N. N.; Silva, M. L. G.; Kossuga, M. H.; Berlinck, R. G. S.; Sette, L. D.; Medeiros, A. I. Potent anti-inflammatory activity of pyrenocine A isolated from the marine-derived fungus *Penicillium paxilli* Ma(G)K. *Mediators Inflamm.* 2014, 4, 767061, 11.
- Trot, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010, 31, 445–461.
- Tsuda, M.; Kasai, Y.; Komatsu, K.; Sone, T.; Tanaka, M.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Org. Lett.* 2004, 6, 3087–3089.
- Vanittanakom, N.; Chester, R.; Cooper, J., Fisher, M. C.; Sirisanthana, T. *Penicillium marneffeii* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 95–110.
- Visagie, C. M.; Houbraeken, J.; Frisvad, J. C.; Hong, S.-B.; Klaassen, C. H. W.; Perrone, G.; Seifert, K. A.; Varga, J.; Yaguchi, T.; Samson, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 2014, 78, 343–371.
- Wallwey, C.; Li, S. M. Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* 2011, 28, 496–510.
- Wang, B.; Wang L. *Penicillium kongii*, a new terverticillate species isolated from plant leaves in China. *Mycologia.* 2013, 105, 1547–1554.
- Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. *Nat. Protoc.* 2014, 9, 643–660.
- Wilkins, A. L.; Miles, C. O.; Ede, R. M.; Gallagher, R. T.; Munday, S. C. Structure elucidation of janthitrem B, a tremorgenic metabolite of *Penicillium janthinellum*, and relative configuration of the A and B rings of janthitrems B, E, and F. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 1307–1309.
- Wu, Y. Z. Fang, Q.; Xu, G. W.; Zhao, J.; Teng, J. Fang.; Chun, L. Deng, W. J. Neuroprotective metabolites from the endophytic fungus *Penicillium citrinum* of the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Phytochem. Lett.* 2015. 12, 148–152.
- Yilmaz, N.; Visagie, C. M.; Houbraeken, J.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud. Mycol.* 2014, 78, 175–341.

- Yuan, L.; Wang, J. H.; Sun, T. M. Total synthesis and anticancer activity studies of the stereoisomers of asperphenamate and patriscabratine. *Chin. Chem. Lett.* 2010, 21, 155–158.
- Yurchenko, A. N.; Smetanina, O. F.; Kalinovskii, A. I.; Kirichuk, N. N.; Yurchenko, E. A.; Afiyatullo, S. S. Biologically active metabolites of the facultative marine fungus *Penicillium citrinum*. *Chem. Nat. Compd.* 2013, 48, 996–998.
- Zhang, X.; Jiang, W.; Sui, Z. Concise enantioselective syntheses of quinolactacins A and B through alternative Winterfeldt oxidation. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 4523–4526.
- Zhelifonova, V. P.; Antipova, T. V.; Kozlovsky, A. G. Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology.* 2010, 79, 277–286.
- Zhou, H.; Li, L.; Wu, C.; Kurtán, Tibor.; Mándi, Attila.; Liu, Y.; Gu, Q.; Zhu, T.; Guo, P.; Li, D. Penipyridones A-F, pyridine alkaloids from *Penicillium funiculosum*. 2016, 79, 1783–1790.
- Zuo, Z.; Ma, D. Enantioselective total syntheses of communesins A and B. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 12008–12011.

ANEXO

LISTA DE CONTENIDO

- A-1.** Lista de especies de *Penicillium* que pertenecen a la sección *Citrina*.
- A-2.** Lista de especies de *Penicillium* que pertenecen a la sección *Brevicompecta*.
- A-3.** Ensayo de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *hCaM M124C-mBBr*.
- A-4.** Evaluación de la interacción de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) con la calmodulina (CaM).
- A-5.** Identificación molecular de los aislamientos fúngicos G1-a8, G1-b25, G1-b5 y G1-b15.
- A-6.** Estudio químico de la especie G1-a8 (*Penicillium brevicompectum*).
- A-7.** Estudio químico de la especie *Penicillium* sp. G1-b15.
- A-8.** Espectro COSY del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.
- A-9.** Espectro HSQC del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.
- A-10.** Espectro HMBC del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.
- A-11.** Espectro NOESY del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.
- A-12.** Espectro de masas (HRESIMS) del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**).
- A-13.** Espectro de ¹H-RMN del isopetasol (**90**) (CDCl₃, 500 MHz).
- A-14.** Espectro de ¹³C-RMN del isopetasol (**90**) (CDCl₃, 125 MHz).
- A-15.** Espectro de ¹H-RMN del sporogen AO-1 (**91**) (CDCl₃, 500 MHz).
- A-16.** Espectro de ¹³C-RMN del sporogen AO-1 (**91**) (CDCl₃, 125 MHz).
- A-17.** Espectro de ¹H-RMN del dihydrosporogen AO-1 (**92**) (CDCl₃, 300 MHz).
- A-18.** Espectro de ¹³C-RMN del dihydrosporogen AO-1 (**92**) (CDCl₃, 75 MHz).
- A-19.** Energías libres calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP, población conformacional, y valores teóricos de fuerzas de rotación ($R_{(len)}$) para los conformeros del enantiómero 3*R*4*R*5*R*6*R* de **89**.

- A-20.** Energías libres calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP, población conformacional, y valores teóricos de fuerzas de rotación ($R_{(len)}$) para los conformeros del enantiómero 3S4S5S6S de **89**.
- A-21.** Espectro de ^1H -RMN de la benzomalvina A (**94**) (CDCl_3 , 500 MHz).
- A-22.** Espectro de ^{13}C -RMN de la benzomalvina A (**94**) (CDCl_3 , 125 MHz).
- A-23.** Espectro de ^1H -RMN de la mezcla de quinolactacina A1 (**95**) y A2 (**96**) (CDCl_3 , 500 MHz).
- A-24.** Espectro de ^{13}C -RMN de la mezcla de quinolactacina A1 (**95**) y A2 (**96**) (CDCl_3 , 125 MHz).
- A-25.** Espectro de masas (FAB+) de la mezcla de quinolactacina A1 (**95**) y A2 (**96**).
- A-26.** Espectro de ^1H -RMN de la quinolactacina B (**97**) ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz).
- A-27.** Espectro de ^{13}C -RMN de la quinolactacina B (**97**) ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz).
- A-28.** Espectro de masas (ESIMS) de la quinolactacina B (**97**).
- A-29.** Espectro de ^1H -RMN del asperfenamato (**99**) (CDCl_3 , 400 MHz).
- A-30.** Espectro de ^{13}C -RMN del asperfenamato (**99**) (CDCl_3 , 100 MHz).
- A-31.** Espectro de masas (ESIMS) del asperfenamato (**99**).
- A-32.** Espectro COSY de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) en Acetona- d_6 .
- A-33.** Espectro HSQC de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) en Acetona- d_6 .
- A-34.** Espectro HMBC de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) en Acetona- d_6 .
- A-35.** Espectro HMBC de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) en Acetona- d_6 .
- A-36.** Espectro de ^1H -RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) (Metanol- d_4 , 500 MHz).
- A-37.** Espectro de ^{13}C -RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) (Metanol- d_4 , 125 MHz).
- A-38.** Espectro ATR-FTIR de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**).

- A-39.** Espectro de masas (HRESIMS) de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**).
- A-40.** Desplazamientos químicos calculados para los 18 conformeros del enantiómero *S* del producto **100** (escalados a ppm).
- A-41.** Desplazamientos químicos calculados para los 18 conformeros del enantiómero *S* de una estructura alternativa del producto **100** (escalados a ppm).
- A-42.** Espectro de ^1H -RMN del ácido micofenólico (**31**) (CDCl_3 , 400 MHz).
- A-43.** Espectro de ^{13}C -RMN del ácido micofenólico (**31**) (CDCl_3 , 100 MHz).
- A-44.** Espectro de ^1H -RMN de la brevianamida A (**38**) (CDCl_3 , 500 MHz).
- A-45.** Espectro de ^{13}C -RMN de la brevianamida A (**38**) (CDCl_3 , 125 MHz).
- A-46.** Espectro de ^1H -RMN de la griseofulvina (**101**) (CDCl_3 , 400 MHz).
- A-47.** Espectro de ^{13}C -RMN de la griseofulvina (**101**) (CDCl_3 , 100 MHz).
- A-48.** Espectro de ^1H -RMN de la 3-metoxi-4-hidroxi-4-(4'-metoxifenil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-quinolinona (**102**) (CDCl_3 , 400 MHz).
- A-49.** Espectro de ^{13}C -RMN de la 3-metoxi-4-hidroxi-4-(4'-metoxifenil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-quinolinona (**102**) (CDCl_3 , 100 MHz).

A-1. Lista de especies de *Penicillium* sección *Citrina*

<i>P. anaticum</i>	<i>P. godlewskii</i>	<i>P. sanguifluum</i>
<i>P. argentinense</i>	<i>P. gorlenkoanum</i>	<i>P. shearii</i>
<i>P. atrofulvum</i>	<i>P. hetheringtonii</i>	<i>P. sizovae</i>
<i>P. aurantiacobrunneum</i>	<i>P. manginii</i>	<i>P. steckii</i>
<i>P. cairnsense</i>	<i>P. miczynskii</i>	<i>P. sumatrense</i>
<i>P. christenseniae</i>	<i>P. neomiczynskii</i>	<i>P. terrigenum</i>
<i>P. chrzaszczii</i>	<i>P. nothofagi</i>	<i>P. tropicoides</i>
<i>P. citrinum</i>	<i>P. pancosmium</i>	<i>P. tropicum</i>
<i>P. copticola</i>	<i>P. pasqualense</i>	<i>P. ubiquetum</i>
<i>P. cosmopolitanum</i>	<i>P. paxilli</i>	<i>P. vancouverense</i>
<i>P. decaturense</i>	<i>P. quebecense</i>	<i>P. waksmanii</i>
<i>P. euglaucum</i>	<i>P. raphiae</i>	<i>P. wellingtonense</i>
<i>P. gallaicum</i>	<i>P. roseopurpureum</i>	<i>P. westlingii</i>

A-2. Lista de especies de *Penicillium* sección *Brevicompecta*

<i>P. astrolabium</i>	<i>P. kongii</i>
<i>P. bialowiezense</i>	<i>P. neocrassum</i>
<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. olsonii</i>
<i>P. buchwaldii</i>	<i>P. spathulatum</i>
<i>P. fennelliae</i>	<i>P. tularense</i>

A-3. Ensayo de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor *hCaM M124C-mBBr*

Los ensayos conducentes a determinar la afinidad de los productos aislados sobre la proteína calmodulina se realizaron mediante el estudio de apagamiento de la fluorescencia extrínseca empleando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr* a una concentración de 1 μM en solución amortiguadora de acetato de sodio (NaOAc, 5 mM, pH 5.1) y CaCl_2 10 mM, siguiendo la metodología descrita por González-Andrade y colaboradores (González-Andrade et al., 2009). Los espectros de fluorescencia se registraron en un

espectrofluorómetro ISS-PC1 a 37 °C, con una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 381 nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) adquirida en un rango de 415-550 nm. El biosensor fluorescente se tituló con una solución del compuesto a evaluar. Para el registro de los espectros se utilizó el programa VINCI 1.6.SP4. Los datos obtenidos se ajustaron para obtener el valor de la constante de disociación K_d del complejo proteína-ligando mediante la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{\left[1 + K_d + \left(\frac{L_0}{P_0}\right)\right] - \sqrt{\left[1 + \left(\frac{K_d}{P_0}\right) + \left(\frac{L_0}{P_0}\right)\right]^2 - 4\left(\frac{L_0}{P_0}\right)}}{2}$$

Ecuación 10

donde P_0 y L_0 son las concentraciones de proteína y ligando, respectivamente y K_d es la constante de disociación. El análisis de los datos se realizó con el programa Origin 8.0.

A-4. Evaluación de la interacción de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (100) con la calmodulina (CaM)

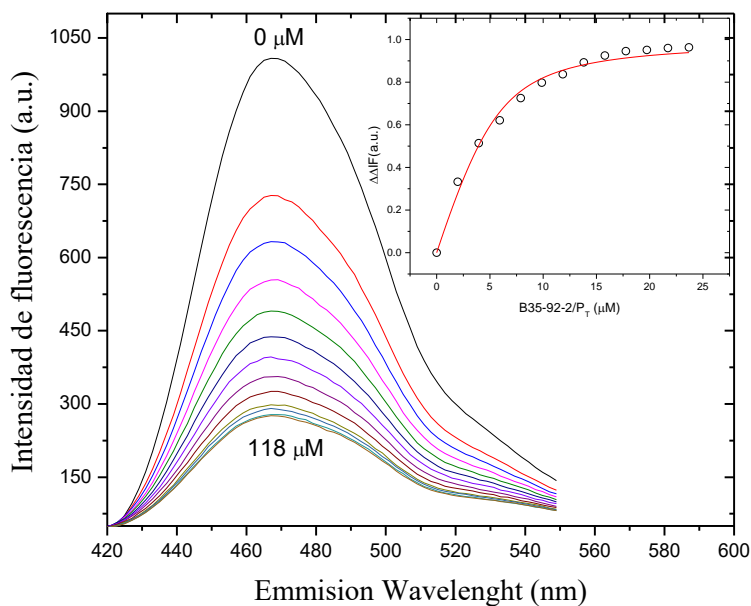
La CaM es una de las proteínas más importantes de unión a calcio (Ca^{2+}) en organismos eucariontes ya que está involucrada en la modulación de numerosos procesos fisiológicos como la movilidad celular, la función del citoesqueleto, la proliferación celular, la expresión de genes, entre otros. Asimismo, está relacionada con procesos fisiopatológicos como el cáncer y el mal funcionamiento del músculo liso (Berchtold y Villalobo, 2014). En consecuencia, esta proteína representa un blanco importante para el desarrollo de fármacos y/o herramientas de investigación, y aquellas moléculas que interfieren con su actividad moduladora son consideradas antagonistas de CaM.

La evaluación de la antraquinona novedosa (**100**) aislada a partir de *P. spathulatum* B35, se llevó a cabo tomando en consideración reportes previos acerca de la actividad anti-CaM de las antraquinonas como la emodina y la ω -hidroxiemodina (González-Andrade et al., 2013).

Para este estudio se utilizó una técnica de apagamiento de la fluorescencia extrínseca del biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr*. Este biosensor es capaz de transducir

señales fluorescentes detectables cuando un ligando se une a la CaM y es altamente específico y sensible (González-Andrade et al., 2009). La interacción de un ligando con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* provoca un cambio conformacional en la proteína que modifica el microambiente del fluoróforo monobromobimano (*mBBr*) y con ello, la intensidad de fluorescencia que es detectada en un fluorómetro (Mata et al., 2015).

En el presente trabajo, el apagamiento de la fluorescencia del biosensor en presencia de la antraquinona **100** se registró luego de realizar una titulación con concentraciones conocidas del producto natural. El análisis de los resultados obtenidos mediante un ajuste no lineal, permitió obtener la constante de disociación k_d . En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos en la titulación de la CaM con el compuesto **100**. Como se puede observar, la antraquinona **100** provocó el apagamiento de la fluorescencia de forma dependiente de la concentración con una $k_d = 1.2 \mu\text{M}$, siendo igual de potente que la clorpromazina ($k_d = 1.3 \mu\text{M}$), utilizada como control positivo.



Espectro de fluorescencia y curva de titulación del biosensor *hCaM M124C-mBBr* con la antraquinona **100**.

A-5. Identificación molecular de los aislamientos fúngicos G1-a8, G1-b25, G1-b5 y G1-b15

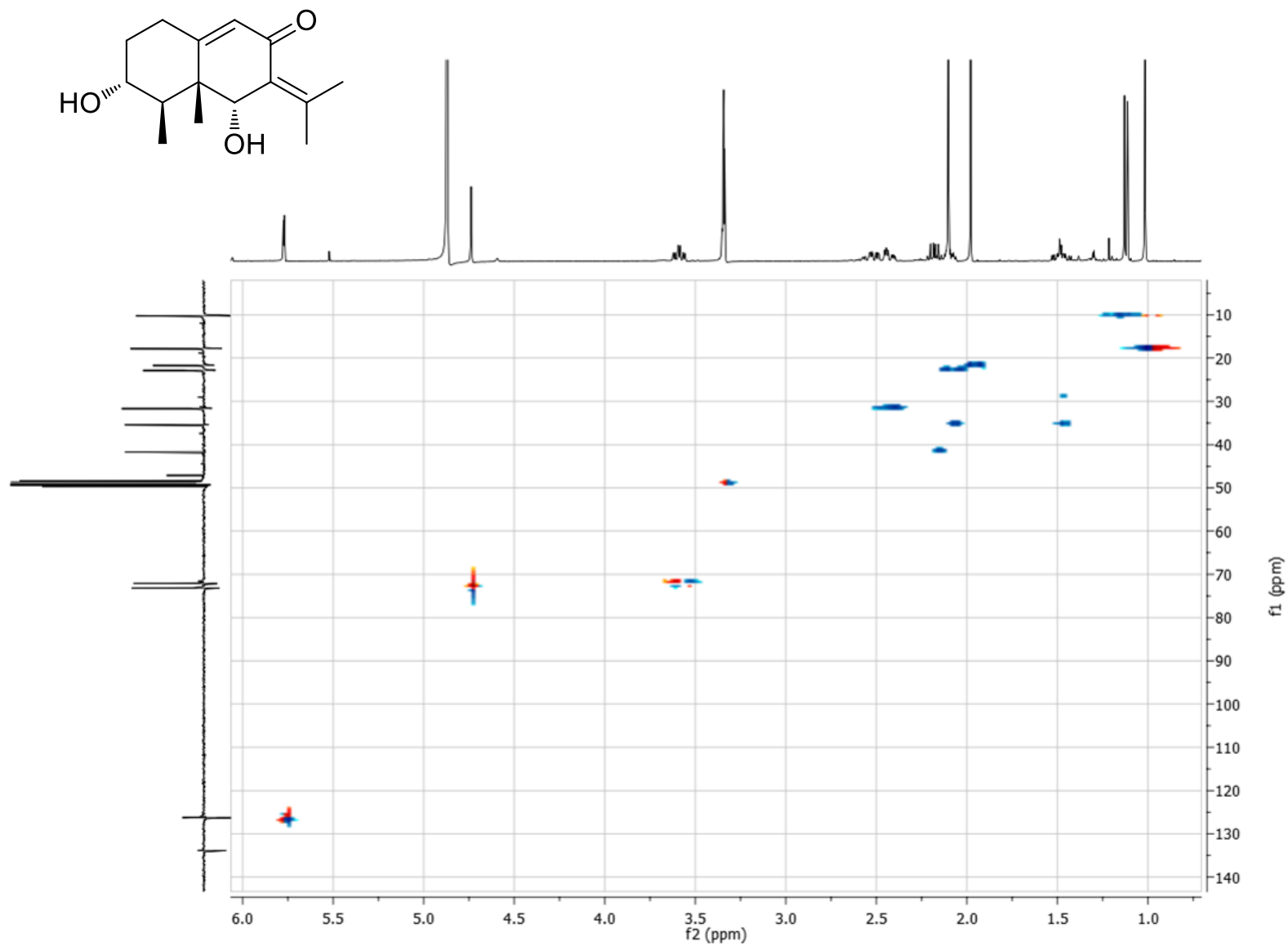
Aislamiento	% De similitud	Especies relacionadas	Código GenBank
G1-a8	100% (510 de 510 pb)	<i>P. brevicompactum</i>	JN246028
G1-b25	100% (514 de 514 pb)	<i>P. olsonii</i>	HQ380756
G1-b5	98% (386 de 393 pb)	<i>P. westlingii</i>	JN617665
	98% (386 de 393 pb)	<i>P. paxilli</i>	JN617683
	98% (386 de 393 pb)	<i>P. cosmopolitanum</i>	JN617691
	98% (386 de 393 pb)	<i>P. chrzaszczii</i>	GU944603
	98% (386 de 393 pb)	<i>P. decaturense</i>	GU944604
G1-b15	100% (380 de 380 pb)	<i>P. raistrickii</i>	JN617697
	99% (379 de 380 pb)	<i>P. kojigenum</i>	AM236583

A-6. Estudio químico de la especie G1-a8 (*Penicillium brevicompactum*)

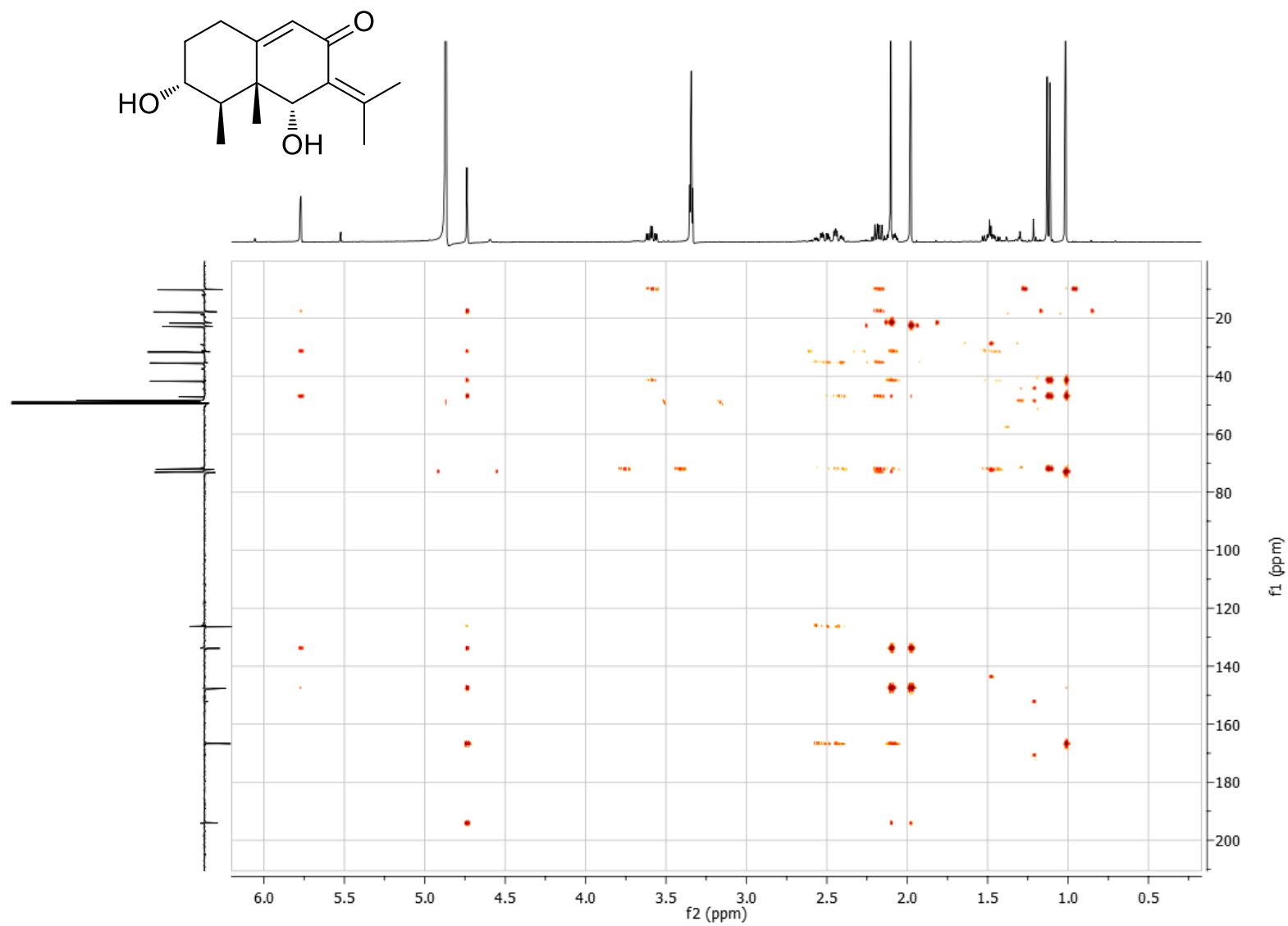
Una parte del extracto íntegro (3 g) obtenido en mediana escala (400 g medio de arroz), se sometió a un fraccionamiento primario por medio de cromatografía en columna abierta (CCA) sobre gel de sílice (400 mL), empleando un gradiente de polaridad hexano-CH₂Cl₂ (100:0 → 0:100) y CH₂Cl₂-CH₃OH (100:0 → 50:50). Se obtuvieron 35 fracciones primarias. A partir de la fracción 33 se aisló el compuesto mayoritario como un sólido cristalino que se identificó como ácido micofenólico (**31**) con base en sus espectros de RMN de ¹³C y ¹H.

Por otra parte, se realizó el fraccionamiento secundario de la fracción 32 (130 mg) por CCA sobre gel de sílice (50 mL) empleando un gradiente de polaridad de hexano→AcOEt→CH₃OH. La resolución de la fracción F32-43 (34 mg) por CLAE en modo preparativo (columna Symmetry C18 7.8 x 300 mm, 7 μm; fase móvil de CH₃CN- CH₃OH 1:1 isocrático a un flujo de 2 mL/min), permitió el aislamiento de la brevianamida A (**38**) que se caracterizó con base en los espectros de RMN de ¹³C y ¹H.

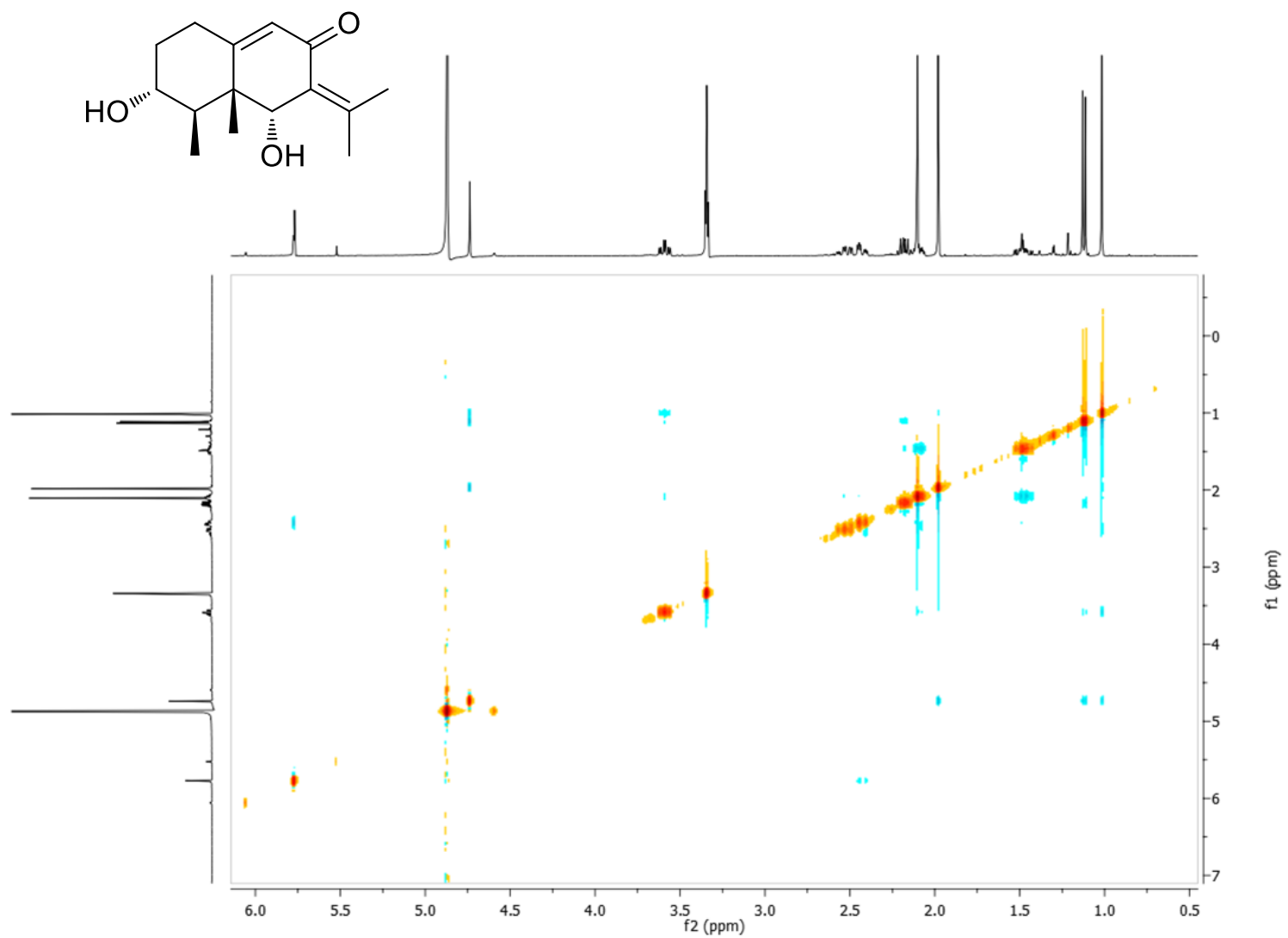
Estos resultados son consistentes con la quimiotaxonomía de *P. brevicompactum*.



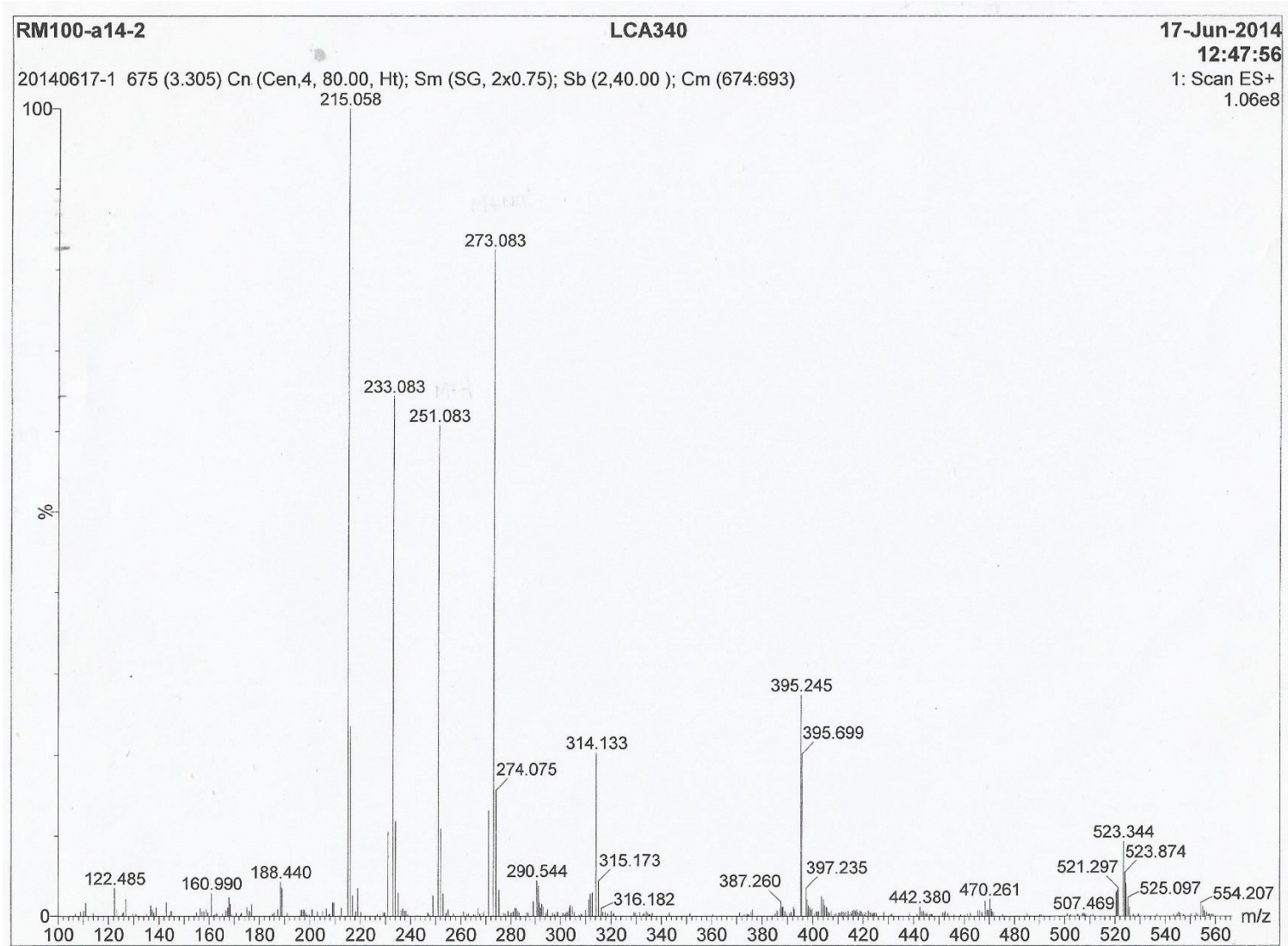
A-9. Espectro HSQC del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.



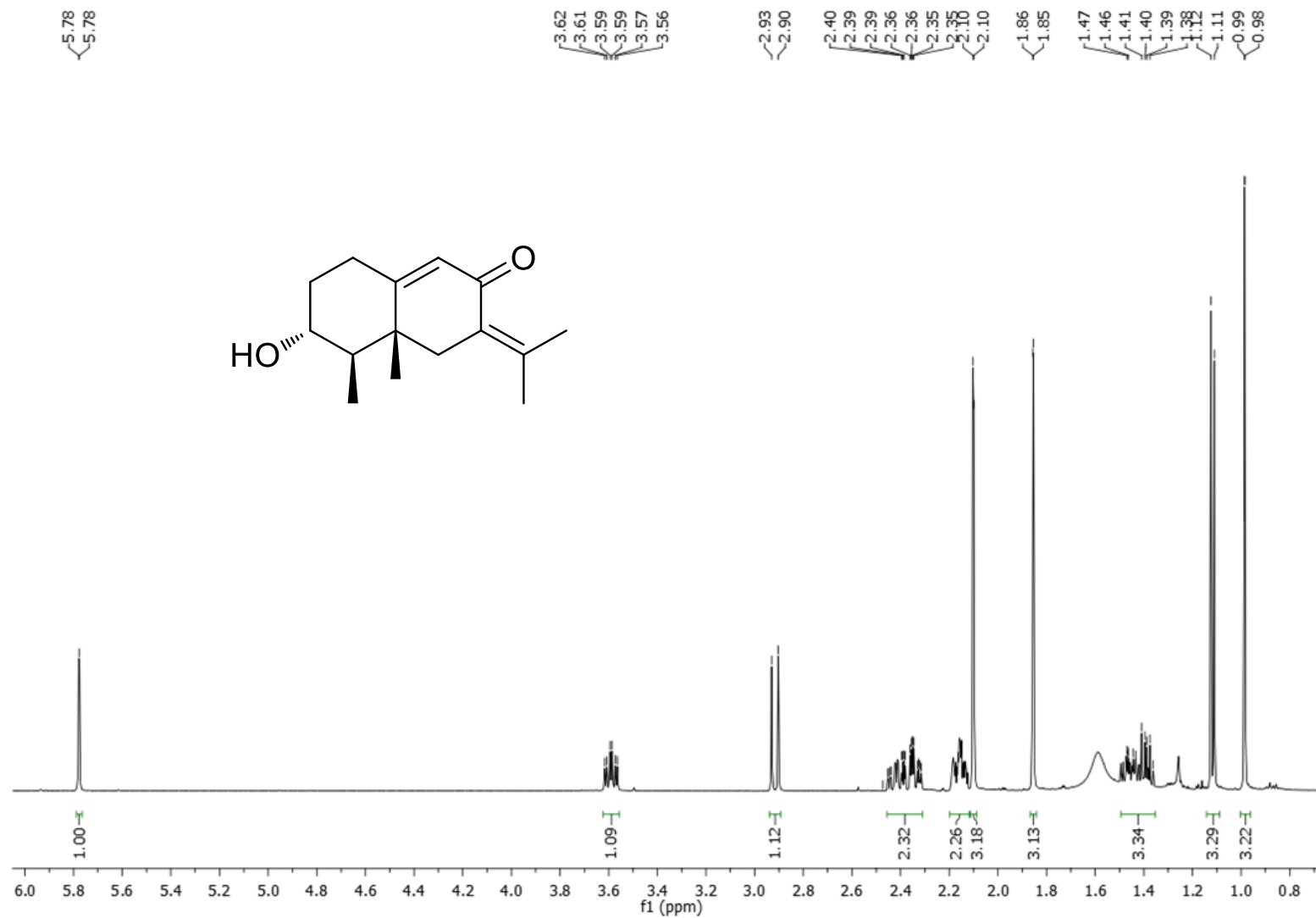
A-10. Espectro HMBC del 3R,6R-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.



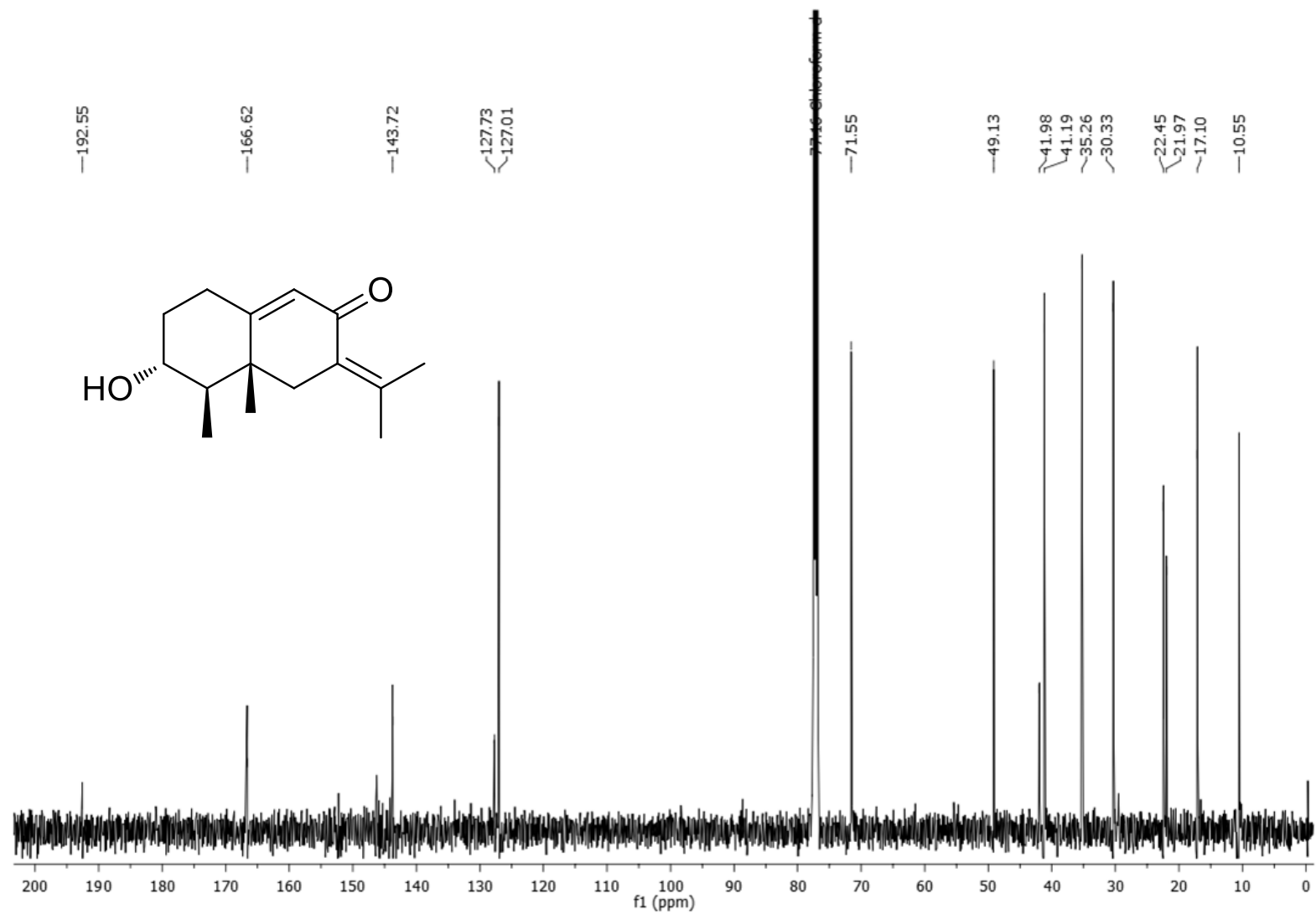
A-11. Espectro NOESY del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**) en CD₃OD.



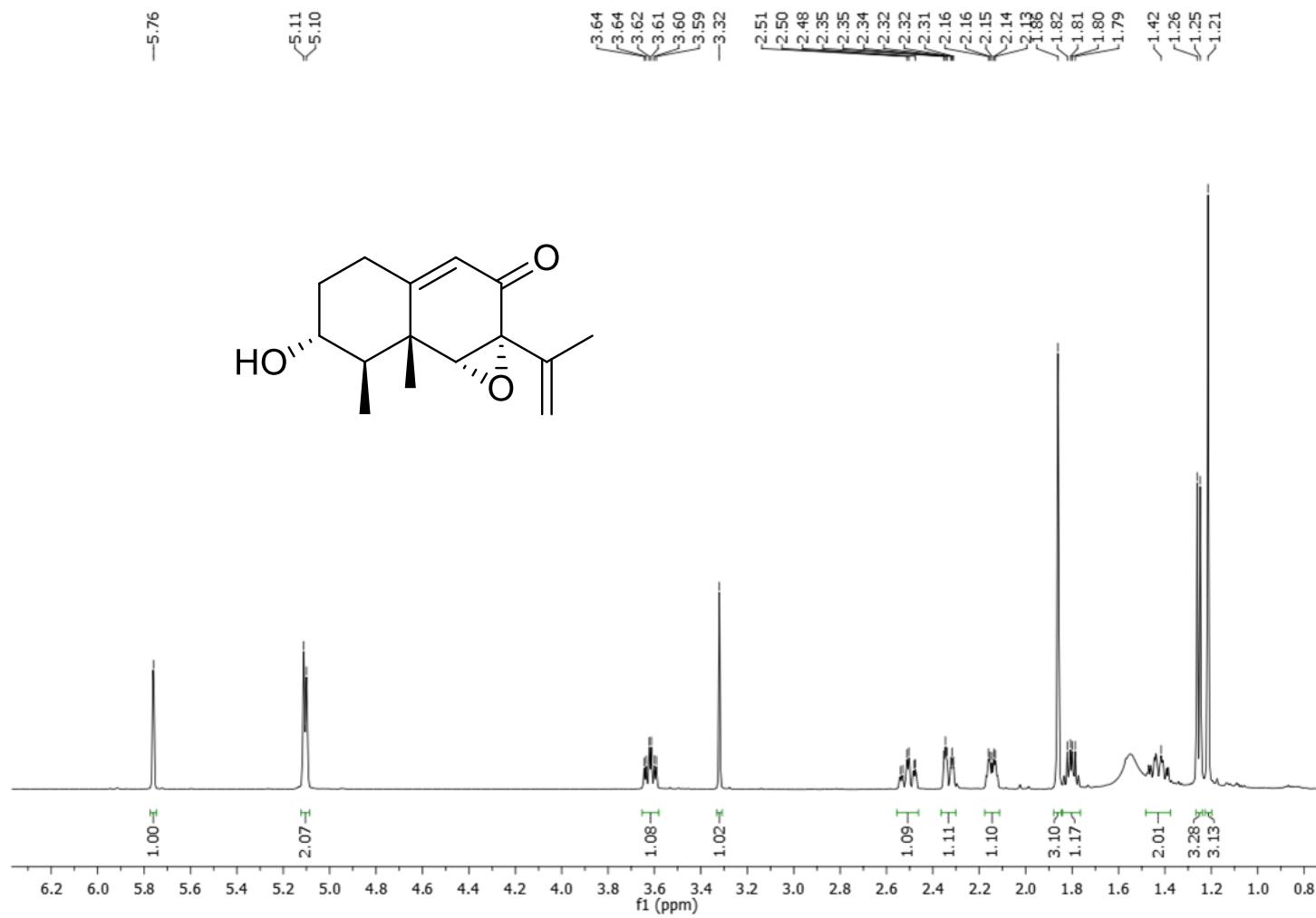
A-12. Espectro de masas (HRESIMS) del 3*R*,6*R*-dihidroxi-9,7(11)-dien-8-oxoeremofilano (**89**).



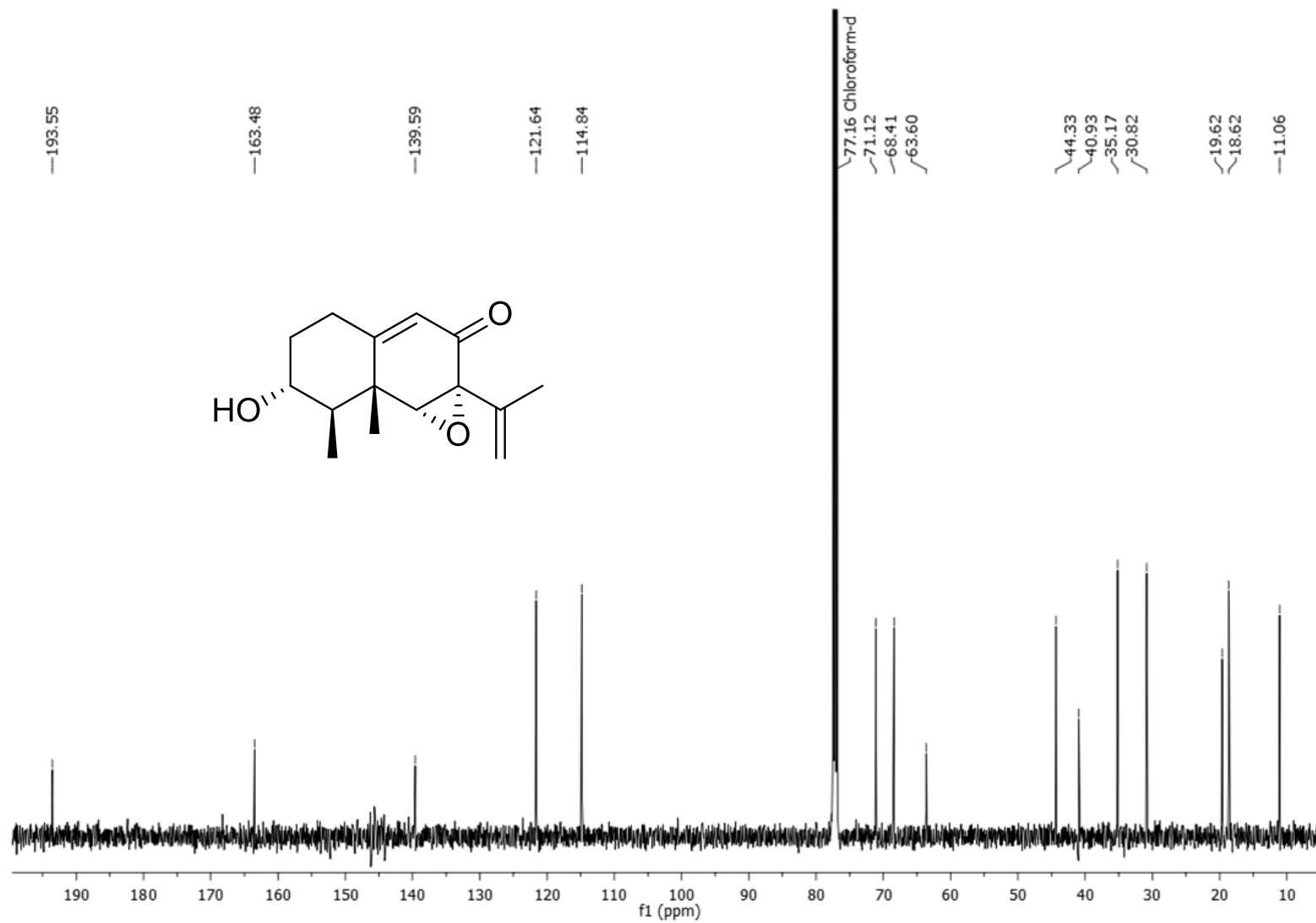
A-13. Espectro de ¹H-RMN del isopetasol (**90**) (CDCl₃, 500 MHz).



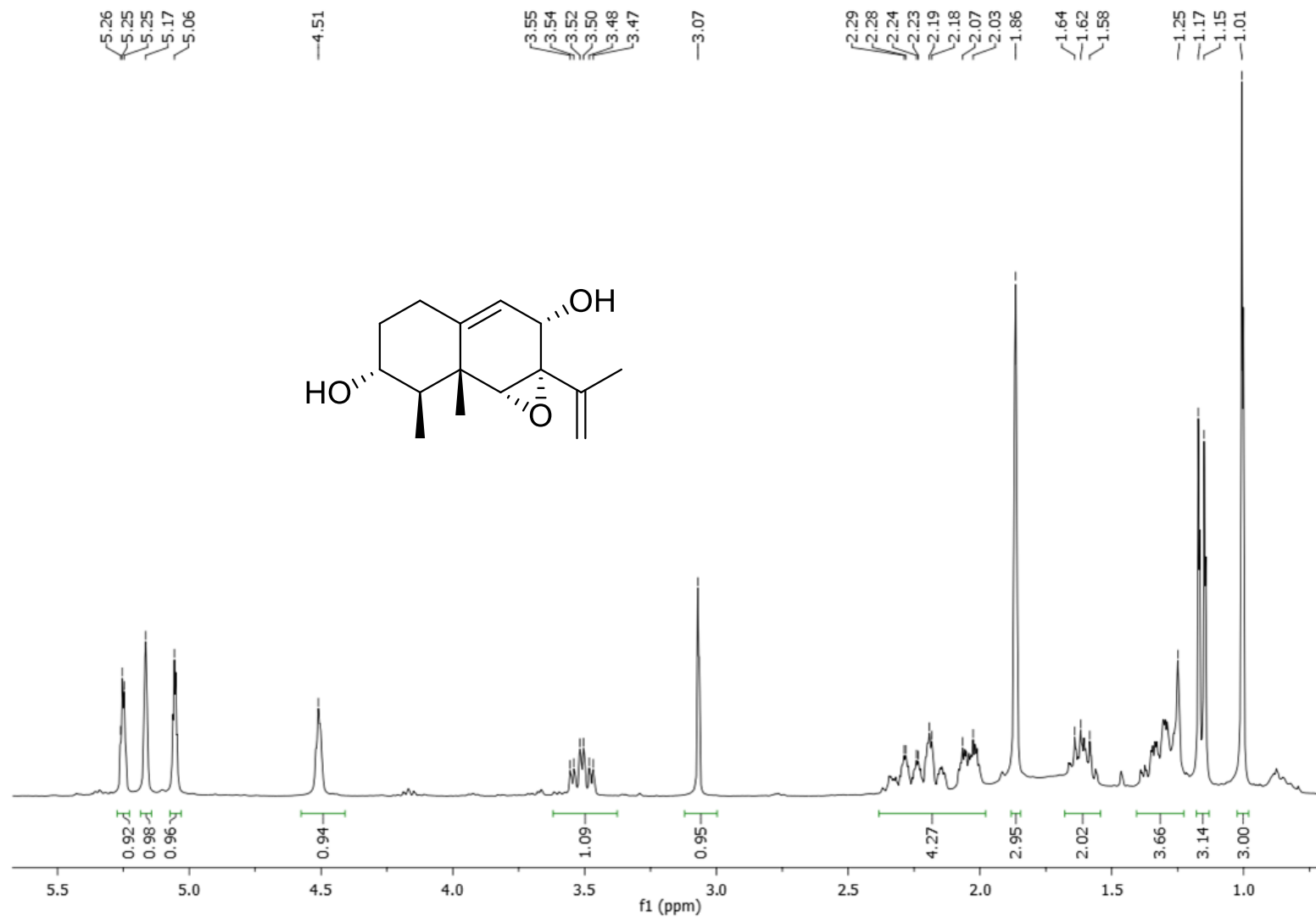
A-14. Espectro de ^{13}C -RMN del isopetasol (**90**) (CDCl_3 , 125 MHz).



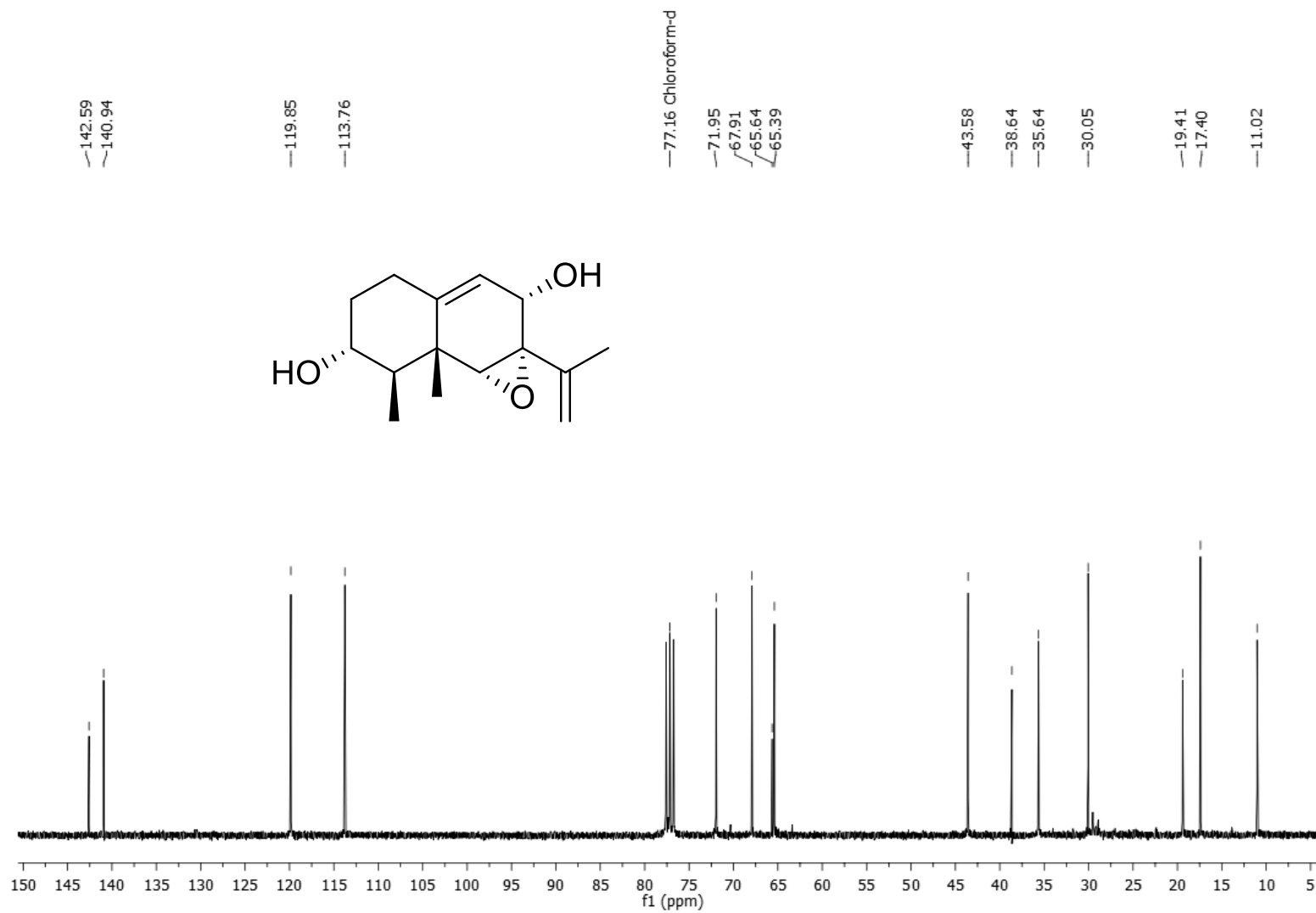
A-15. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del sporogen AO-1 (**91**) (CDCl₃, 500 MHz).



A-16. Espectro de ^{13}C -RMN del sporogen AO-1 (**91**) (CDCl_3 , 125 MHz).



A-17. Espectro de ¹H-RMN del dihidrosporogen AO-1 (92) (CDCl₃, 300 MHz).



A-18. Espectro de ¹³C-RMN del dihidrosporogen AO-1 (92) (CDCl₃, 75 MHz).

A-19. Energías libres calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP, población conformacional, y valores teóricos de fuerzas de rotación ($R_{(len)}$) para los confórmeros del enantiómero 3R4R5R6R de **89**.

Confórmero	ΔG^a	$P(\%)^b$	n estados ^c														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.285	0.71	-3.69	-15.43	21.79	0.93	1.68	1.69	-1.11	-3.91	-19.05	-0.56	22.37	8.43	10.67	1.37
2	0.149	0.222	0.60	-2.51	-10.60	12.30	3.20	1.09	-0.56	0.65	-13.92	1.90	-4.38	9.34	7.34	9.41	7.04
3	0.321	0.166	0.25	-4.24	10.21	-4.09	-0.86	0.15	0.36	-2.94	2.99	-3.22	9.83	-0.73	5.00	1.84	0.02
4	0.348	0.159	0.26	-3.71	8.65	-3.45	-0.86	0.32	0.32	1.44	-3.26	-4.21	8.37	3.89	6.64	-2.31	0.69
5	0.574	0.108	0.21	-2.22	6.55	-3.87	-0.11	0.20	-0.84	0.07	-4.50	4.97	-2.21	8.53	4.12	-0.40	-1.34
6	1.233	0.036	0.02	-0.34	-1.71	1.89	0.06	0.19	-0.26	-0.03	-1.28	-1.14	2.83	0.16	3.20	-0.56	0.34
7	1.475	0.024	0.02	-0.19	-1.51	1.50	0.08	0.12	-0.29	0.00	-1.74	0.73	0.55	1.91	0.61	0.67	-0.10
Valor ponderado ^d			2.08	-16.89	-3.83	26.06	2.44	3.76	0.42	-1.92	-25.63	-20.01	14.43	45.47	35.33	19.31	8.02
λ (nm) ^e			444.3	310.9	288.3	276.9	264.9	240.6	234.8	220.0	210.7	207.0	202.2	199.9	196.1	194.4	192.6

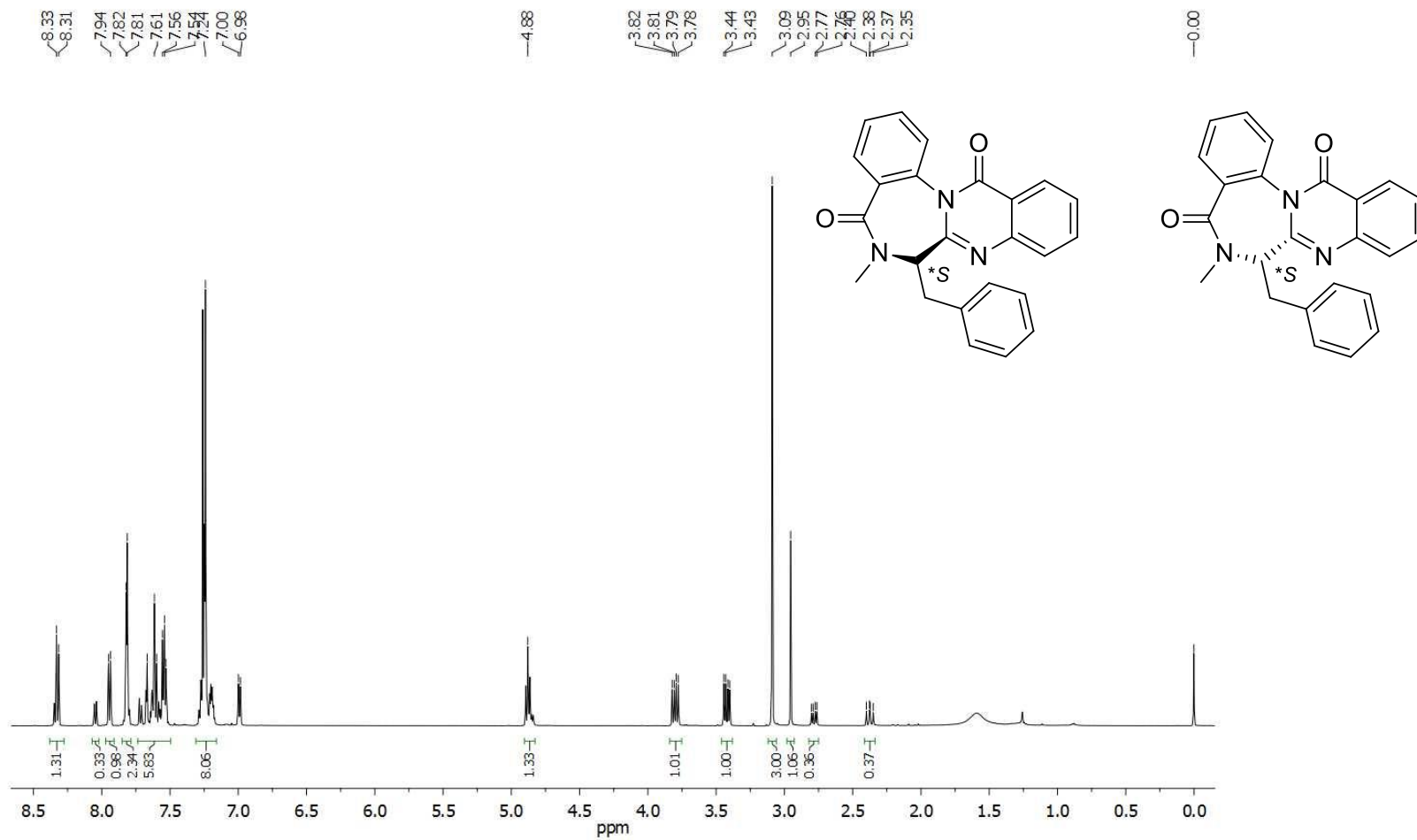
^a Energías libres de Gibbs calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP en kcal mol⁻¹ relativas al valor absoluto de G para el mínimo global. ^b Valor en porcentaje de ΔG a 298 K y 1 atm. ^c Fuerzas de rotación calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP. ^d Valores calculados a partir de la ecuación 7. ^e Valor promedio de longitud de onda.

A-20. Energías libres calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP, población conformacional, y valores teóricos de fuerzas de rotación ($R_{(len)}$) para los conformeros del enantiómero 3S4S5S6S de **89**.

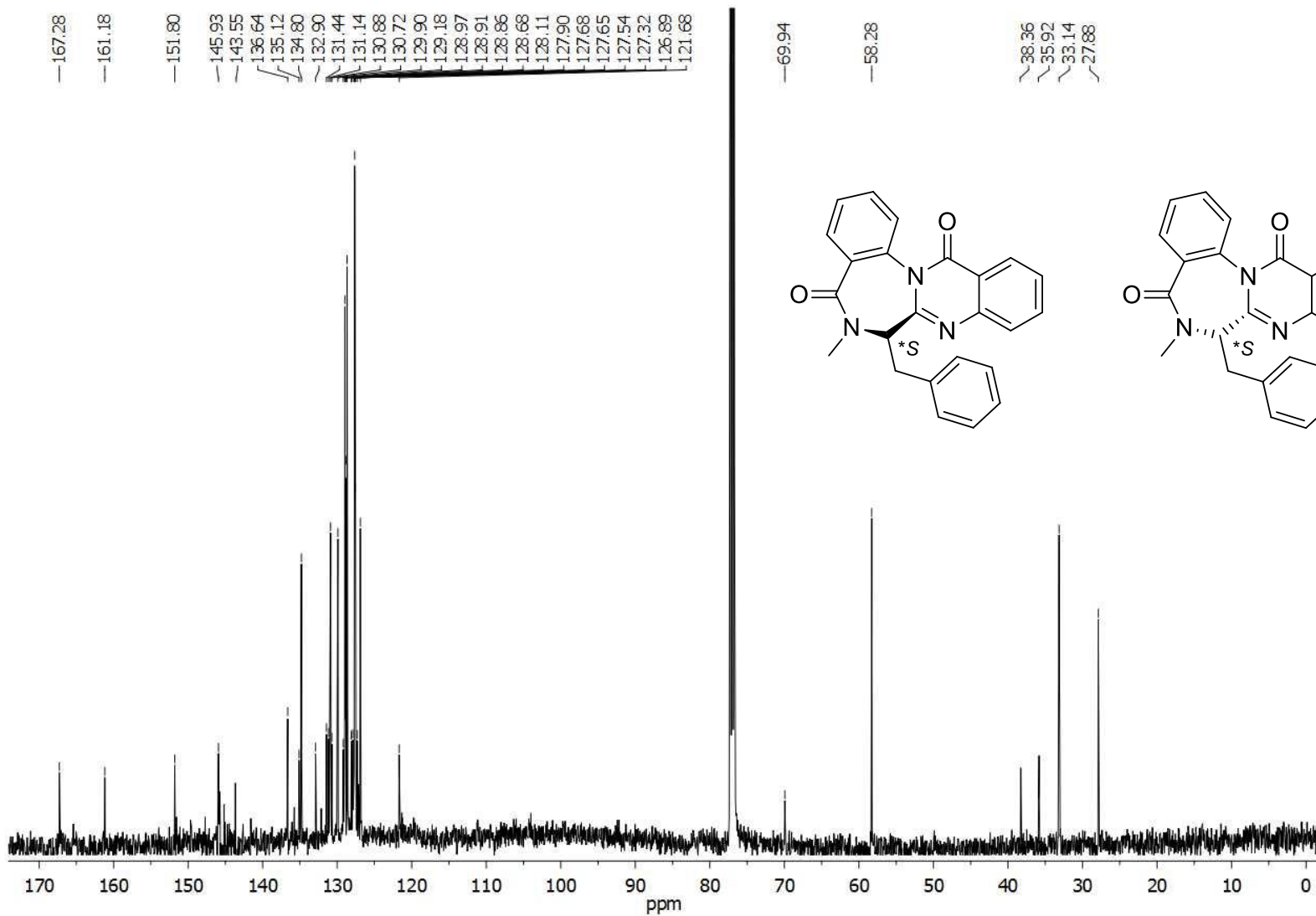
Conformer	ΔG^a	$P(\%)^b$	$n \text{ states}^c$														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.000	0.359	-5.05	10.63	26.77	-0.85	-20.39	-1.46	-4.02	2.13	0.02	29.54	-12.94	4.01	-18.88	3.56	-14.97
2	0.183	0.264	-3.67	6.99	17.66	-7.28	-3.20	-1.24	-3.46	-1.15	18.68	1.17	-1.75	-2.60	5.93	-27.45	3.59
3	0.528	0.147	-2.17	6.30	-0.81	1.49	1.75	1.22	-3.35	2.81	-0.47	4.13	-4.90	-0.83	-5.65	0.58	-0.02
4	0.813	0.091	-1.33	3.30	-0.10	0.27	2.27	0.05	-1.12	0.12	3.72	-2.74	2.04	-3.24	-3.10	1.24	-0.99
5	0.927	0.075	-1.09	3.24	-0.35	0.70	0.07	0.32	0.29	0.33	3.46	-2.99	-1.65	0.73	-2.78	-0.65	-0.46
6	1.514	0.028	-0.40	1.15	1.84	-1.38	-0.04	-0.12	0.33	0.26	-0.16	1.88	-1.17	-0.23	-1.89	-0.06	-0.56
7	1.689	0.021	-0.29	0.87	1.43	-1.12	-0.07	-0.07	0.27	0.07	1.16	0.27	-0.71	-0.33	-2.44	0.51	0.25
8	1.834	0.016	-0.23	0.63	1.13	-0.74	0.02	-0.07	0.12	-0.06	1.03	-0.59	0.28	-0.58	-0.63	-0.17	-0.34
Weighted value ^d			-14.23	33.13	47.57	-8.93	-19.60	-1.37	-10.93	4.52	27.45	30.68	-20.80	-3.07	-29.44	-22.44	-13.49
Averaged λ (nm) ^e			445.66	311.81	289.72	272.64	264.03	241.11	233.79	218.78	210.33	206.26	202.77	199.90	195.10	193.51	190.87

^a Energías libres de Gibbs calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP en kcal mol⁻¹ relativas al valor absoluto de G para el mínimo global. ^b Valor en porcentaje de ΔG a 298 K y 1 atm. ^c Fuerzas de rotación calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP. ^d Valores calculados a partir de la ecuación 7.

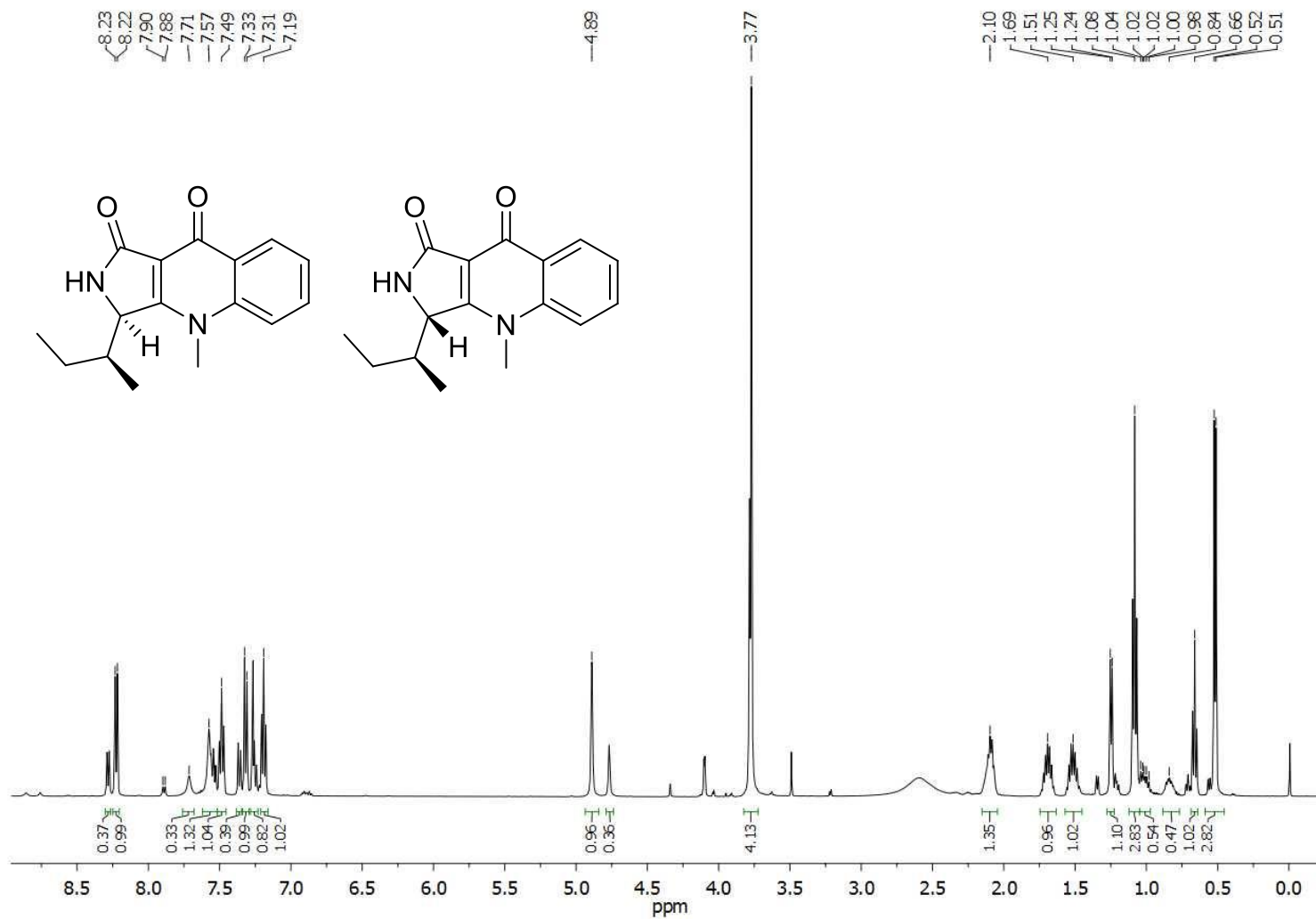
^e Valor promedio de longitud de onda.



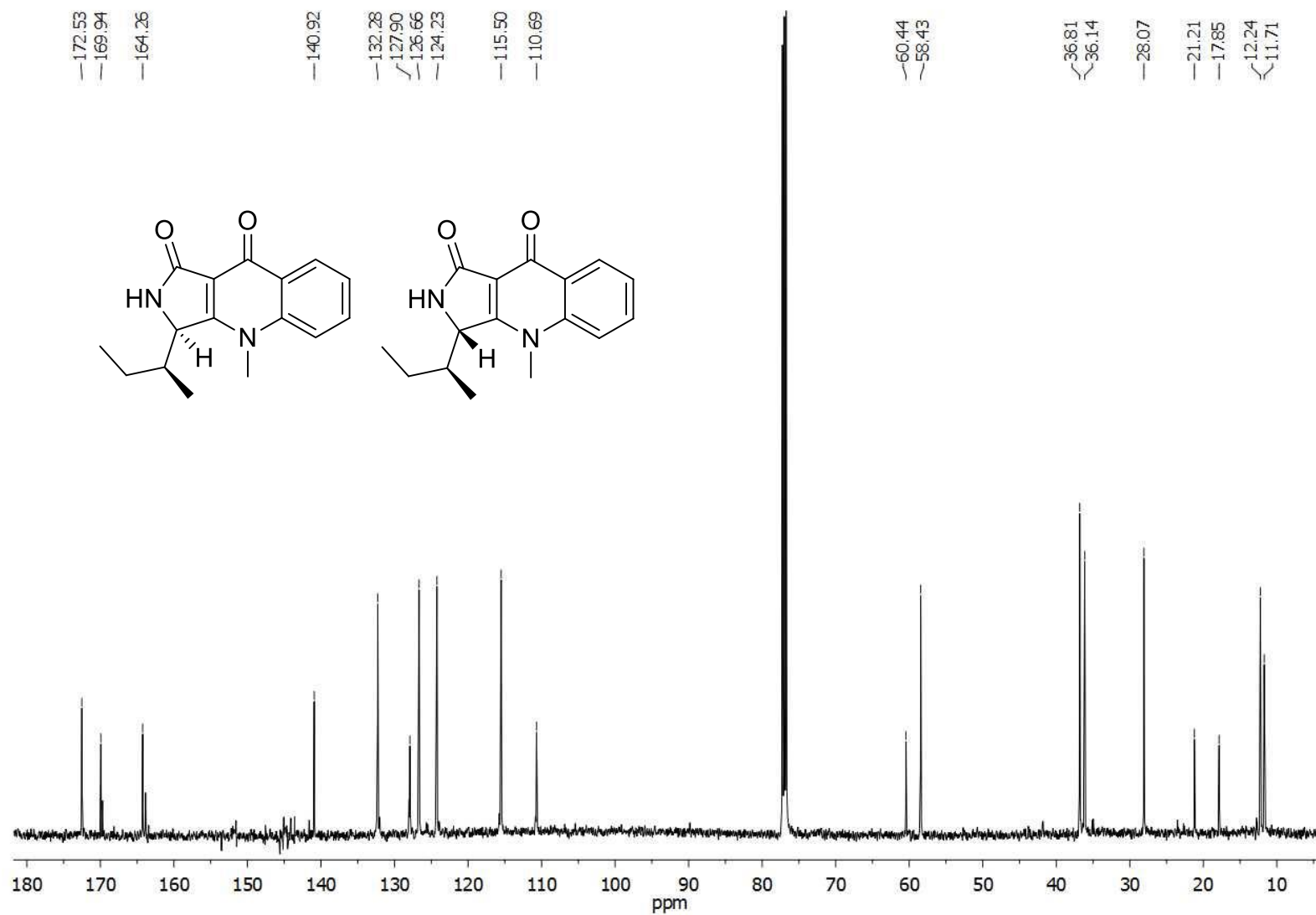
A-21. Espectro de ^1H -RMN de la benzomalvina A (**94**) (CDCl_3 , 500 MHz).



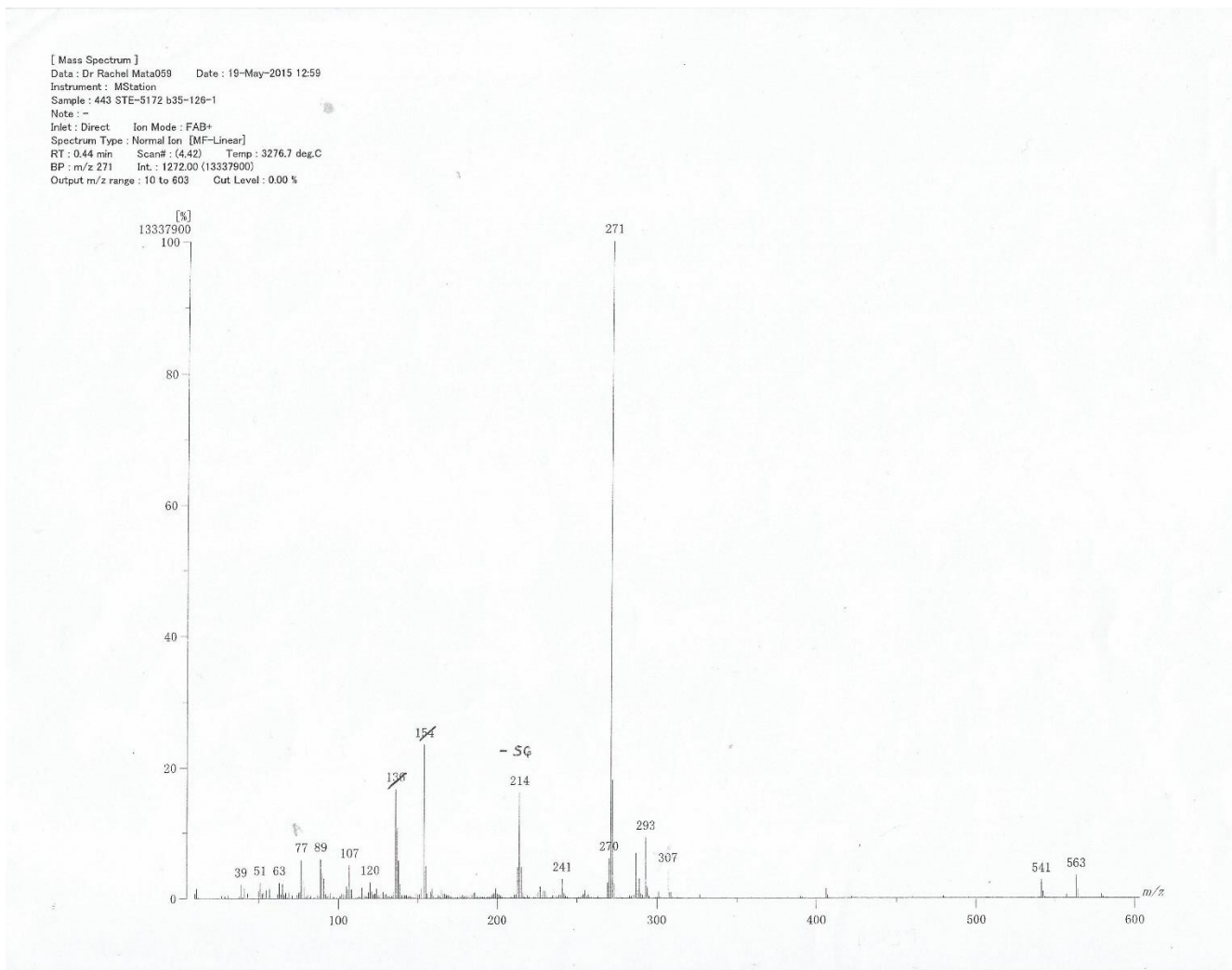
A-22. Espectro de ^{13}C -RMN de la benzomalvina A (**94**) (CDCl_3 , 125 MHz).



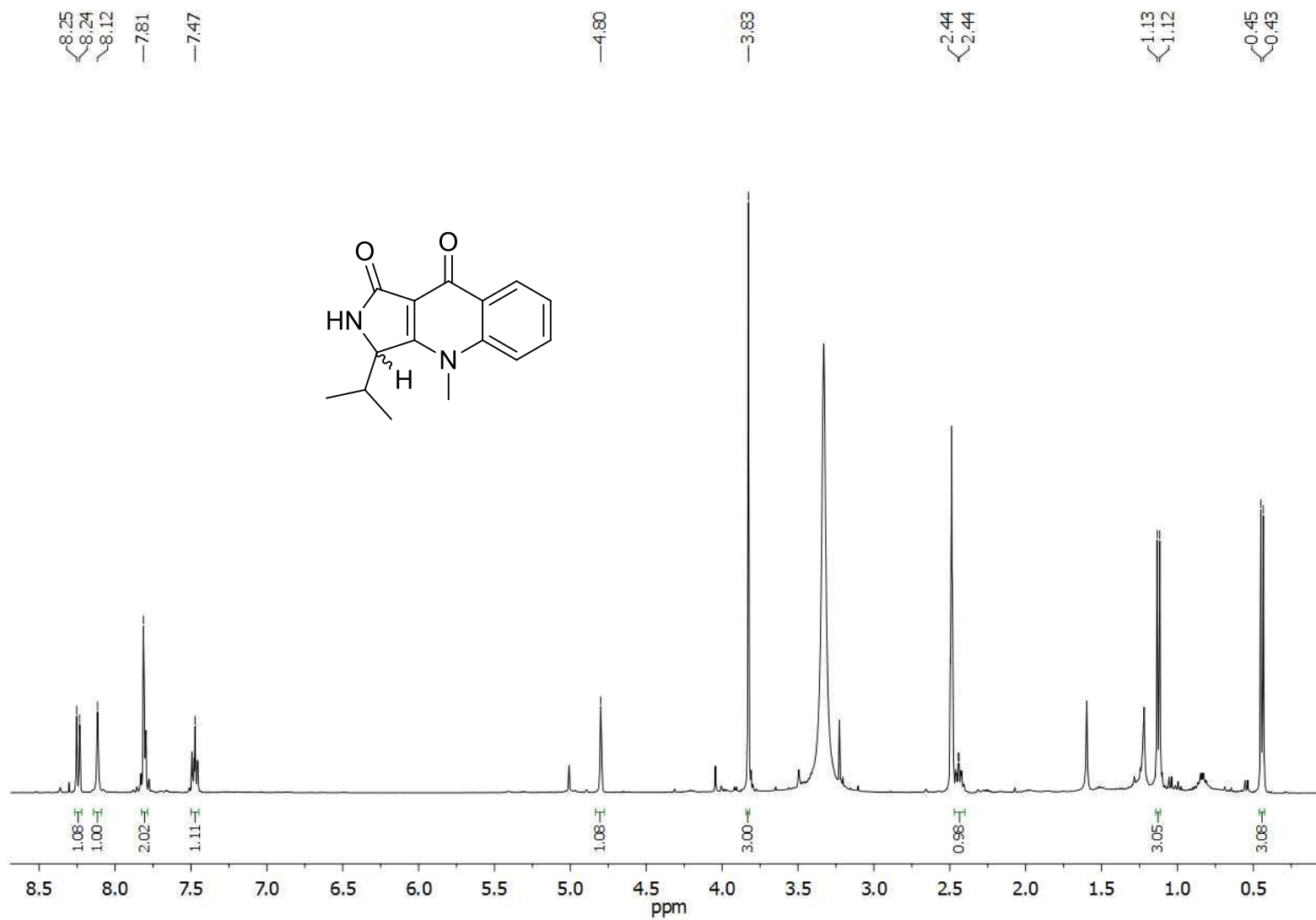
A-23. Espectro de ¹H-RMN de la mezcla de quinolactacina A1 (**95**) y A2 (**96**) (CDCl₃, 500 MHz)



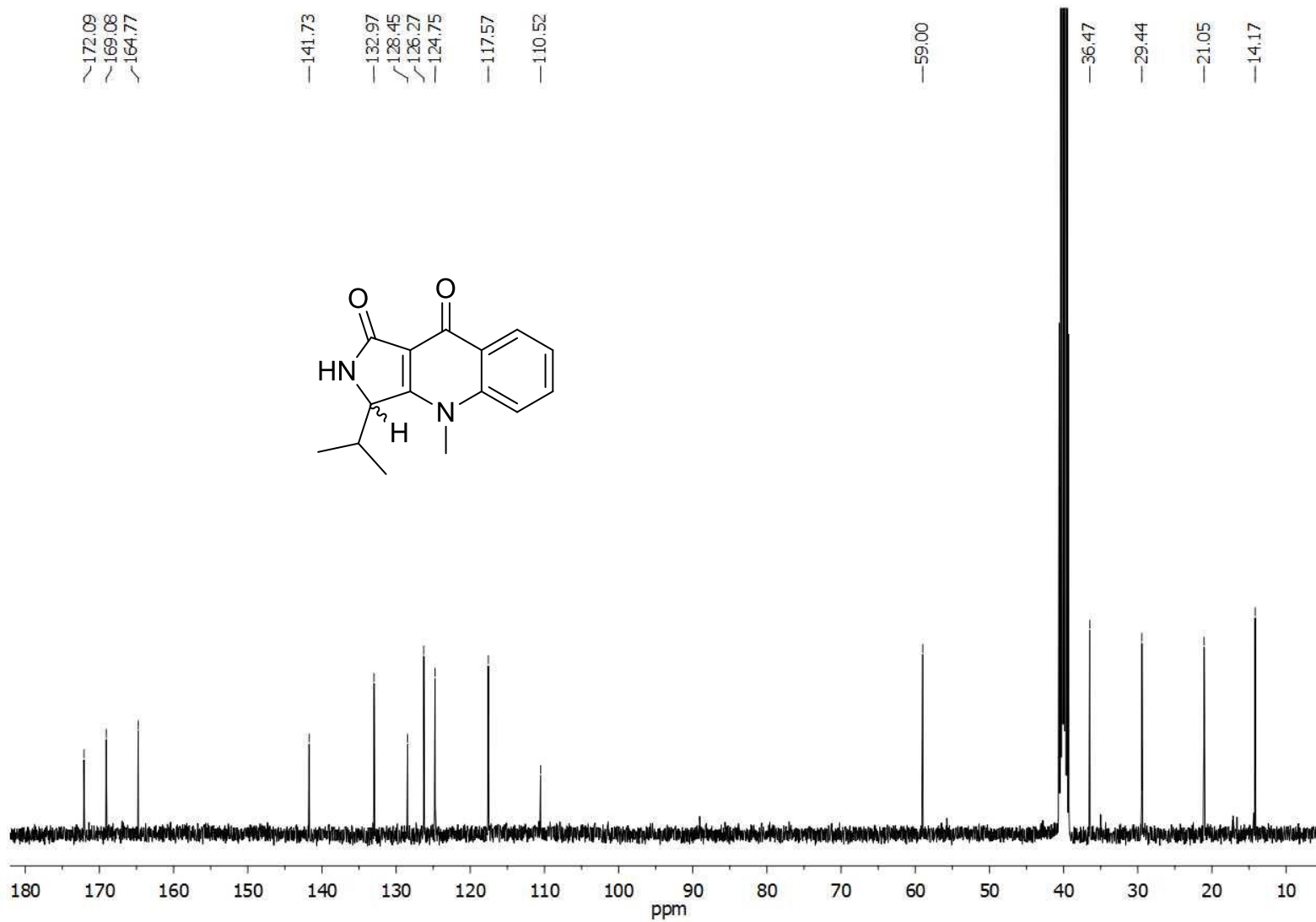
A-24. Espectro de ^{13}C -RMN de la mezcla de quinolactacina A1 (**95**) y A2 (**96**) (CDCl_3 , 125 MHz).



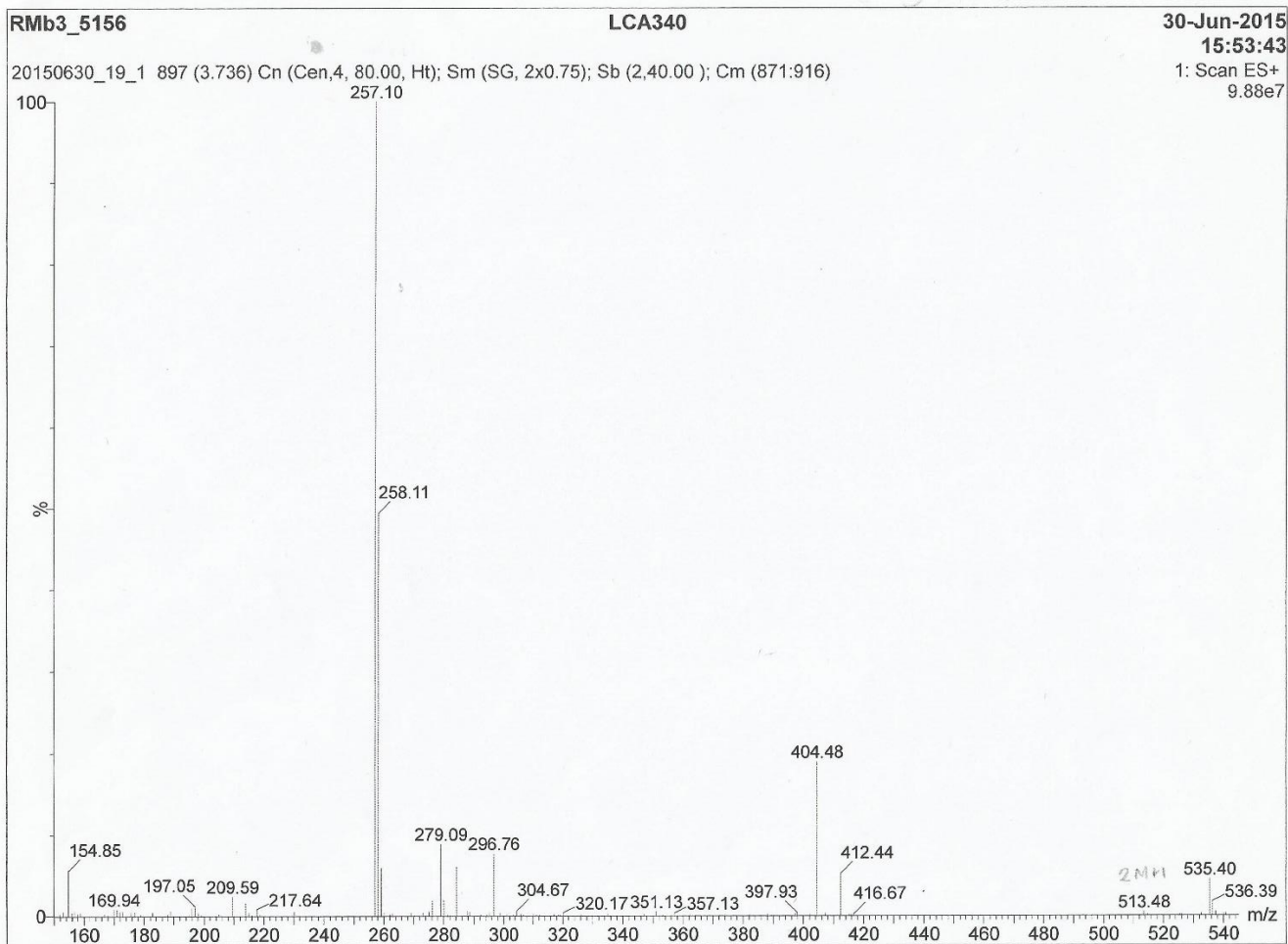
A-25. Espectro de masas (FAB+) de la mezcla de quinolactacina A1 (95) y A2 (96).



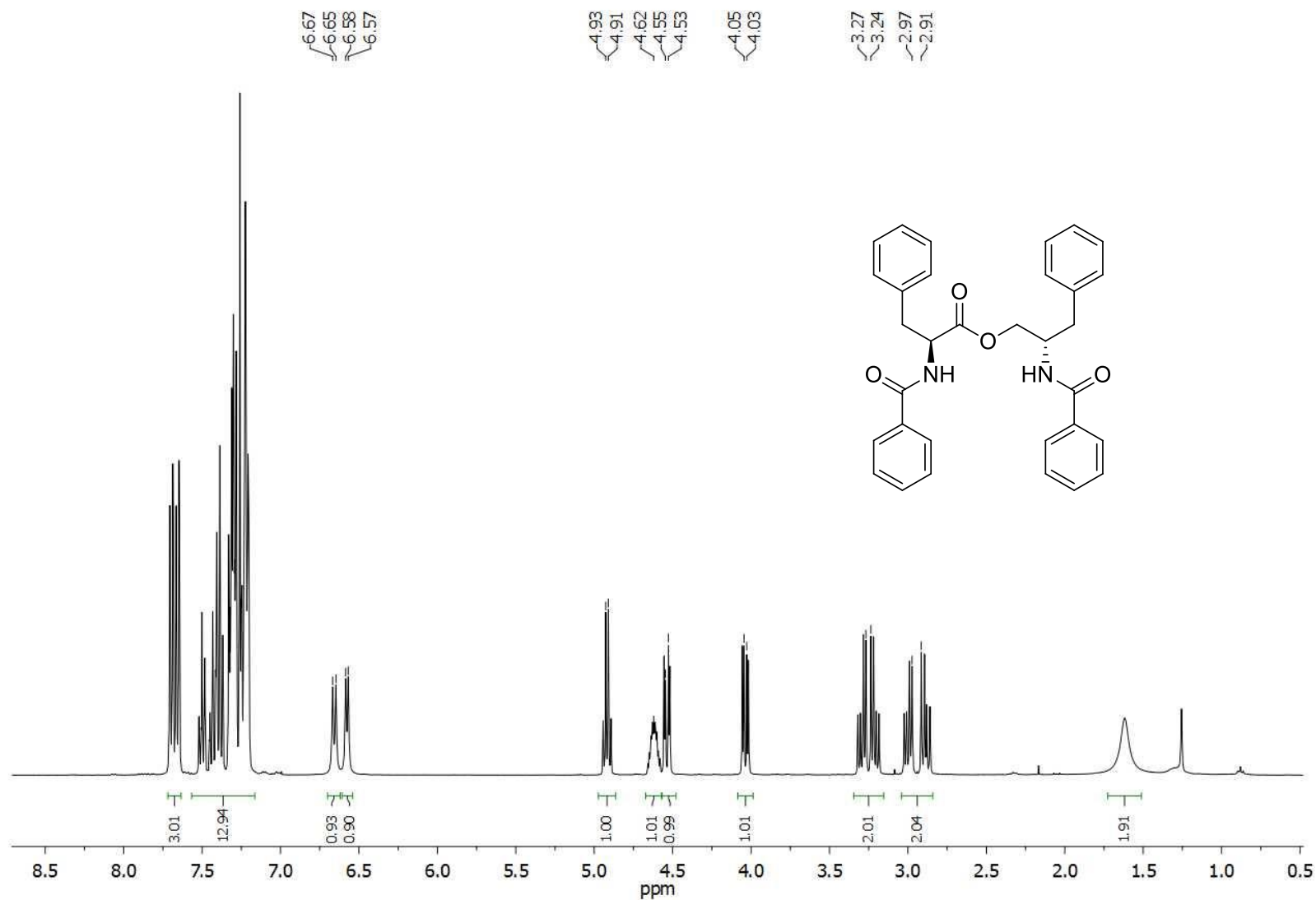
A-26. Espectro de ^1H -RMN de la quinolactacina B (97) ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).



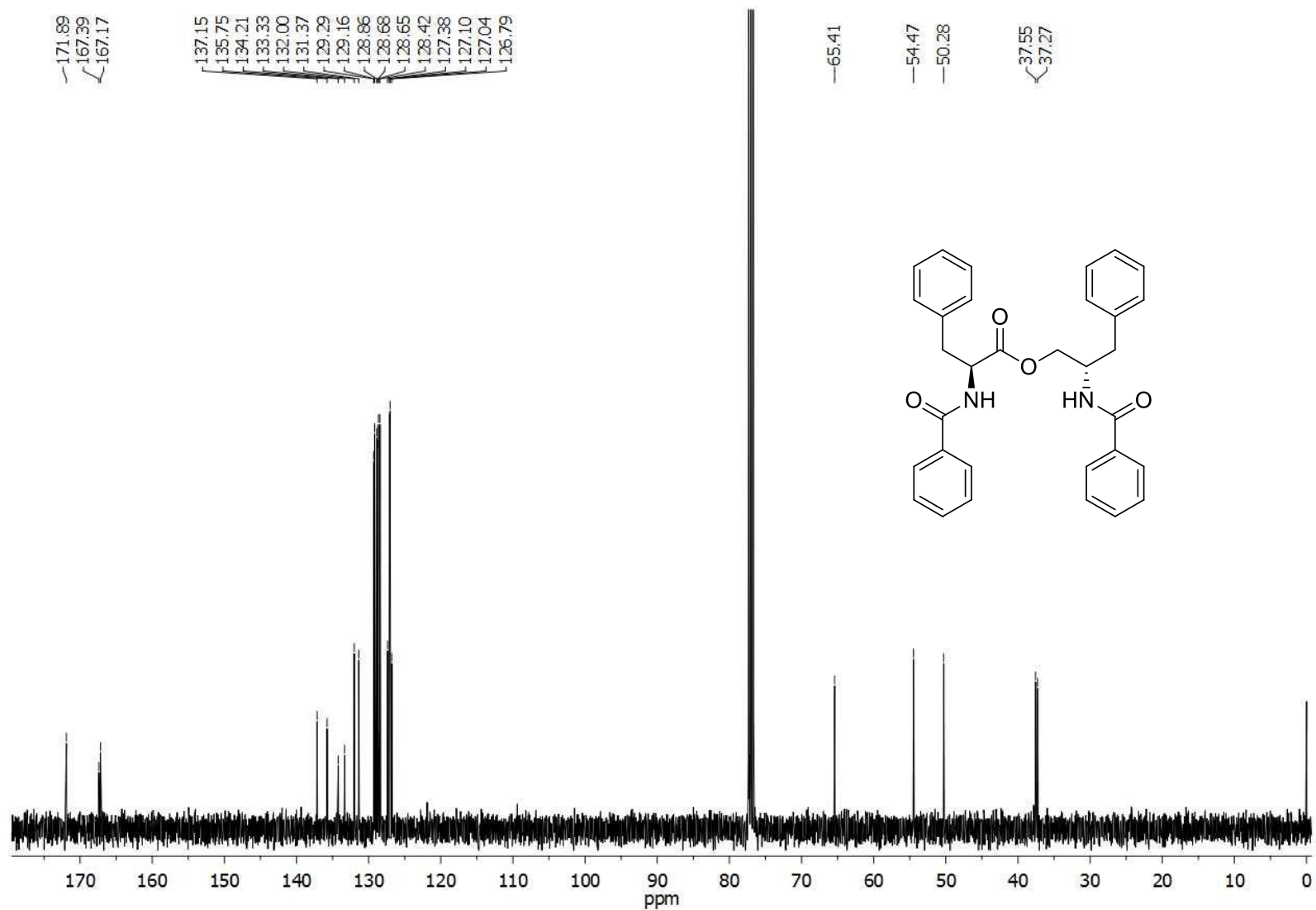
A-27. Espectro de ^{13}C -RMN de la quinolactacina B (97) ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz).



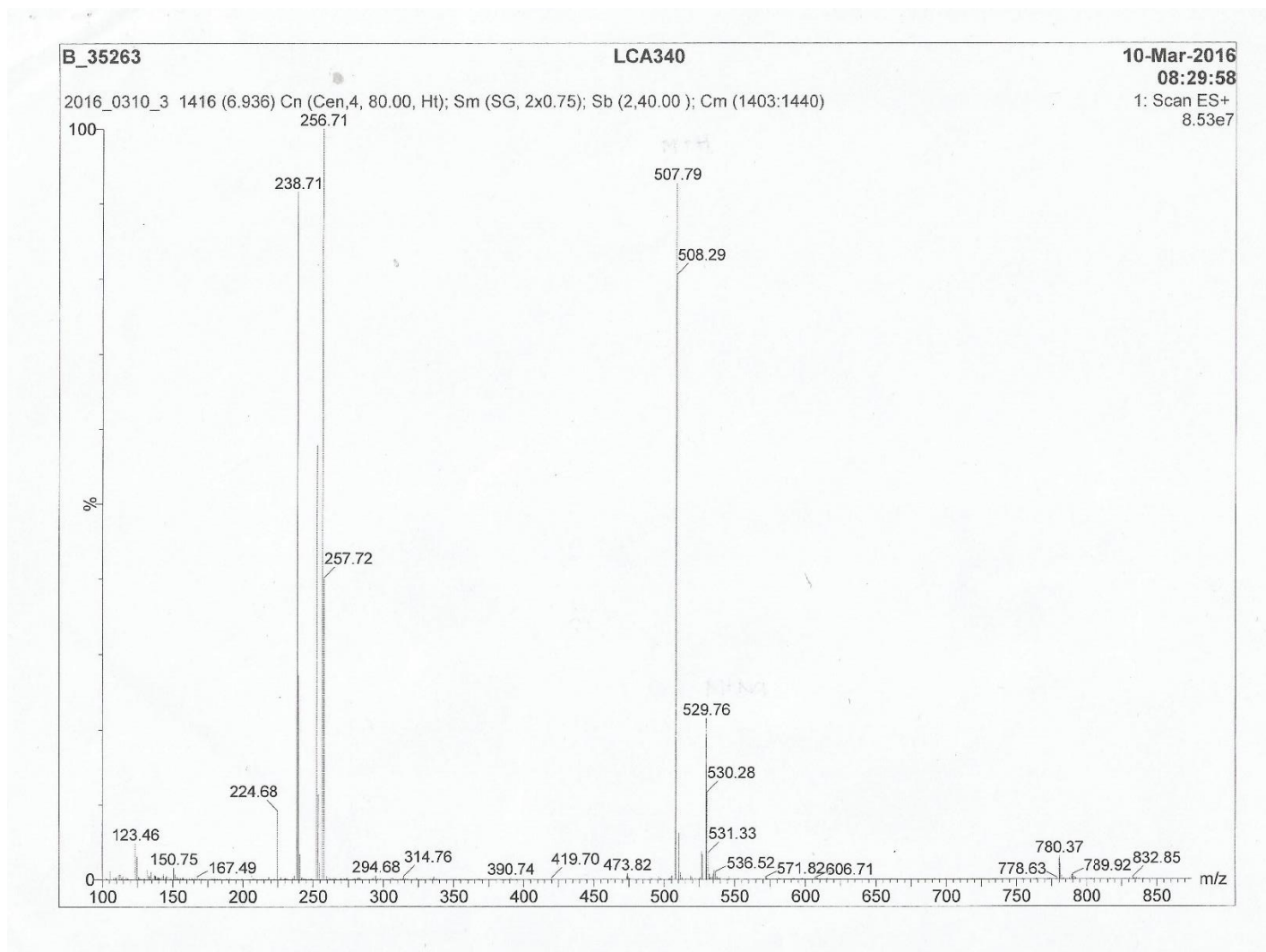
A-28. Espectro de masas (ESIMS) de la quinolactacina B (**97**).



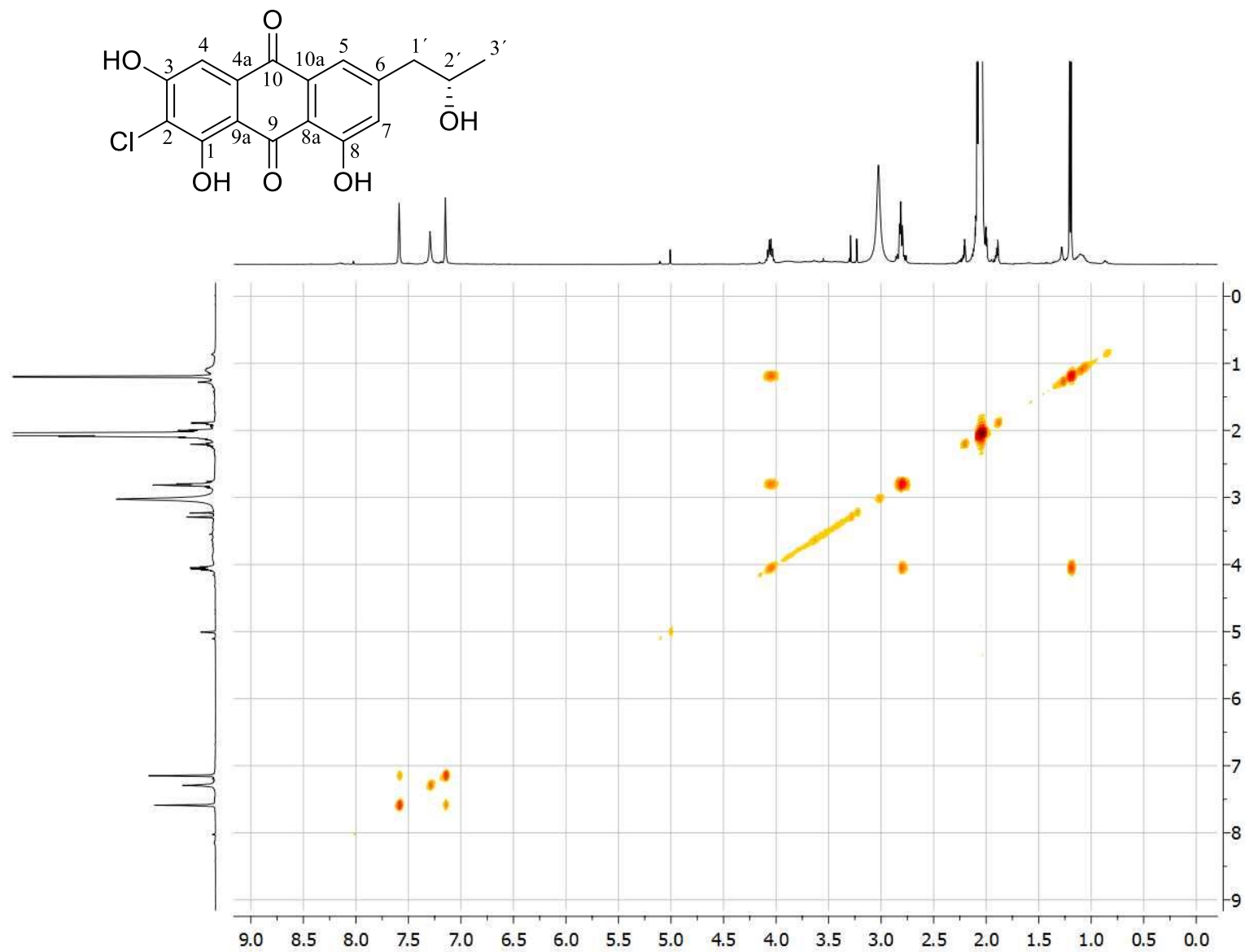
A-29. Espectro de ¹H-RMN del asperfenamato (**99**) (CDCl₃, 400 MHz)



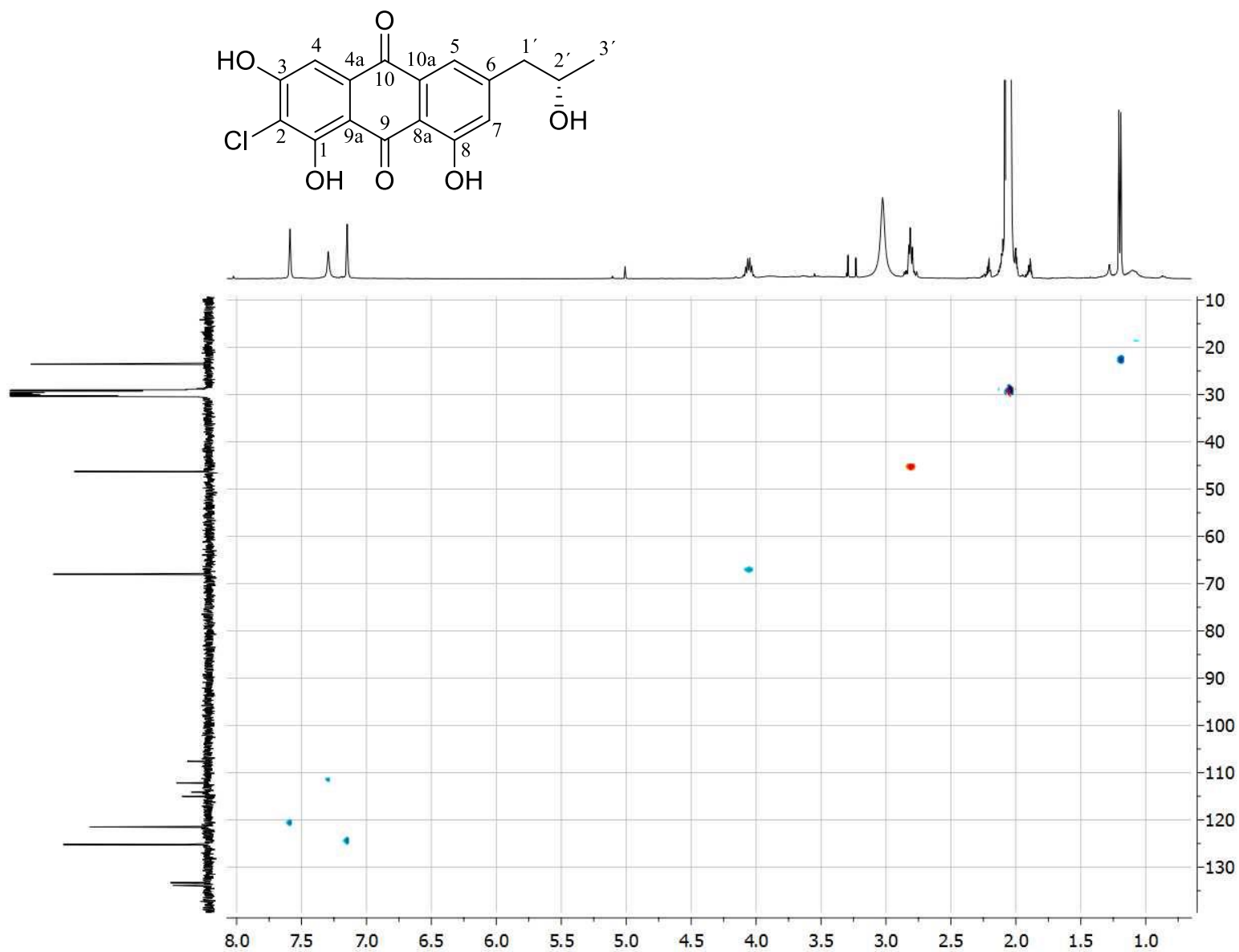
A-30. Espectro de ^{13}C -RMN del asperfenamato (**99**) (CDCl_3 , 100 MHz).



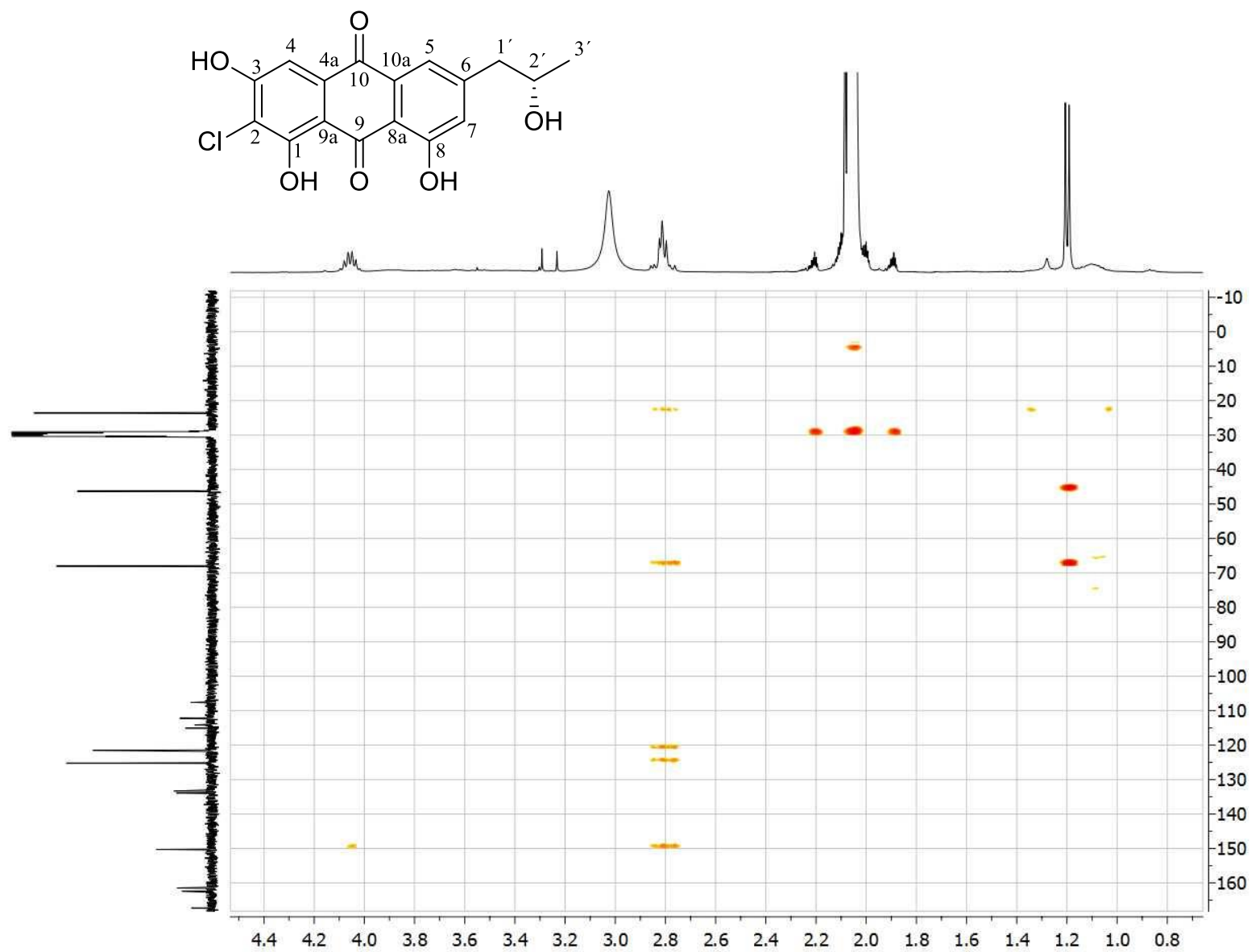
A-31. Espectro de masas (ESIMS) del asperfenamato (**99**).



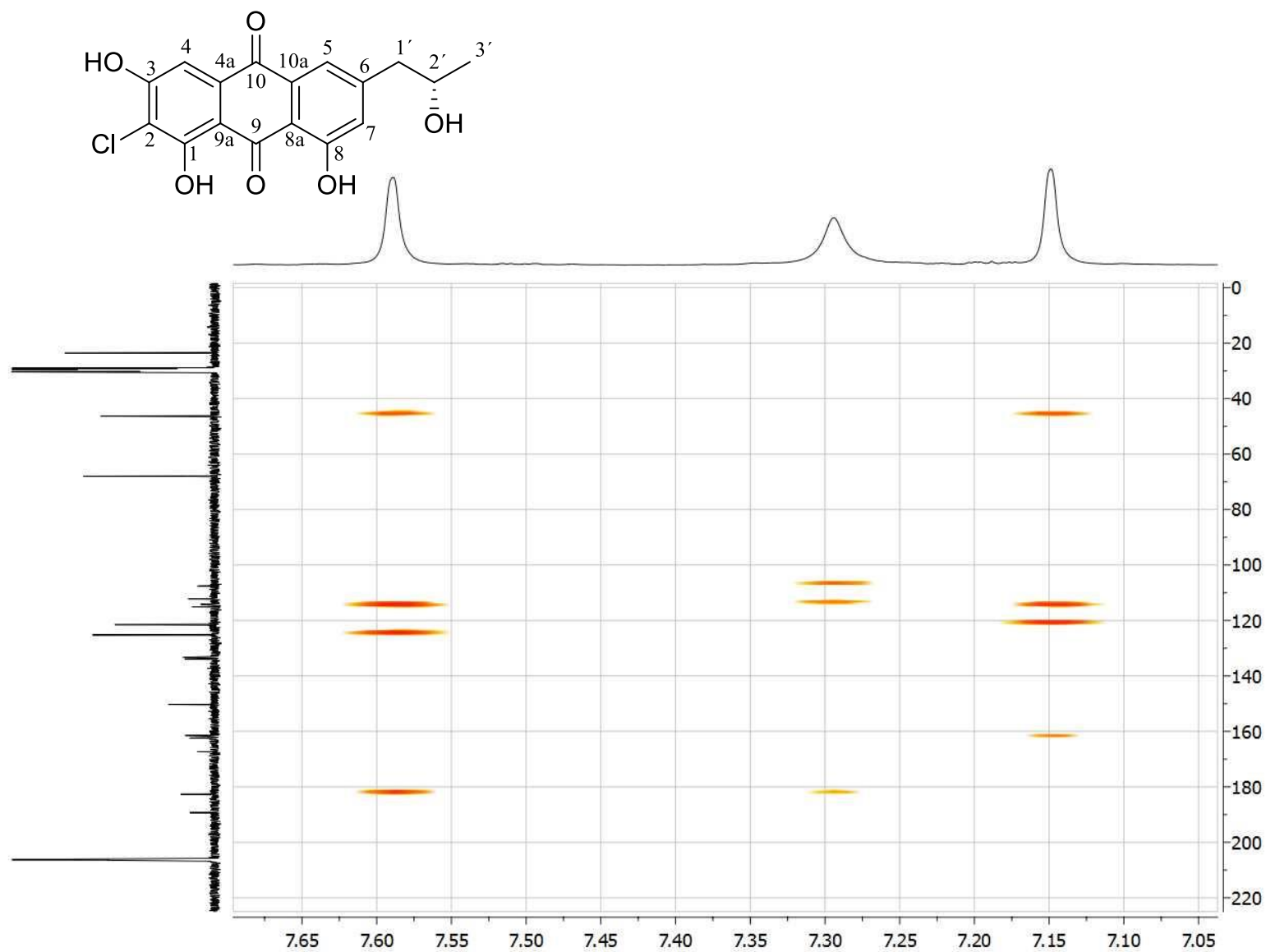
A-32. Espectro COSY de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) en Acetona- d_6 .



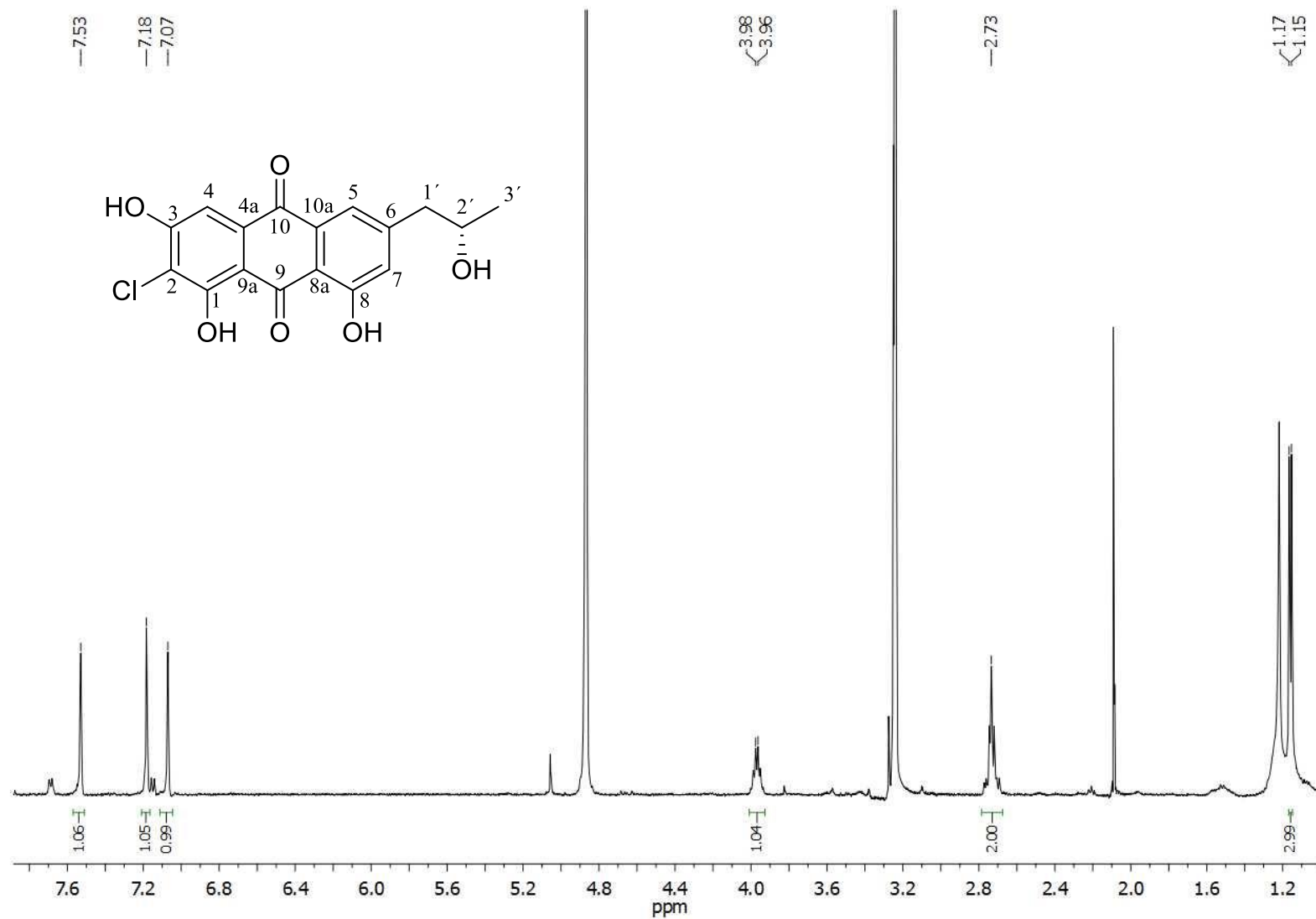
A-33. Espectro HSQC de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) en Acetona- d_6 .



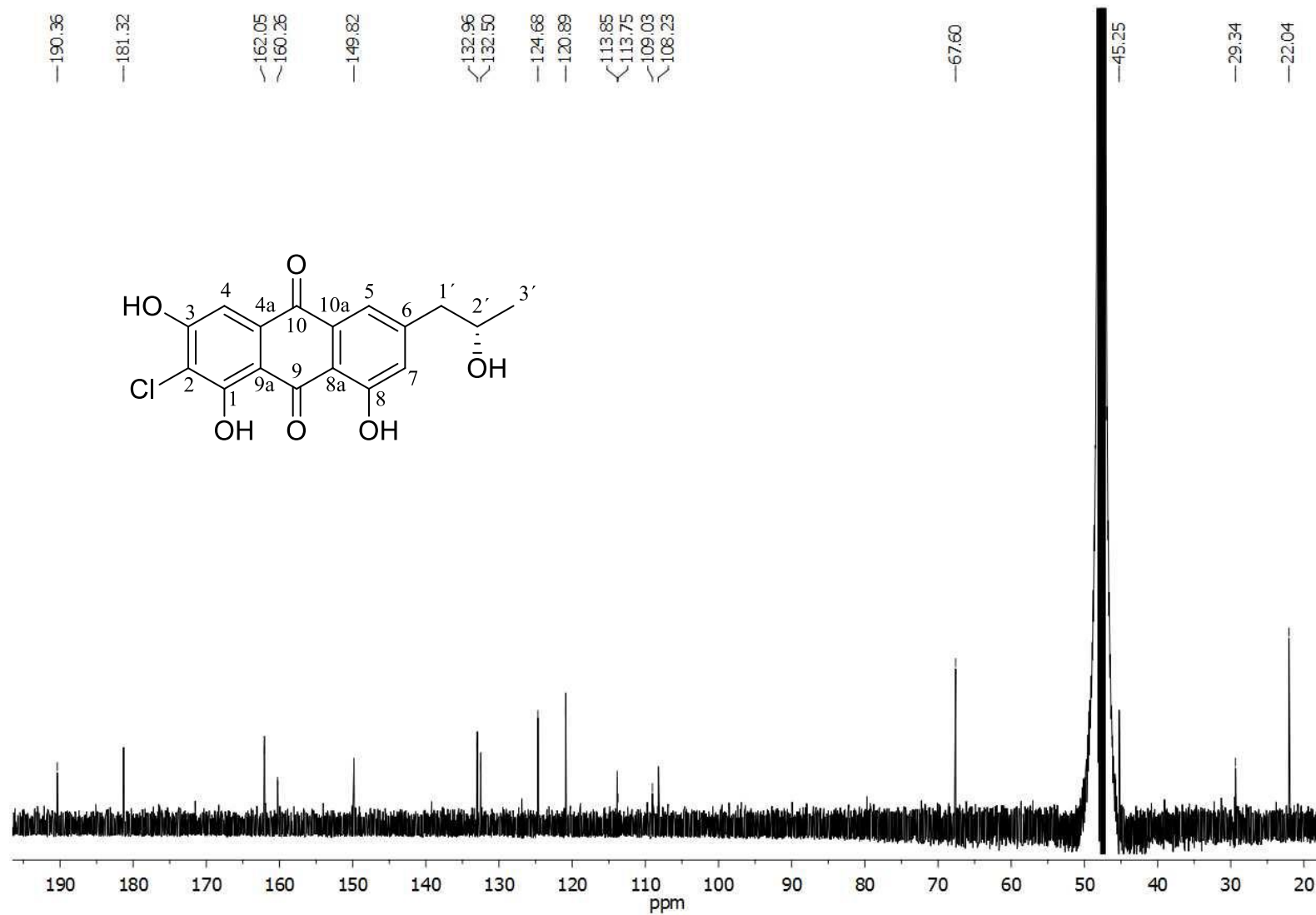
A-34. Espectro HMBC de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxi-antraquinona (**100**) en Acetona- d_6



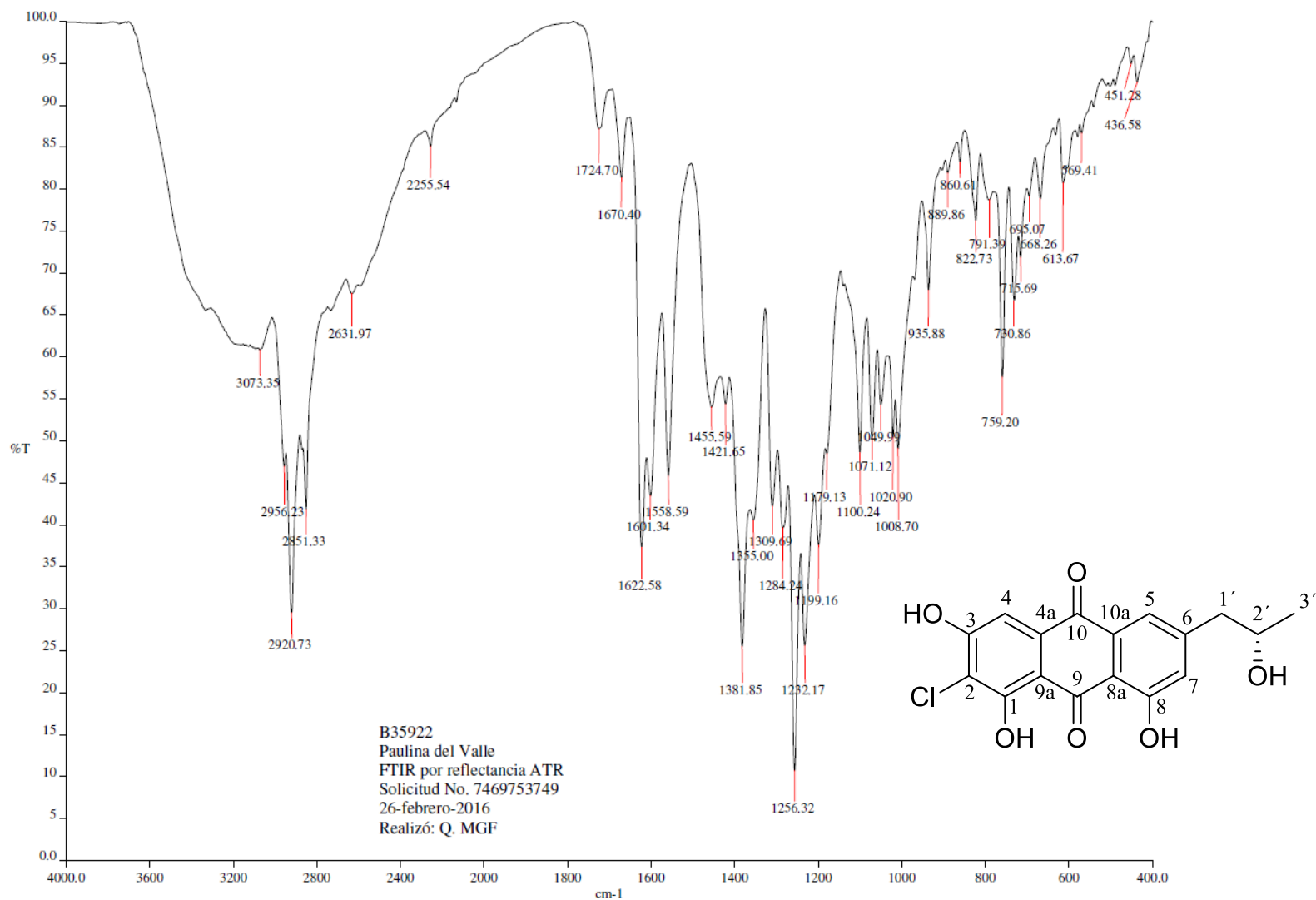
A35. Espectro HMBC de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxi-antraquinona (**100**) en Acetona-*d*₆.



A-36. Espectro de ¹H-RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**) (Metanol-*d*₄, 500 MHz).

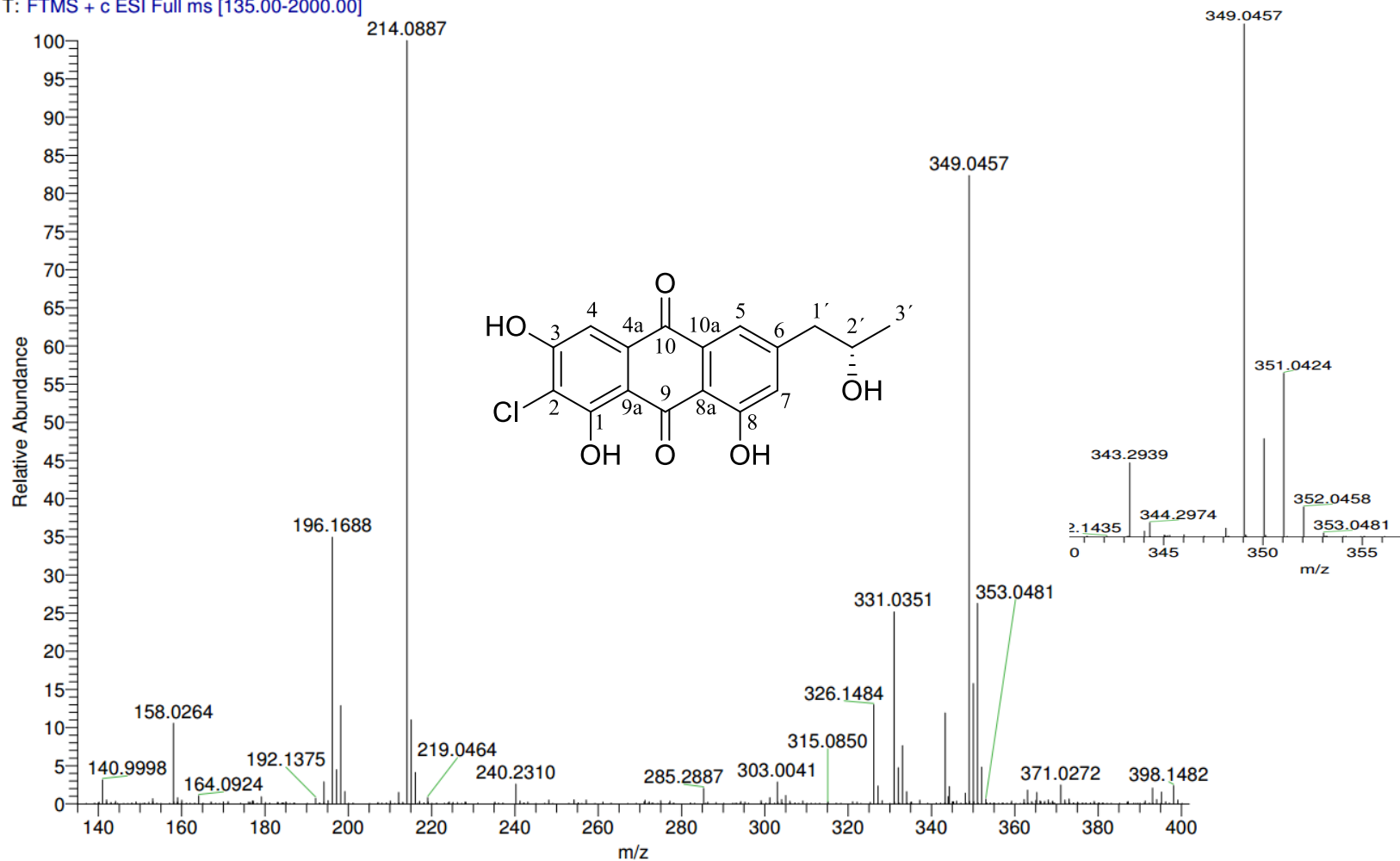


A-37. Espectro de ^{13}C -RMN de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxi-antraquinona (**100**) (Metanol- d_4 , 125 MHz).

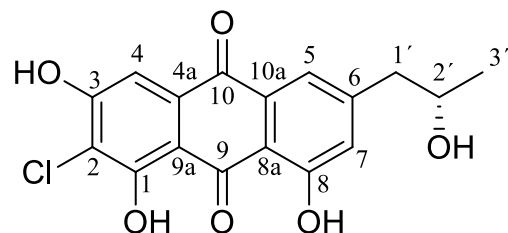


A-38. Espectro ATR-FTIR de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**).

b35-92-2 #844 RT: 4.56 AV: 1 NL: 1.20E8
T: FTMS + c ESI Full ms [135.00-2000.00]

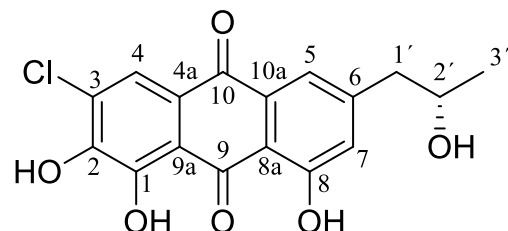


A-39. Espectro de masas (HRESIMS) de la 2-cloro-6-[2'(S)-hidroxipropil]-1,3,8-trihidroxiantraquinona (**100**).

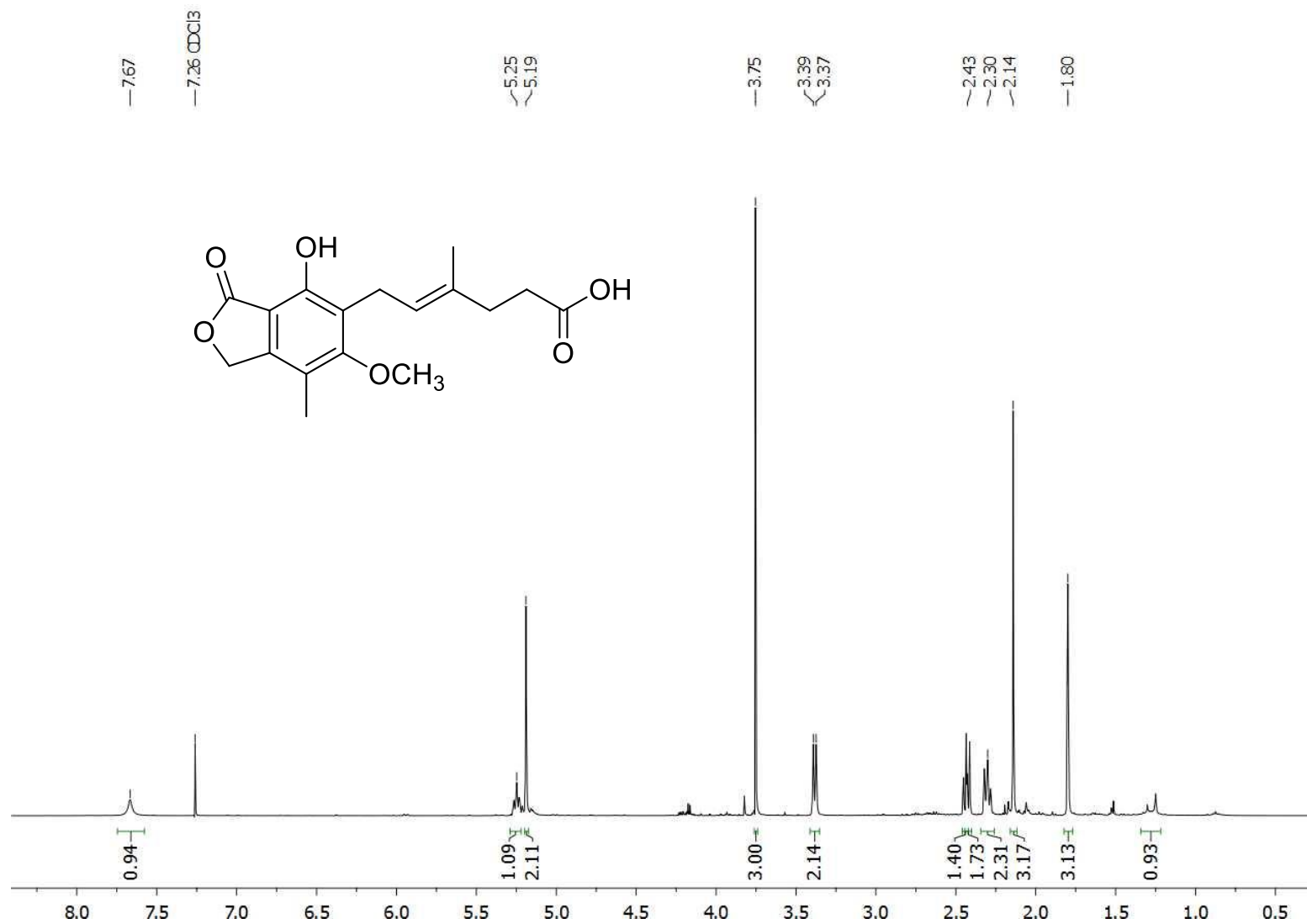
A-40. Desplazamientos químicos calculados para los 18 conformeros del enantiómero *S* del producto **100** (escalados a ppm)

Nucleus	Conformer																		Sum
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
H-4	1.62	1.02	0.61	0.54	0.13	0.31	0.28	0.09	0.08	0.05	0.75	0.32	0.30	0.07	0.20	0.61	0.26	0.08	7.34
C-4	23.73	14.97	8.96	7.95	1.85	4.56	4.11	1.30	1.21	0.76	10.93	4.66	4.46	1.09	2.96	8.98	3.77	1.17	107.43
C-1	35.43	22.30	13.37	11.89	2.76	6.80	6.13	1.95	1.80	1.13	16.31	6.96	6.65	1.64	4.41	13.43	5.63	1.75	160.35
C-4a	29.28	18.45	11.07	9.84	2.29	5.63	5.07	1.61	1.49	0.94	13.51	5.75	5.50	1.35	3.65	11.11	4.65	1.45	132.64
C-3	35.20	22.18	13.29	11.81	2.75	6.77	6.09	1.93	1.79	1.12	16.22	6.92	6.61	1.62	4.39	13.34	5.59	1.74	159.37
C-2	26.32	16.58	9.93	8.84	2.05	5.05	4.55	1.44	1.34	0.84	12.12	5.17	4.94	1.21	3.28	9.98	4.18	1.30	119.12
C-9a	24.34	15.31	9.19	8.16	1.90	4.67	4.21	1.34	1.24	0.78	11.21	4.78	4.57	1.12	3.03	9.22	3.86	1.21	110.13
C-10	40.17	25.34	15.20	13.52	3.14	7.73	6.95	2.21	2.05	1.29	18.55	7.90	7.55	1.86	5.01	15.27	6.38	1.99	182.11
C-9	41.80	26.37	15.80	14.04	3.27	8.04	7.23	2.30	2.13	1.34	19.28	8.21	7.85	1.93	5.21	15.86	6.64	2.07	189.35
C-10a	29.12	18.30	10.93	9.79	2.27	5.59	5.03	1.59	1.47	0.93	13.34	5.71	5.47	1.33	3.63	11.06	4.62	1.43	131.60
C-8a	25.11	15.92	9.48	8.38	1.97	4.84	4.33	1.38	1.28	0.80	11.57	4.92	4.73	1.16	3.14	9.46	3.97	1.24	113.68
C-5	26.58	16.87	10.22	8.92	2.12	5.17	4.59	1.49	1.38	0.86	12.45	5.20	5.05	1.25	3.35	10.10	4.20	1.34	121.14
H-5	1.67	1.05	0.63	0.57	0.13	0.32	0.29	0.09	0.08	0.05	0.77	0.33	0.31	0.08	0.21	0.64	0.27	0.08	7.58
C-6	33.60	21.18	12.88	11.44	2.57	6.43	5.81	1.83	1.69	1.05	15.69	6.57	6.25	1.54	4.16	12.90	5.33	1.64	152.54
C-7	27.80	17.39	10.37	9.35	2.17	5.31	4.81	1.54	1.43	0.90	12.68	5.45	5.17	1.29	3.43	10.56	4.40	1.38	125.42
H-7	1.56	0.97	0.59	0.52	0.12	0.30	0.27	0.09	0.08	0.05	0.72	0.30	0.29	0.07	0.19	0.59	0.25	0.08	7.05
C-8	36.09	22.76	13.64	12.12	2.81	6.93	6.25	1.98	1.83	1.15	16.65	7.10	6.78	1.66	4.50	13.69	5.74	1.78	163.47
C-1'	10.50	6.60	3.77	3.39	0.76	1.90	1.73	0.51	0.48	0.31	4.85	2.12	2.01	0.46	1.33	4.03	1.70	0.49	46.95
H-1'	0.66	0.41	0.23	0.21	0.05	0.11	0.10	0.04	0.04	0.02	0.30	0.11	0.11	0.03	0.07	0.25	0.09	0.03	2.85
H-1'	0.56	0.36	0.21	0.19	0.05	0.13	0.12	0.03	0.03	0.02	0.25	0.13	0.12	0.03	0.09	0.20	0.12	0.03	2.67
C-2'	15.96	10.20	6.18	5.39	1.22	3.11	2.76	0.86	0.79	0.50	7.65	3.15	3.06	0.72	2.04	6.19	2.57	0.77	73.12
C-3'	4.71	2.98	2.05	1.82	0.34	0.90	0.81	0.24	0.23	0.14	2.46	0.78	0.75	0.18	0.56	2.02	0.72	0.19	21.88
H-3'	0.28	0.18	0.12	0.10	0.02	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.15	0.04	0.04	0.01	0.03	0.12	0.04	0.01	1.25
H-3'	0.26	0.17	0.11	0.09	0.01	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.12	0.04	0.04	0.01	0.02	0.09	0.03	0.01	1.10
H-3'	0.33	0.20	0.11	0.10	0.02	0.05	0.04	0.01	0.01	0.01	0.16	0.05	0.05	0.01	0.04	0.13	0.05	0.01	1.40
H-2'	0.88	0.55	0.34	0.31	0.07	0.17	0.16	0.05	0.05	0.03	0.38	0.18	0.17	0.04	0.10	0.33	0.13	0.05	4.00

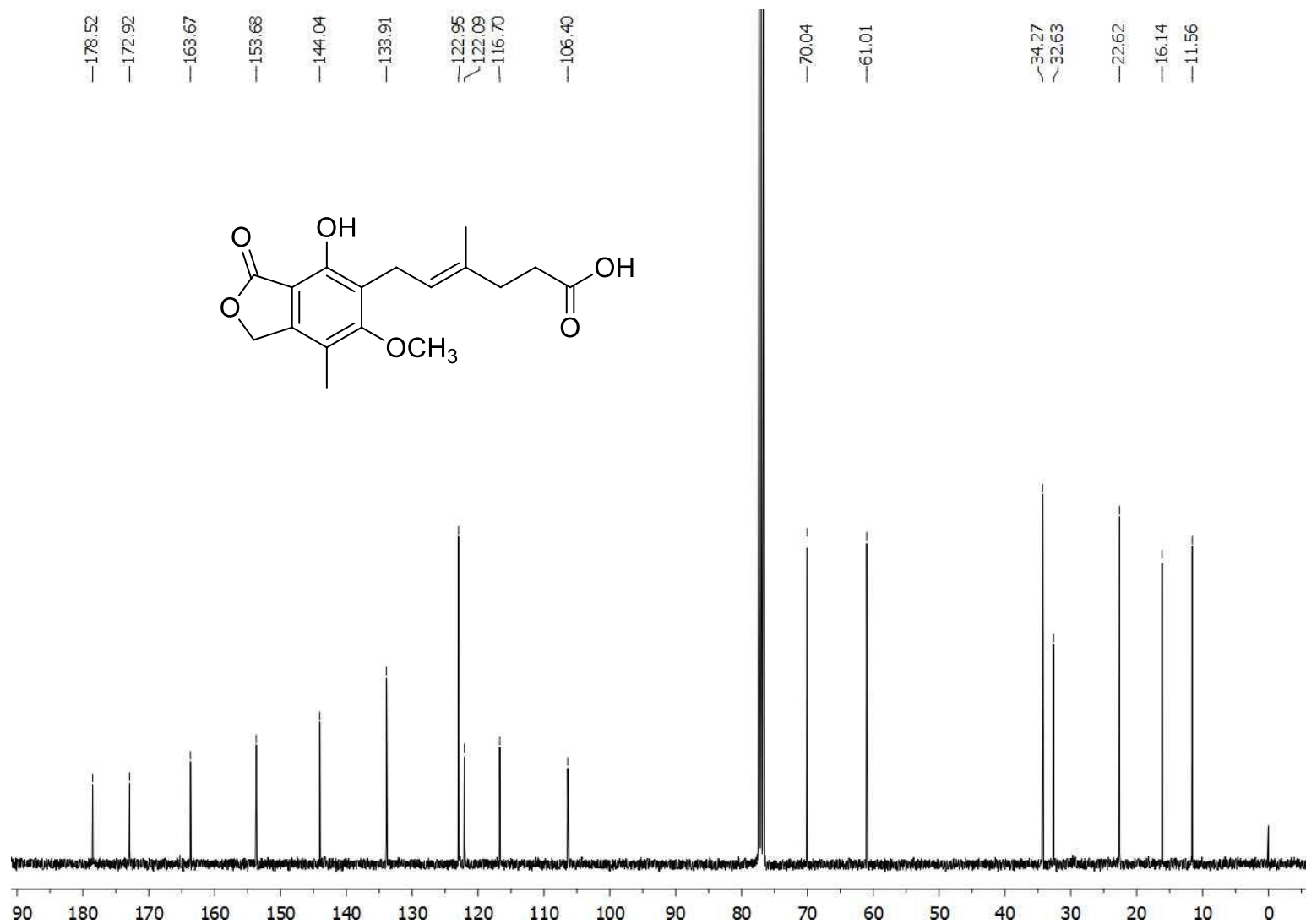
A-41. Desplazamientos químicos calculados para los 18 conformeros del enantiómero *S* de una estructura alternativa del producto **100** (escalados a ppm).



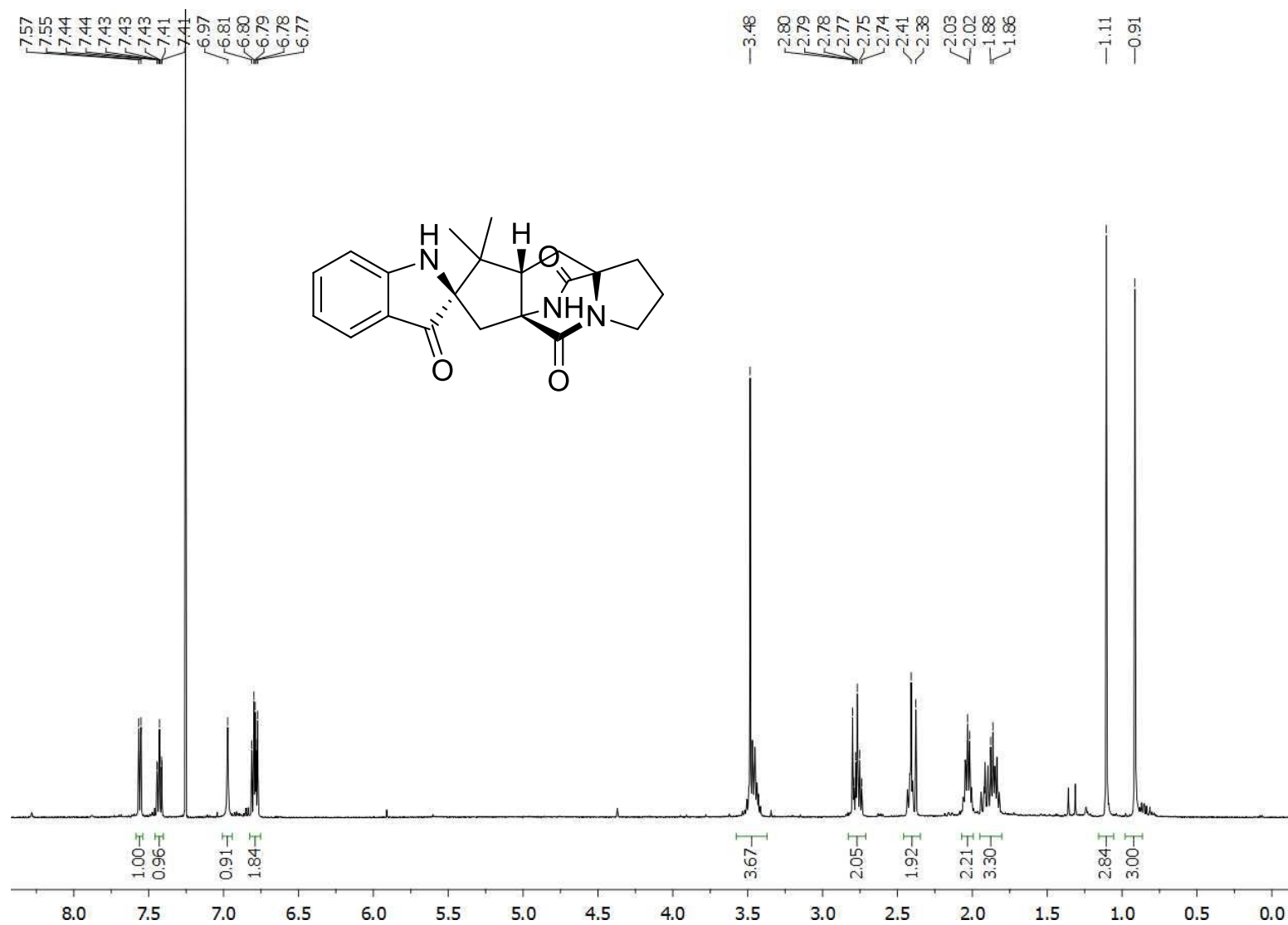
Nucleus	Conformer																		Sum
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
H-4	1.17	1.09	0.81	1.21	0.10	0.10	0.27	0.26	0.11	0.07	0.67	0.44	0.07	0.29	0.57	0.18	0.21	0.09	7.72
C-4	18.51	17.20	12.88	19.12	1.59	1.62	4.20	4.19	1.79	1.09	10.56	6.95	1.11	4.64	9.09	2.91	3.33	1.34	122.11
C-1	22.71	21.07	15.80	23.46	1.95	1.98	5.15	5.14	2.20	1.33	12.96	8.53	1.36	5.68	11.15	3.56	4.09	1.65	149.77
C-4a	18.82	17.46	13.10	19.45	1.62	1.64	4.27	4.26	1.82	1.11	10.75	7.07	1.13	4.71	9.25	2.95	3.39	1.37	124.16
C-3	20.18	18.74	14.03	20.83	1.73	1.76	4.58	4.57	1.95	1.19	11.51	7.58	1.21	5.05	9.90	3.17	3.63	1.46	133.06
C-2	22.49	20.88	15.64	23.23	1.93	1.96	5.10	5.09	2.17	1.32	12.83	8.45	1.35	5.63	11.04	3.53	4.05	1.63	148.31
C-9a	17.33	16.08	12.06	17.91	1.49	1.51	3.93	3.92	1.68	1.02	9.90	6.51	1.04	4.34	8.52	2.72	3.12	1.26	114.34
C-10	27.36	25.43	19.08	28.30	2.35	2.39	6.22	6.20	2.65	1.61	15.65	10.29	1.64	6.86	13.45	4.30	4.93	1.99	180.71
C-9	28.94	26.90	20.15	29.89	2.48	2.53	6.57	6.55	2.80	1.70	16.53	10.87	1.74	7.25	14.21	4.54	5.21	2.10	190.96
C-10a	20.14	18.65	13.92	20.78	1.71	1.75	4.57	4.55	1.93	1.18	11.42	7.55	1.19	5.04	9.88	3.16	3.62	1.45	132.49
C-8a	17.24	16.10	12.00	17.78	1.48	1.51	3.93	3.90	1.67	1.02	9.85	6.47	1.03	4.33	8.45	2.71	3.10	1.25	113.83
C-5	18.32	17.12	12.95	18.85	1.61	1.63	4.20	4.15	1.80	1.09	10.60	6.86	1.11	4.63	8.99	2.90	3.29	1.35	121.45
H-5	1.15	1.07	0.80	1.19	0.10	0.10	0.26	0.26	0.11	0.07	0.65	0.43	0.07	0.29	0.57	0.18	0.21	0.08	7.59
C-6	23.20	21.58	16.39	24.26	1.97	1.98	5.24	5.24	2.21	1.33	13.43	8.66	1.38	5.76	11.51	3.62	4.16	1.66	153.58
C-7	18.93	17.46	13.01	19.64	1.64	1.65	4.27	4.29	1.86	1.12	10.69	7.11	1.14	4.70	9.33	2.94	3.40	1.39	124.57
H-7	1.07	0.99	0.75	1.11	0.09	0.09	0.24	0.24	0.10	0.06	0.61	0.40	0.06	0.27	0.52	0.17	0.19	0.08	7.05
C-8	24.81	23.04	17.27	25.59	2.12	2.16	5.62	5.62	2.39	1.45	14.17	9.33	1.48	6.21	12.16	3.89	4.47	1.79	163.58
C-1'	7.28	6.71	4.80	7.16	0.55	0.59	1.55	1.56	0.62	0.40	4.14	2.79	0.42	1.85	3.58	1.15	1.33	0.50	46.97
H-1'	0.45	0.41	0.29	0.45	0.04	0.04	0.09	0.09	0.05	0.03	0.25	0.15	0.03	0.10	0.22	0.06	0.07	0.03	2.85
H-1'	0.38	0.37	0.27	0.40	0.03	0.04	0.11	0.11	0.04	0.02	0.21	0.17	0.02	0.11	0.18	0.08	0.09	0.03	2.68
C-2'	10.92	10.33	7.83	11.35	0.92	0.94	2.53	2.48	1.03	0.63	6.50	4.13	0.64	2.80	5.49	1.77	1.99	0.78	73.05
C-3'	3.26	3.01	2.60	3.87	0.26	0.27	0.73	0.73	0.30	0.18	2.10	1.02	0.16	0.69	1.80	0.49	0.56	0.20	22.21
H-3'	0.19	0.18	0.15	0.22	0.02	0.02	0.03	0.04	0.02	0.01	0.13	0.05	0.01	0.03	0.11	0.02	0.03	0.01	1.26
H-3'	0.18	0.17	0.13	0.20	0.01	0.01	0.03	0.03	0.01	0.01	0.10	0.05	0.01	0.04	0.08	0.02	0.02	0.01	1.12
H-3'	0.23	0.21	0.14	0.22	0.01	0.02	0.04	0.04	0.02	0.01	0.14	0.07	0.01	0.05	0.12	0.03	0.04	0.01	1.40
H-2'	0.94	0.88	0.65	0.97	0.08	0.08	0.21	0.21	0.09	0.06	0.54	0.35	0.06	0.24	0.46	0.15	0.17	0.07	6.21



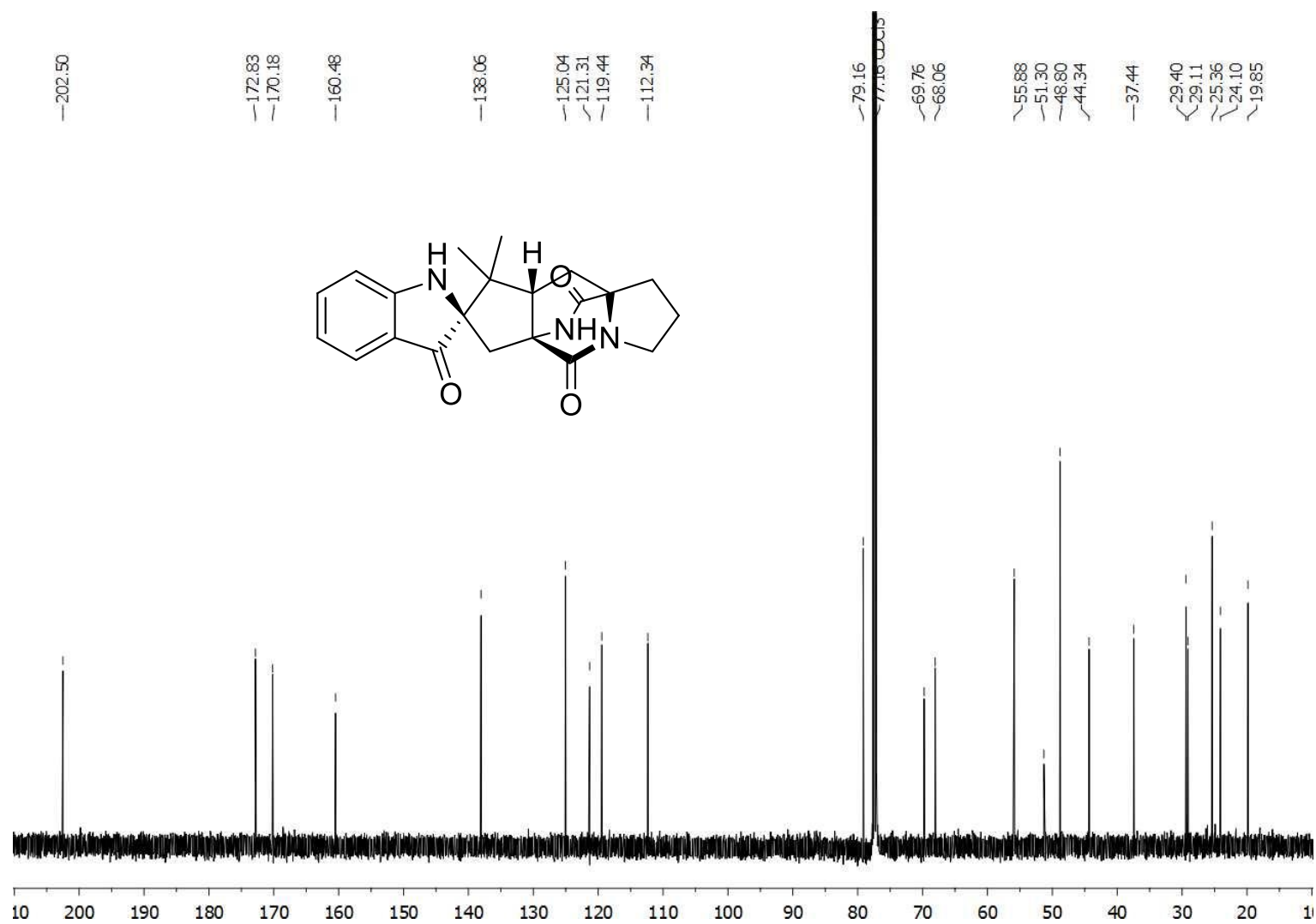
A-42. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del ácido micofenólico (31) (CDCl_3 , 400 MHz).



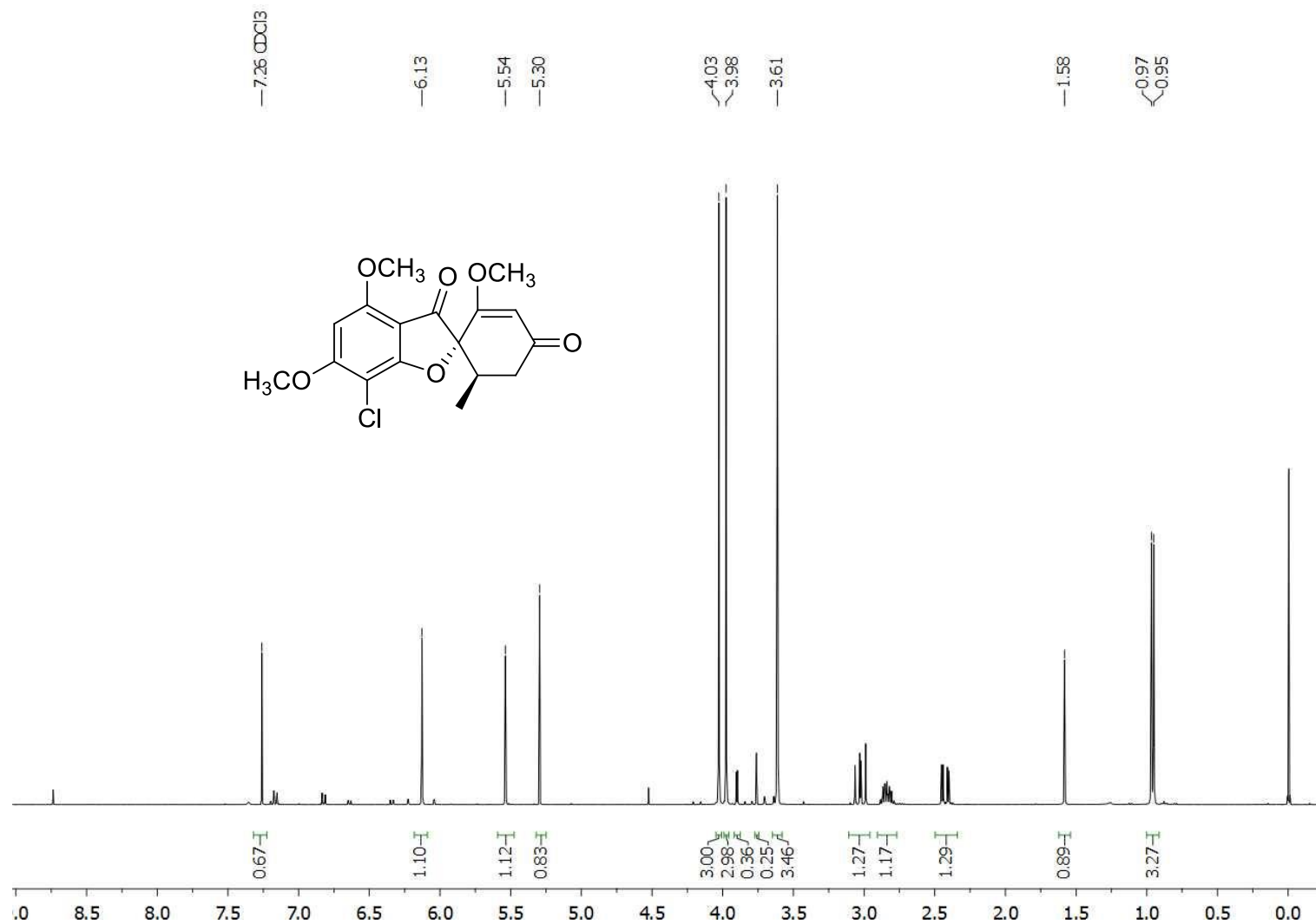
A-43. Espectro de ^{13}C -RMN del ácido micofenóico (31) (CDCl_3 , 100 MHz).



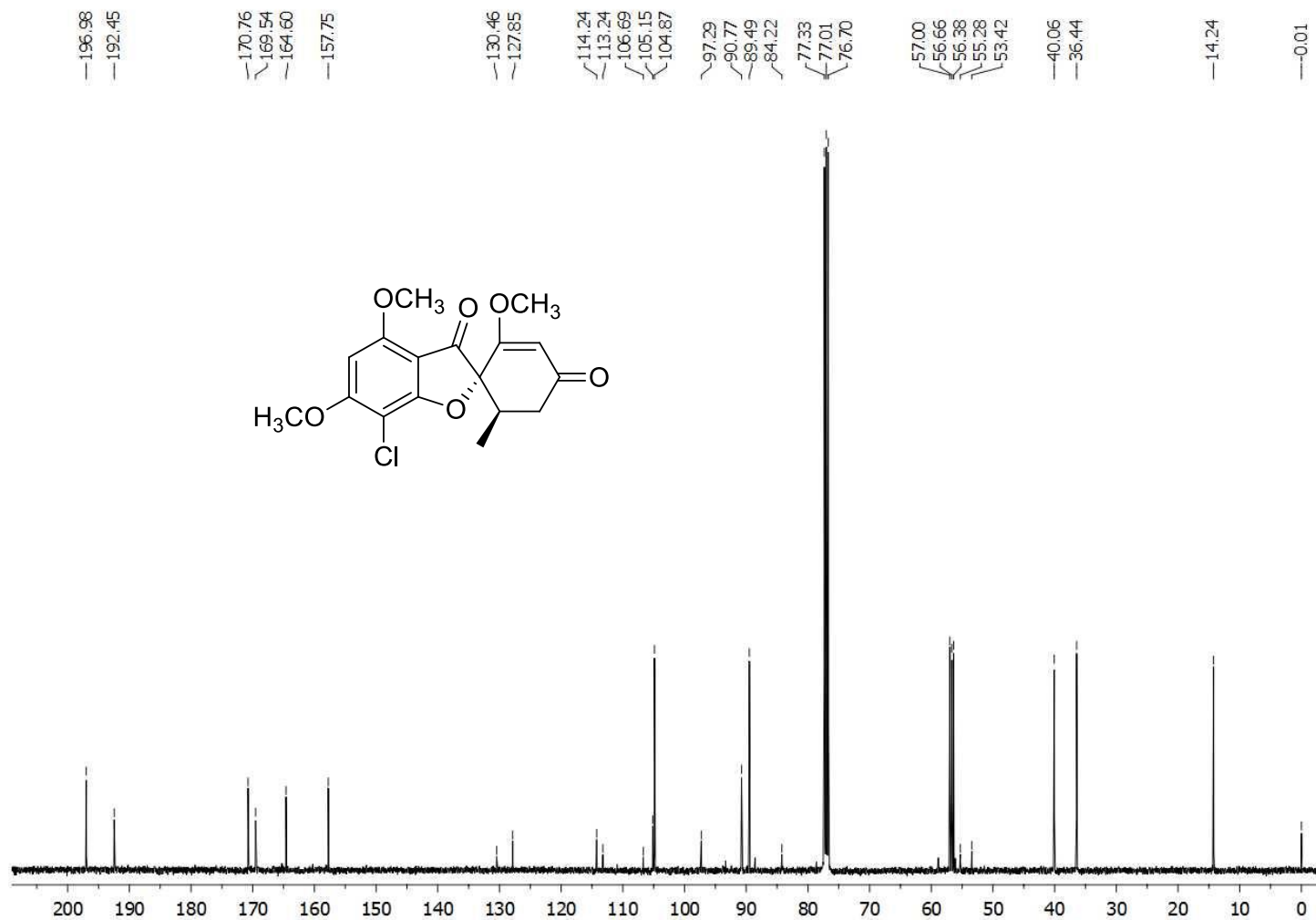
A-44. Espectro de ¹H-RMN de la brevipenamida A (38) (CDCl₃, 500 MHz).



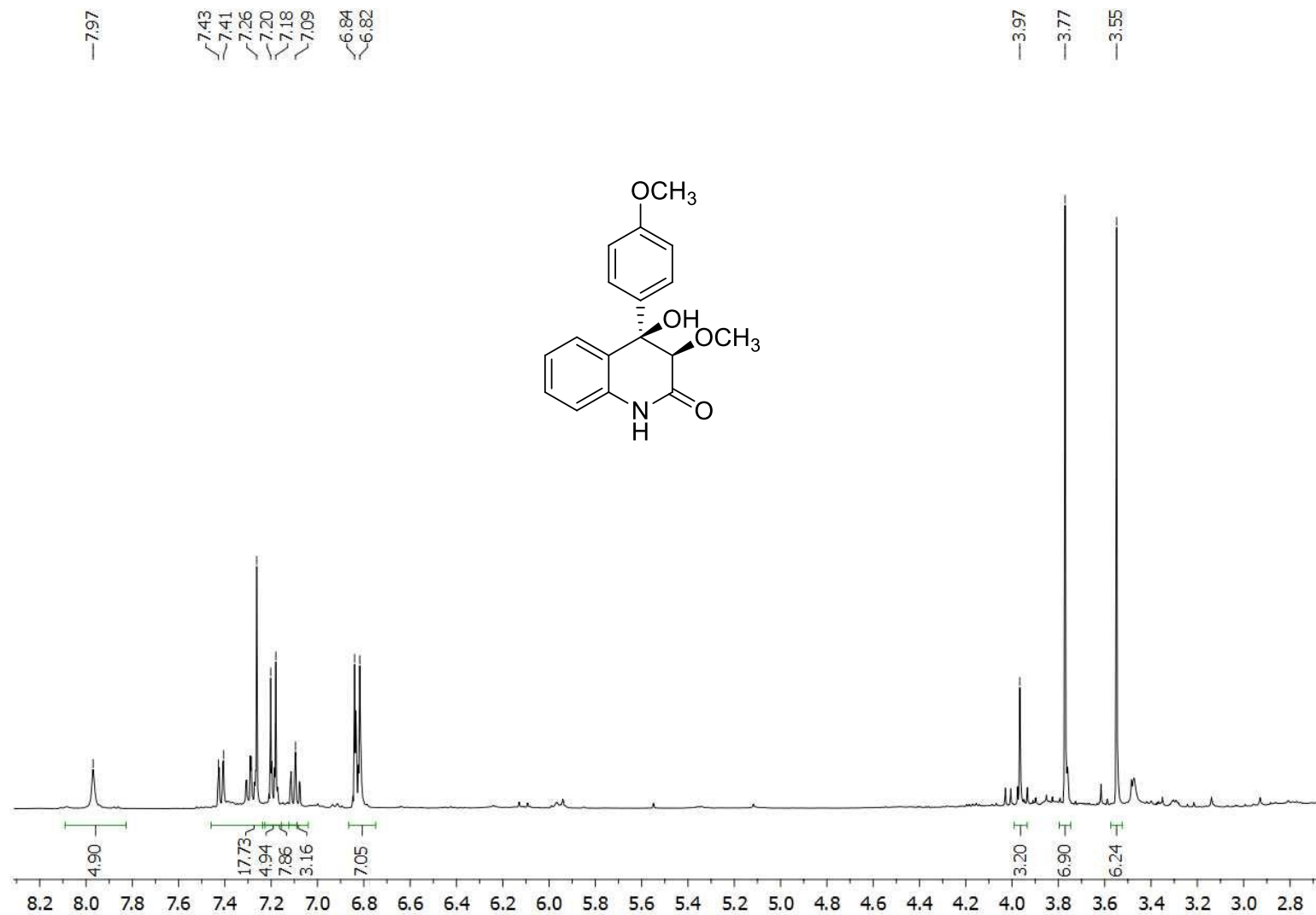
A-45. Espectro de ^{13}C -RMN de la brevianamida A (**38**) (CDCl_3 , 125 MHz).



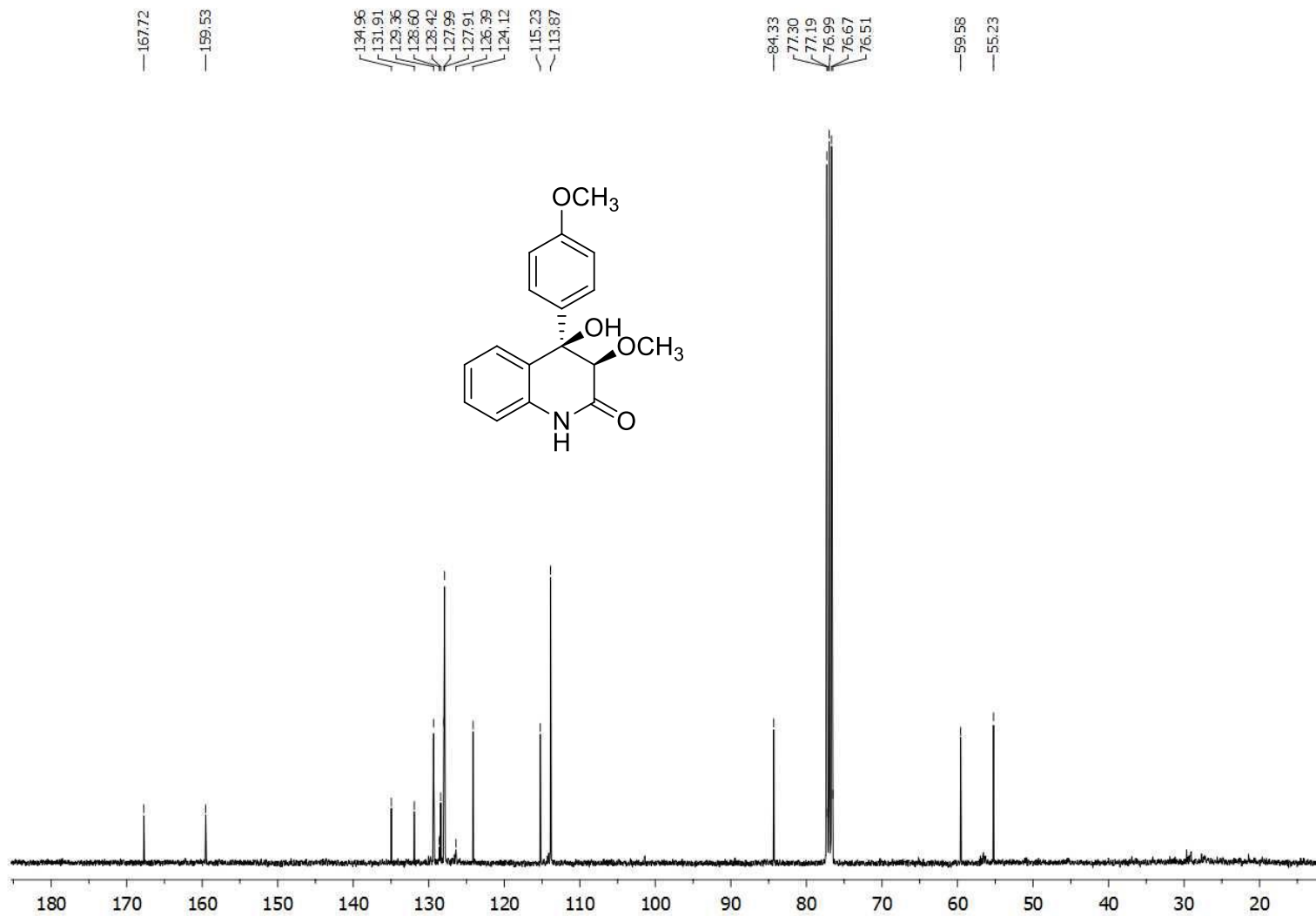
A-46. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la griseofulvina (**101**) (CDCl₃, 400 MHz).



A-47. Espectro de ^{13}C -RMN de la griseofulvina (**101**) (CDCl_3 , 100 MHz).



A-48. Espectro de ¹H-RMN de la 3-metoxi-4-hidroxi-4-(4'-metoxifenil)-3,4-dihidro-2(1H)-quinolinona (**102**) (CDCl₃, 400 MHz).



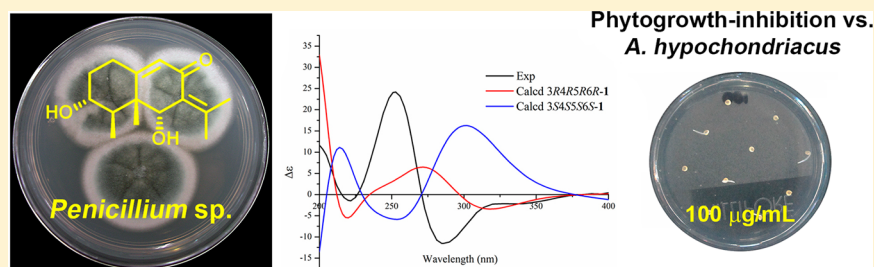
A-49. Espectro de ^{13}C -RMN de la 3-metoxi-4-hidroxi-4-(4'-metoxifenil)-3,4-dihidro-2(1H)-quinolinona (**102**) (CDCl_3 , 100 MHz).

Phytotoxic Eremophilane Sesquiterpenes from the Coprophilous Fungus *Penicillium* sp. G1-a14

Paulina Del Valle,[†] Mario Figueroa,* and Rachel Mata*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

S Supporting Information

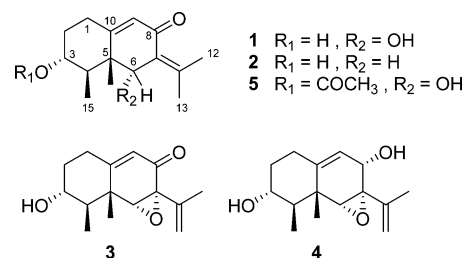


ABSTRACT: Bioassay-directed fractionation of an extract from the grain-based culture of the coprophilous fungus *Penicillium* sp. G1-a14 led to the isolation of a new eremophilane-type sesquiterpene, 3R,6R-dihydroxy-9,7(11)-dien-8-oxoeremophilane (**1**), along with three known analogues, namely, isopetasol (**2**), sporogen AO-1 (**3**), and dihydrosporogen AO-1 (**4**). The structure of **1** was elucidated using 1D and 2D NMR and single-crystal X-ray diffraction. Assignment of absolute configuration at the stereogenic centers of **1** was achieved using ECD spectroscopy combined with time-dependent density functional theory calculations. Sporogen AO-1 (**3**) and dihydrosporogen AO-1 (**4**) caused significant inhibition of radicle growth against *Amaranthus hypochondriacus* ($IC_{50} = 0.17$ mM for both compounds) and *Echinochloa crus-galli* ($IC_{50} = 0.17$ and 0.30 mM, respectively).

Weed control relies mainly on synthetic herbicides, although these are highly toxic to many living organisms and cause significant environmental pollution.^{1,2} In this regard, the agrochemical industry is continuously looking for the development of new natural pesticides that are environmentally more friendly.³ Coprophilous fungi have been an important source of bioactive secondary metabolites, including antifungal, antibacterial, and herbicidal agents.^{4,5} As part of our systematic search for potential herbicidal agents, we have now investigated *Penicillium* sp. G1-a14, an ascomycete isolated from bat guano collected in the Chontalcoatlán cave located in the State of Guerrero, Mexico.

Penicillium sp. G1-a14 was selected for bioassay-directed fractionation on the basis of its phytogrowth-inhibitory activity (Figure S13, Supporting Information) against seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., commonly known as amaranth and barnyard grass, respectively. Extensive chromatography of the active extract led to the isolation of a new eremophilane sesquiterpene (**1**), along with three known analogues, namely, isopetasol (**2**), sporogen AO-1 (**3**), and dihydrosporogen AO-1 (**4**). Eremophilanes **2–4** were identified by comparison with spectroscopic data previously reported (Figures S7–S12).^{6–8}

Compound **1** was isolated as a colorless, crystalline, and optically active compound. HRESIMS data gave a molecular formula of $C_{15}H_{22}O_3$. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Figures S1 and S2 and Table 1) revealed that **1** was the deacetyl analogue of 3-acetyl-9,7(11)-diene-6 α -hydroxy-8-oxoeremphi-



lane (**5**).⁹ The main differences between the spectra of these compounds were the absence of the resonances for the 3-acetyl moiety and the chemical shift values of H-3/C-3 (δ_H/δ_C 3.56/72.0), which appeared diamagnetically shifted in **1**. The structure of eremophilane **1** was corroborated by the key correlations observed in the 2D NMR experiments (Figures S3–S6 and Table 1) and an X-ray crystallographic analysis. As depicted in Figure 1, the cyclohexenone ring in compound **1** adopted an envelope-like conformation, while the second cyclohexane ring displayed a chair conformation. The hydroxy groups are oriented in the same direction. On the basis of the X-ray structure and the NOESY experiment, the absolute configuration at the stereogenic centers of **1** could be either 3R,4R,5R,6R or 3S,4S,5S,6S. In order to discriminate between these two possibilities, the ECD spectrum of **1** was recorded

Received: November 18, 2014

Published: January 20, 2015

Table 1. NMR Spectroscopic Data of Compound 1 (CD₃OD)^a

position	δ_C , type ^b	δ_H (mult, J in Hz) ^c	HMBC	NOESY
1	31.8, CH ₂	2.41, m 2.50, m	2, 5, 3, 9, 10	2, 3, 9, 14
2	35.5, CH ₂	2.05, m 1.45, m	1, 3, 4, 10	1, 3
3	72.0, CH	3.56, td (4.1, 10.9)	1, 2, 4, 15	1, 2, 14, 15
4	41.7, CH	2.14, m	2, 3, 5, 6, 14, 15	2, 15
5	47.1, C			
6	73.0, CH	4.70, s	1, 4, 5, 7, 8, 11, 14	13, 14, 15
7	133.3, C			
8	193.2, C			
9	125.8, CH	5.74, d (1.6)	1, 5, 7, 11	1, 14
10	166.0, C			
11	147.0, C			
12	23.0, CH ₃	2.07, s	6, 7, 8, 11, 13	
13	21.9, CH ₃	1.95, s	7, 8, 11, 12	6
14	18.0, CH ₃	0.98, s	4, 5, 6, 10, 11	1, 3, 6, 13, 15
15	10.4, CH ₃	1.10, d (6.7)	3, 4, 5	4, 3, 6

^aChemical shifts (δ) in ppm. ^b100 MHz. ^c400 MHz.

and compared with those calculated for each enantiomer using the time-dependent density functional theory (TDDFT) method. Conformational analysis of the two possible stereoisomers, 3*R*,4*R*,5*R*,6*R* and 3*S*,4*S*,5*S*,6*S*, was undertaken using the Monte Carlo protocol. All conformers for each enantiomer, within a 4 kcal/mol energy window, were selected and optimized using DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level. After optimization, the theoretical ECD spectrum of each enantiomer was calculated using TDDFT at the same level (Tables S1 and S2).^{10–12} The calculated ECD spectrum for enantiomer 3*R*,4*R*,5*R*,6*R* showed a good fit with the experimental plot of 1, which displayed two negative and one positive Cotton effects at 218, 318, and 272 nm, respectively (Figure 2). On the other hand, the calculated ECD spectrum of the 3*S*,4*S*,5*S*,6*S* enantiomer was opposite to the experimental ECD data (Figure 2), with two positive and one negative Cotton effect at 214, 302, and 254 nm, respectively. Hence, the 3*R*,4*R*,5*R*,6*R* configuration of 1 was confirmed. On the basis of

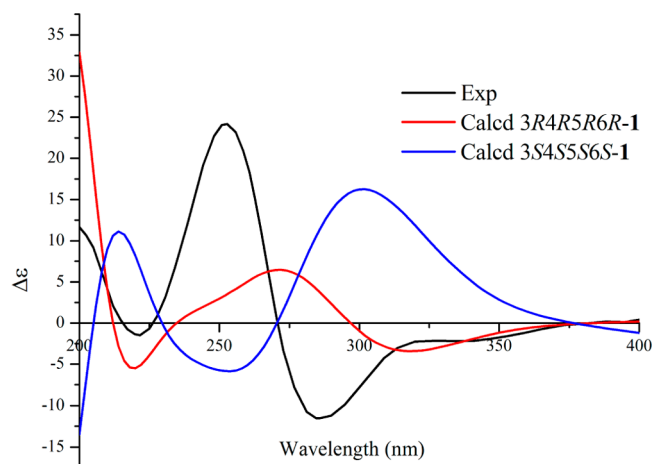


Figure 2. Comparison of experimental ECD spectrum of 1 (black) with those calculated at the B3LYP/DGDZVP level for enantiomers 3*R*,4*R*,5*R*,6*R*-1 (red) and 3*S*,4*S*,5*S*,6*S*-1 (blue).

the above discussion compound 1 was identified as 3*R*,6*R*-dihydroxy-9,7(11)-dien-8-oxoeremophilane.

The phyto-growth-inhibitory assay¹³ for sporogen AO-1 (3) and dihydrosporogen AO-1 (4) revealed a concentration-dependent inhibition on radicle elongation against *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*. Table 2 summarizes the IC₅₀

Table 2. Phyto-growth-Inhibitory Activity (IC₅₀) of the Organic Extract and Compounds 3 and 4 from *Penicillium* sp. G1-a14 against *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*

compound	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Echinochloa crus-galli</i>
extract ^a	46.18	184.74
3 ^b	0.17	0.17
4 ^b	0.17	0.30
tricolorin A ^{b,c}	0.10	0.03

^aExpressed in $\mu\text{g/mL}$. ^bExpressed in mM. ^cPositive control.

values for the extract of *Penicillium* sp. G1-a14 and the isolated eremophilanes sporogen AO-1 (3) and dihydrosporogen AO-1 (4). Compound 1 did not exhibit phyto-growth-inhibitory activity up to a concentration of 1.0 mM. Isopetasol (2) could not be tested due to the scarcity of sample.

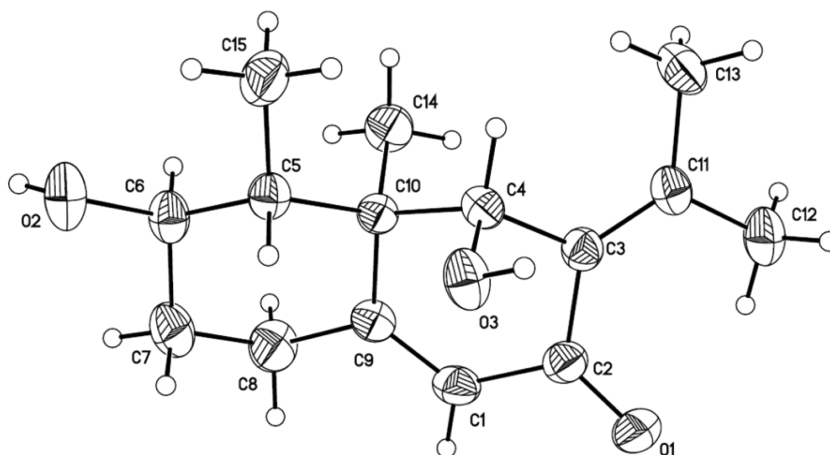


Figure 1. ORTEP drawing of compound 1 showing atomic labeling.

In summary, one new and two bioactive eremophilanes were isolated from the coprophilous fungus *Penicillium* sp. G1-a14. This type of sesquiterpenoid is common in *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Xylaria* species.¹⁴

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR, UV, and ECD spectra were obtained on a PerkinElmer 400 FT-IR, a Shimadzu U160, and a JASCO model J720 spectrophotometer, respectively. Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a PerkinElmer model 343 polarimeter at 20 °C. 1D and 2D NMR spectra were recorded on a 400 MHz Bruker Avance III (operating at 400.13 MHz for ¹H and 100.61 MHz for ¹³C; in the case of 1), a Varian Inova 300 MHz (operating at 300.13 MHz for ¹H and 75.15 MHz for ¹³C; in the case of 4), or a Varian Unity Inova 500 MHz (operating at 500 MHz for ¹H and 125.71 MHz for ¹³C; in the case of 2 and 3) spectrometer; spectra were recorded using CDCl₃ or CD₃OD and tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. HRESIMS spectra were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer. HPLC was carried out on a Waters system equipped with a 2535 pump and a 2998 photodiode array detector; data acquisition and management of chromatographic output were performed with the Empower 3 software (Waters). Reagent grade dichloromethane, *n*-hexane, methanol, and HPLC grade acetonitrile and methanol (J.T. Baker) were regularly used in the extraction and isolation procedures. Silica gel 60 (70–230 mesh, Merck) and Sephadex LH-20 (General Electric) were used for column chromatography (CC). TLC analyses were performed on precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using different mobile phases; visualization of plates was carried out using a Ce₂(SO₄)₃ (10%) solution in H₂SO₄ and heating.

Isolation and Identification of *Penicillium* sp. G1-a14. Samples of fresh bat guano were collected aseptically from two locations throughout the Chontalcoatlán cave in the State of Guerrero, México (18°38'52" N, 99°31'4" W) in February 2013, using sterile glass tubes and a spatula. The samples were vortexed with 3 mL of sterile water; 0.5 mL of the supernatants was directly plated onto water–agar medium (consisting of 39 g of agar in 1 L of distilled water) and potato-dextrose agar (PDA, Difco). Both media were amended with streptomycin sulfate (30 mg/L) and rose bengal (50 mg/L). Agar plates were incubated aerobically at room temperature for 1 week and screened for the presence of single fungal colonies. Colonies were transferred and purified on new PDA medium. One of these isolated colonies was accessioned as G1-a14 and is preserved in the Department of Pharmacy culture collection at Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

The macromorphology and micromorphology of the fungus allowed us to preliminarily assign G1-a14 as *Penicillium* sp. (Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Ascomycota).¹⁵ For molecular identification of G1-a14, DNA was extracted from fresh cultures grown on PDA. The nuclear internal transcribed spacer regions 1 and 2 and 5.8S nrDNA (ITS) were amplified and sequenced following published protocols.¹⁵ The consensus sequence of the ITS region was submitted for BLAST search using the NCBI GenBank database, and the top BLAST matches for G1-a14 indicated similarities to sequences of several *Penicillium* spp. [*P. copticola* (GenBank JN617685, identities = 364/386, 94%), *P. terrigenum* (GenBank JN617684, identities = 364/386, 94%), *P. roseopurpureum* (GenBank AF455437, identities = 364/386, 94%), and *P. sanguifluum* (GenBank JN617689, identities = 359/386, 93%)]. On the basis of this information, the fungus is currently recognized as *Penicillium* sp. G1-a14, and the ITS sequence was deposited in GenBank (accession no. KP402588).

Fermentation, Extraction, and Isolation. A 15 mL amount of seed cultures grown for 1 week in potato-dextrose broth (Difco) was used to inoculate two Fernbach flasks containing the solid rice medium (250 g of rice and twice the volume of rice with H₂O, sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min). Fermentation was carried out at

room temperature until good growth was observed (approximately 30 days). The solid cultures were extracted three times with 500 mL of CH₂Cl₂–MeOH (9:1). The cultures were chopped with a spatula and shaken overnight at ~100 rpm, followed by vacuum filtration. The filtrates were transferred into a separatory funnel. The bottom layers were combined and dried over anhydrous Na₂SO₄, then evaporated to dryness to produce 3 g of a brownish residue, which was subsequently reconstituted with 100 mL of MeOH–CH₃CN (1:1) and 100 mL of *n*-hexane. The biphasic solution was transferred to a separatory funnel and shaken vigorously. The MeOH–CH₃CN layer was drawn off and evaporated to dryness under vacuum to yield 1.5 g of a defatted fraction. One gram of the latter was subjected to Sephadex LH-20 CC eluting with MeOH–CH₂Cl₂ (9:1) to yield five major secondary fractions (F1–5). F4 (350 mg) was further separated by CC on silica gel eluting with a gradient of *n*-hexane–CH₂Cl₂ (100:0 → 0:100) and CH₂Cl₂–MeOH (100:0 → 70:30) to generate 10 fractions (F4_{I–X}). Subfractions F4_{VII} and F4_{IX} yielded compounds 4 (15.8 mg) and 1 (18.8 mg), respectively. Eremophilanes 2 (4.3 mg) and 3 (10.2 mg), which eluted at 10.5 and 13.5 min, respectively, were purified from F4_V (45 mg) by reversed-phase HPLC (Gemini C₁₈, 250 × 21.2 mm, 5 μm) using as mobile phase MeOH–H₂O (acidified with 0.1% formic acid), 1:1, and increasing linearly to 80% MeOH over 30 min, then changing to 100% MeOH for 5 min. The flow rate was 18 mL/min, and the injection volume was 300 μL.

3R,6R-Dihydroxy-9,7(11)-dien-8-oxoeremophilane (1): colorless needles (CHCl₃); mp 206 °C; [α]_D²⁰ –13.68 (c 1.9, H₂O); UV (H₂O) λ_{max} (log ε) 255.2 (4.2) nm; IR (ATR) ν_{max} 1650 and 3500 cm⁻¹; ¹H NMR and ¹³C NMR see Table 1; ESIMS *m/z* 273 [M + Na]⁺ (82), 251 (61), 233 (65), 215 (100), 188 (5), 161 (4), 122 (5); HRESIMS *m/z* 251.1646 [M + H]⁺ (calcd for C₁₅H₂₂O₃, 251.1642).

X-ray Crystal Structure Analysis of Compound 1. X-ray diffraction data were collected on a Bruker D8 Venture diffractometer with Cu Kα radiation. The structure was solved by the SHELXS-2013 method and refined using full-matrix least-squares on F². Suitable crystals of 1 were obtained by evaporation of CH₂Cl₂–MeOH (9:1). Crystallographic data for 1 have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) with the accession no. 1034405. These data are available, free of charge, from the CCDC via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Crystal data for 1. C₁₅H₂₂O₃, *M* = 250.32, orthorhombic, space group P₂₁2₁2₁ with *a* = 10.8914(2) Å, *b* = 10.9342(2) Å, *c* = 11.4227(2) Å, α = β = γ = 90°, *V* = 1360.31(4) Å³, *Z* = 4, *T* = 296(2) K, *D*_c = 1.222 Mg/m³, μ(Cu Kα) = 0.669 mm⁻¹, *F*(000) = 544, 27 500 reflections collected, 2481 independent reflections (*R*_{int} = 0.0459). The final *R*₁ values were 0.0329 [*I* > 2σ(*I*)]. The final *wR*₂ (*F*²) values were 0.0868 [*I* > 2σ(*I*)]. The final *R*₁ values were 0.0331 (all data). The final *wR*₂ (*F*²) values were 0.0870 (all data).

Computational Section. Minimum energy structures for the different stereoisomers were built with Spartan¹⁰ software (Wavefunction Inc.). Conformational analysis was performed with the Monte Carlo search protocol as implemented in the same software under the MMFF94 molecular mechanics force field. The resulting conformers were minimized using the DFT method at the B3LYP/DGDZVP level of theory employing the Gaussian⁰⁹ program package (Gaussian Inc.). The self-consistent reaction field with conductor-like continuum solvent model was used to perform the ECD calculations of the major conformers of both 1 enantiomers in water solution. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength (*R*) in dipole velocity (*R*_{vel}) and dipole length (*R*_{len}) forms were simulated into an ECD curve.

Phytogrowth-Inhibitory Bioautographic Assay. Seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa crus-galli* L. Beauv. were first pretreated with sodium hypochlorite (5%) for 1 min and washed exhaustively with distilled water. Then, TLC was performed on precoated silica gel 60 F₂₅₄ glass plates (3 × 20 cm) for extract and fractions (1 mg, Figure S13). After eluting with CH₂Cl₂–MeOH (95:5), plates were dried and covered with 15 mL of agar solution (1%). When the agar was solidified, seeds were placed over the plate area (~15 seeds per cm²). Phytogrowth-inhibition bands were

observed after incubation of 36 h for *A. hypochondriacus* or 48 h for *E. crus-galli*, at 28 °C in a moistened chamber.

Phytogrowth-Inhibitory Bioassay. The phytotoxic activity of the extract and isolated metabolites of *Penicillium* sp. G1-a14 was evaluated on radicle growth of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* using a Petri dish bioassay.¹⁶ Seeds were pretreated as described above before germination. Stock solutions of the extract and compounds in MeOH were used to prepare agar solutions (2%) of the extract (50, 100, 150, and 200 µg/mL) and pure compounds (25, 50, 75, and 100 µg/mL). A 5 mL sample of varying concentrations of agar solution was added to each Petri dish. After agar solidification, 10 seeds were placed on each plate. Three replicates were prepared for each concentration; tricolorin A was used as the positive control.¹³ Dishes were kept in a moistened chamber at 28 °C. After 36 or 48 h, for *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*, respectively, the root length was measured and compared to the proper untreated control (MeOH). The inhibition percent was calculated using the formula

$$\text{Inhibition (\%)} = (L_{\text{control}} - L_{\text{treatment}}) / L_{\text{control}} \times 100$$

where L_{control} is the radicle length of seedlings in the control and $L_{\text{treatment}}$ is the radicle length of seedlings treated. The IC_{50} values were calculated by linear fitting based on percent of radicle growth inhibition.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

1D and 2D NMR spectra of compounds 1–4, X-ray crystallographic data of 1, calculated DFT B3LYP/DGDZVP free energies, population and theoretical averaged rotatory strength values expressed in $R_{(\text{len})}$ for conformers of 3R4R5R6R and 3S4S5S6S enantiomers of 1, and phytogrowth-inhibitory activity (bioautographic assay) of active fraction F4 are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: +52-555-622-5289 or +52-555-622-5290. E-mail: mafiguer@unam.mx (M. Figueroa).

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

Notes

†Taken in part from the Ph.D. thesis of P. Del Valle. The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT (150966) and DGAPA-UNAM (IN212913). We thank I. Rivero, A. Pérez, S. Hernández, H. Ríos, I. Chávez, and E. Huerta for their valuable technical assistance. P.D.V. acknowledges a fellowship from CONACyT (234569) to pursue graduate studies. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system.

■ REFERENCES

- (1) Orker, E. C. *J. Agric. Sci.* **2006**, *144*, 31–43.
- (2) Petroski, R. J.; Stanley, D. W. *J. Agric. Chem.* **2009**, *57*, 8171–8179.
- (3) Cantrell, C. L.; Dayan, F. E.; Duke, S. O. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1231–1242.
- (4) Bills, G. F.; Gloer, J. B.; An, Z. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 549–565.
- (5) Macías, M.; Gamboa, A.; Ulloa, M.; Toscano, R. A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 751–758.

(6) Yurchenko, A. N.; Smetanina, O. F.; Kalinovskii, A. I.; Kirichuk, N. N.; Yurchenko, E. A.; Afiyatullo, S. S. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *48*, 996–998.

(7) Sugama, K.; Hayashi, K.; Nakagawa, T.; Mitsunashi, H.; Yoshida, N. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1619–1622.

(8) Le, D. H.; Takenaka, Y.; Hamada, N.; Tanahashi, T. *Phytochemistry* **2013**, *91*, 242–248.

(9) Huang, Y. F.; Qiao, L.; Lv, A. L.; Pei, Y. H.; Tian, L. *Chin. Chem. Lett.* **2008**, *19*, 562–564.

(10) Mendoza-Espinoza, J. A.; López-Vallejo, F.; Fragozo-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R.; Cerda-García-Rojas, C. M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 700–708.

(11) Acuña, U. M.; Figueroa, M.; Kavalier, A.; Jancovski, N.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1775–1779.

(12) Bodensieck, A.; Fabian, W. M. F.; Kunert, O.; Belaj, F.; Jahangir, S.; Schuhly, W.; Bauer, R. *Chirality* **2010**, *22*, 308–319.

(13) Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Wickramaratne, D. B. M.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 571–582.

(14) Ebel, R. *Mar. Drug* **2010**, *8*, 2340–2368.

(15) Figueroa, M.; Jarmusch, A. K.; Raja, H. A.; El-Elimat, T.; Kavanaugh, J. S.; Horswill, A. R.; Cooks, R. G.; Cech, N. B.; Oberlies, N. H. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1351–1358.

(16) Li, S.; Shao, M. W.; Lu, Y. H.; Kong, L. C.; Jiang, D. H.; Zhang, Y. L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8997–9001.

Alkaloids from the Fungus *Penicillium spathulatum* as α -Glucosidase Inhibitors*

Authors

Paulina Del Valle¹, Ana-Laura Martínez¹, Mario Figueroa¹, Huzefa A. Raja², Rachel Mata¹

Affiliations

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

² Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, North Carolina, USA

Key words

- *Penicillium spathulatum*
- Trichocomaceae
- benzomalvin A
- α -glucosidase inhibitors
- antihyperglycemic effect
- antihyperalgesic activity

Abstract

▼ Benzomalvin A (**1**), quinolactacins A1 (**2**), A2 (**3**) and B (**4**), quinolonimide (**5**), asperphenamate (**6**), and a new halogenated polyhydroxyanthraquinone, namely 2-chloro-6-[2'(S)-hydroxypropyl]-1,3,8-trihydroxy-anthraquinone (**7**), were isolated from an organic extract obtained from the solid culture of *Penicillium spathulatum* B35. Compounds **2** and **3** were isolated as an epimeric mixture, and compound **4** as a racemate. The structure of **7** was elucidated using 1D and 2D NMR, combined with computational methods (density functional theory). Compound **1**, the mixture of **2** and **3**, racemate **4**, and compound **6**

inhibited the yeast α -glucosidase in a concentration-dependent fashion with IC₅₀ values of 383.2, 273.3, 57.3, and 8.3 μ M, respectively. The α -glucosidase inhibitory properties of **1** were confirmed *in vivo* with an oral sucrose tolerance test in normal and hyperglycemic mice ($p < 0.05$). Furthermore, docking studies predicted that the most stable conformers of **1** bind to yeast and mammalian α -glucosidases with a higher affinity than acarbose. Finally, **1** also showed antihyperalgesic activity when tested in the formalin assay in hyperglycemic mice ($p < 0.05$).

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/products>

Introduction

▼ Type 2 diabetes mellitus (T2DM) has become one of the most expanding global health problems in the 21st century. T2DM is a chronic and progressive disease characterized by high blood glucose levels, which results from impaired insulin secretion and insulin resistance [1]. Effective treatment of T2DM requires a healthy lifestyle and hyperglycemia control using different type of drugs, including insulin secretagogues and sensitizers, as well as agents targeting intestinal glucose absorption [1, 2]. The last group of drugs slows the rate of carbohydrate absorption in the brush border of the small intestine through the inhibition of membrane-bound α -glucosidases. These enzymes hydrolyze larger carbohydrate molecules to glucose and other monosaccharides facilitating their absorption [3]. Furthermore, α -glucosidase inhibitors are useful in reducing the risk of cerebrovascular events in patients with T2DM [4]. The existing clinically used α -glucosidase inhib-

itors are acarbose, miglitol, and voglibose, all originating from natural products; nevertheless, they are associated with gastrointestinal side effects [5].

Several studies have demonstrated that fungi belonging to the ascomycetes are important sources of new and potent α -glucosidase inhibitors [6–8]. Thus, this work was undertaken in order to discover new α -glucosidase inhibitors from the coprophilous fungus *Penicillium spathulatum* Frisvad & Samson (Trichocomaceae). During this process a new halogenated polyhydroxyanthraquinone (**7**) was also isolated.

P. spathulatum was first described by Frisvad and coworkers [9]. This fungus has a worldwide distribution and is found commonly in soil, air, water, ice, and food products, and is associated to different plants. HPLC analysis of the extrolites of 19 isolates of *P. spathulatum* revealed that all of the isolates produced asperphenamate (**6**) and perinadine, 17 benzomalvins, 5 biosynthesized breviones, 5 cyclopenols and related benzodiazepine alkaloids, and only two produced quinolactacins [9].

received May 11, 2016
revised June 22, 2016
accepted June 23, 2016

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-111393>
Published online July 11, 2016
Planta Med 2016; 82: 1286–1294 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Dr. Rachel Mata
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
Avenida Universidad 3000,
Colonia Universidad, Ciudad de México, 04510
México
Phone: + 52 55 56 22 52 89
Fax: + 52 55 56 22 53 29
rachel@unam.mx

* Taken, in part, from the PhD thesis of P. Del Valle.

Results and Discussion

In the course of our screening of fungal species as sources of α -glucosidase inhibitors, a few coprophilous fungi from bat dung collected at the Chontalcoatlán cave, in the State of Guerrero, Mexico, were isolated and cultured. Their organic extracts were prepared and defatted for testing *in vitro* against yeast α -glucosidase using a well-known spectrophotometric assay [10]. The defatted extract from *P. spathulatum* B35 was selected for further investigation on the basis of its inhibitory activity against yeast α -glucosidase ($IC_{50} = 56.5 \mu\text{g/mL}$). Extensive chromatography of this active fraction led to the isolation of benzomalvin A (**1**), the epimeric mixture (7:3) of quinolactacins A1 (**2**) and A2 (**3**), quinolactacin B as a racemate (**4**), quinolonimide (**5**), asperphenamate (**6**), and 2-chloro-6-[2'(*S*)-hydroxypropyl]-1,3,8-trihydroxy-anthraquinone (**7**), a new chemical entity (► Fig. 1).

Compounds **1–4** and **6** were characterized by comparison of their spectroscopic data with those previously described [11–16]. The NMR spectra are included in the Supporting Information. The structures of compounds **2**, **3**, and **5** were confirmed unambiguously by an X-ray crystallographic analysis (► Fig. 2). It is worth mentioning that this is the first report of crystallographic data of quinolactacin-type alkaloids and clearly confirmed that alkaloids **2** and **3** undergo C-3 epimerization. The epimeric mixture was inseparable by conventional methods; all attempts to separate the pure compounds failed due to their rapid interconversion, such that each compound became contaminated with the other. Furthermore, a mixture of **2** and **3** decomposed to compound **5**. This trend of effects has been reported previously [17]. On the other hand, it was observed that in a solution, benzomalvin A (**1**) exists as a mixture of two conformers (**1a** and **1b**) at room temperature in a 4:1 ratio. This comportment was observed after a few hours of standing in solution and was maintained constant over the days. The conformational dynamic behavior of compound **1** was extensively investigated by Sugimori and coworkers [18]. In previous studies, both conformers **1a** and **1b** were designated with different trivial names, i.e., benzomalvins A and D, respectively, probably because during the first description of **1a** and **1b**, such conformational interconversion was not readily anticipated from a cursory examination of their structures [11, 12]. Therefore, to avoid confusion, throughout this work, when referred to the isolated compound from *P. spathulatum*, the name of benzomalvin A (**1**) will be used, with the understanding that in solution, compound **1** is an equilibrated mixture of **1a** and **1b**.

Compound **7** was isolated as an optically active amorphous red solid. Its molecular formula was determined as $C_{17}H_{14}O_6Cl$ from HRESIMS (found m/z 349.0457 $[M + H]^+$, calcd. 349.0473). The presence of one chlorine atom in the molecule was consistent with the relative abundance of the $[M + H + 2]^+$ peak with respect to the pseudomolecular ion $[M + H]^+$ in the HRESIMS (Fig. 18 S, Supporting Information). The 1H and ^{13}C spectra (► Table 1) revealed the presence of two conjugated ketone carbonyls, one methyl, one methylene, and one secondary carbinol groups; in addition, 12 aromatic carbons (three of which were protonated) were observed. These spectroscopic features suggested that **7** had the same anthraquinone skeleton as found in nalgiolaxin [19, 20]. The position of substituents on the anthraquinone core was initially established by the analysis of 2D NMR spectra (► Table 1 and Figs. 11 S–14 S, Supporting Information). In addition, to confirm the position of the chlorine atom along the anthraquinone core, calculations of 1H chemical shifts were performed using the density functional theory (DFT) at the B3LYP/6–311+G(2,d,p)

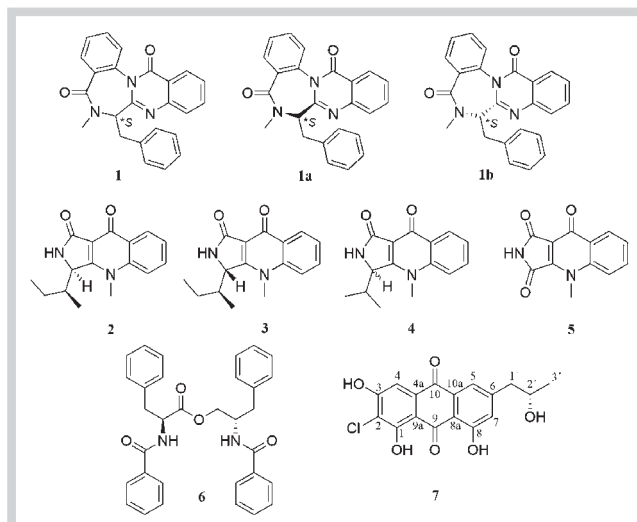


Fig. 1 Chemical structures of isolated compounds from *P. spathulatum*: benzomalvin A (**1**), quinolactacins A1 (**2**), A2 (**3**) and B (**4**), quinolonimide (**5**), asperphenamate (**6**), and 2-chloro-6-[2'(*S*)-hydroxypropyl]-1,3,8-trihydroxy-anthraquinone (**7**).

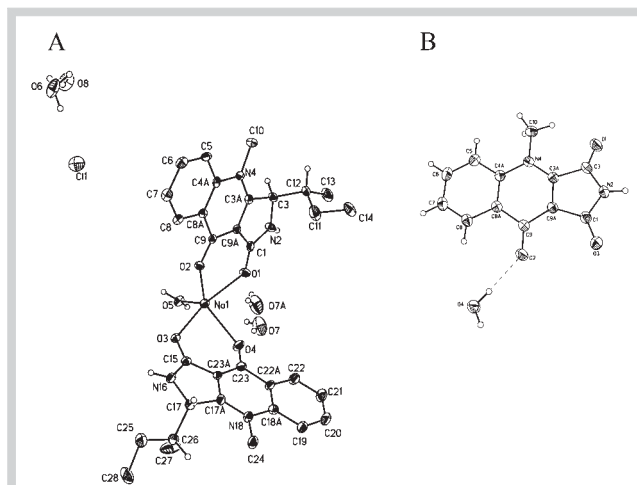


Fig. 2 ORTEP depiction for the X-ray crystal structures of the co-crystallization of **2** and **3** (A), and of compound **5** (B).

level. The calculated data were next compared with the experimental parameters, and according to the results (Table 3 S, Supporting Information), the Boltzmann-weighted 1H chemical shifts calculated for the *S* enantiomer were in agreement with the proposed planar structure of **7** since the mean absolute error (MAE) value was < 0.10 ppm [21, 22]. The absolute configuration at C-2' was established by means of optical rotation calculations at the B3LYP/DGDZVP level of the two possible enantiomers (*R* and *S*). The results revealed that the absolute configuration at C-2' was *S* since the experimental optical rotation value ($[\alpha]_D^{20} + 51.5$, c 0.007, MeOH) matched with the calculated value for the *S* enantiomer ($[\alpha]_D + 48.4$, MeOH), and the sign of the optical rotation reported for the dechloro derivative (+)-2'*S*-isorhodoptilometrin [23]. The value calculated for the *R* enantiomer was opposite in magnitude and sign ($[\alpha]_D - 52.9$, MeOH). Thus, compound

7 was characterized as 2-chloro-6-[2'(S)-hydroxypropyl]-1,3,8-trihydroxy-antraquinone.

All compounds were tested against yeast α -glucosidase, but only compound **1**, the epimeric mixture of **2** and **3**, and compounds **4** and **6** inhibited the enzyme in a concentration-dependent manner (IC_{50} values of 383.2, 273.3, 57.3, and 8.3 μ M, respectively). Compounds **1–4** and **6** were more potent than acarbose (IC_{50} = 659.3 μ M), used as a positive control. It is worth noting that compound **5**, which was confirmed to be the decomposition product of compounds **2**, **3**, and **4** [17], was inactive as an α -glucosidase inhibitor in this test. This instability precludes any further studies with these compounds. On the other hand, compounds **1** and **6** were also tested against rat small intestine α -glucosidases. Both samples induced a ~30% inhibition when tested at 630.3 and 454.0 μ M, respectively; nevertheless, the IC_{50} values could not be determined due to the low water solubility of the samples.

In order to confirm the α -glucosidase inhibitory activity *in vivo* of benzomalvin A (**1**), an oral sucrose tolerance test (OSTT) was performed, considering that it was not cytotoxic to human gingival fibroblasts (HGFs; IC_{50} = 54.5 \pm 3.3 μ M), using a cell-based assay as described in the experimental section. Compound **6** was not further tested due to its known cytotoxic effects and because of the scarcity of the sample [24]. The OSTT can measure the intestinal α -glucosidase inhibition through the decrease of postprandial glucose uptake after an oral administration of sucrose (3.0 g/kg). Two groups of animals were used, healthy and hyperglycemic mice. The hyperglycemia condition was induced by treating mice with nicotinamide (NA, 50 mg/kg) and, 15 min later, with streptozotocin (STZ, 130 mg/kg). The pretreatment with NA provokes partial protection to pancreatic β -cells from the cytotoxic action of STZ by scavenging free radicals and creates a hyperglycemic state close to T2DM [25]. Compound **1** was evaluated at doses of 3.1, 10, and 31.6 mg/kg, and the results (Fig. 3) revealed that **1** decreased blood glucose levels 30 min after oral administration of sucrose in healthy mice at all tested doses (compared to control group, $p < 0.05$). In nicotinamide-streptozotocin (NA-STZ) hyperglycemic mice, only the dose of 10 mg/kg provoked a significant decrease of the postprandial peak ($p < 0.05$). The extent of the inhibition was comparable to that of acarbose, used as a positive control.

Ligand docking has been successfully used at different stages of the drug discovery process, in particular, for predicting the probable binding mode of active ligands to a protein [26]. Therefore, docking studies were performed with compound **1** using the crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* [27], human N-terminal sucrose-isomaltase [28], human N-terminal maltase-glucoamylase [29], and human C-terminal maltase-glucoamylase [30] obtained from the Protein Data Bank [31] with the codes 3A4A, 3LPP, 2QMJ, and 3TOP, respectively. According to a conformational search carried out with compound **1**, the lowest energy conformers of **1a** and **1b** were used with estimated energy values of 96.5 and 98.3 kcal/mol, respectively. Both conformers were fully optimized at the B3LYP/DGDZVP level for docking studies. The results predicted that **1a** and **1b** bind to yeast isomaltase (3A4A) in a different location than acarbose (Fig. 4A). In the case of conformer **1a**, hydrophobic interactions with aminoacids Gly564, Pro567, Lys568, and Lys373, and one π - π interaction between Phe563 and the quinazolino ring of **1a** were observed (Fig. 4B). For conformer **1b**, there were hydrophobic interactions with the following amino

Table 1 1H and ^{13}C NMR data of compound **7**.

Position	δ_C	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
1	160.3	–		
2	113.9	–		
3	162.1	–		
4	108.2	7.18 (s)		C-2, C-9a, C10
4a	132.5	–		
5	120.9	7.53 (s)	H-7	C-10, C-8a, C-7, C-1'
6	149.8	–		
7	124.7	7.07 (s)	H-5	C-8, C-8a, C-5, C-1'
8	162.1	–		
8a	113.7	–		
9	190.4	–		
9a	109.0	–		
10	181.3	–		
10a	133.0	–		
1'	45.2	2.73 (m)	H-2'	C-5, C-6, C-7, C-2'
2'	67.6	3.97 (m)	H-1', H-3'	C-6
3'	22.0	1.16 (d, 6.2)	H-2'	C-1', C-2'

Data recorded in Methanol- d_4 at 500 MHz for 1H and 125 MHz for ^{13}C NMR. All data in ppm

acids: Lys569, Gly564, Glu497, Asn565, and Phe563 as well as hydrogen bonds with Lys568 and Lys373 (Fig. 4C).

For human enzyme 3LPP, docking results predicted that **1a** and **1b** bind to the catalytic domain in the same site as the co-crystallized competitive inhibitor kotalanol (Fig. 5A), showing hydrophobic interactions with the aminoacids Trp435, Phe479, Arg555, Met473, Phe604, Asp571, Trp327, Leu233, and Ser631 for **1a**, and Trp435, Phe479, Gln232, Lys509, Asp231, Phe604, Asp571, Trp327, Ser631, and Leu233 for **1b**. For enzyme 2QMJ, **1a** and **1b** bind to the same pocket as the co-crystallized ligand acarbose (Fig. 5B) with hydrophobic interactions with residues Tyr605, Phe450, Trp406, Asp542, Asp443, Arg526, Asp327, Tyr299, Phe575, and Gln603 for **1a**, and Phe450, Lys480, Asp203, Asp542, Met444, Phe575, Trp406, and Arg526 for **1b**. Finally, for enzyme 3TOP, docking results predicted that only **1a** binds to the same pocket of acarbose as the co-crystallized ligand (Fig. 5C) with hydrophobic interactions between Asp1157, Phe1427, Phe1559, Asp1526, Phe1560, Thr1586, Pro1159, Trp1369, and Lys1460.

It should be pointed out that docking studies for predicting the putative binding mode of a ligand to a protein are not always conclusive. There are a few reasons, including inaccuracies in the energy models used to score potential ligand/protein complexes, and the failure of current methods to account for the conformational changes that take place during the binding process, not only for the ligand, but also for the protein. Furthermore, predicting receptor structural rearrangements is a very complex problem that has not been solved [26].

Benzomalvins are a rare class of bioactive alkaloids having a unique quinazolino-benzodiazepine-dione ring skeleton. Previously, Sun and coworkers demonstrated that benzomalvin A (**1**) showed inhibitory activity *in vitro* against substance P with K_i values of 12, 42, and 43 μ M at the guinea pig, rat, and human neurokinin receptors (NK1), respectively [11]. Since these receptors are involved in pain transmission and neurogenic inflammation, it is highly possible that **1** possesses antinociceptive and/or antihyperalgesic properties. Thus, to partially answer this question, compound **1** was tested for its antihyperalgesic activity in NA-STZ hyperglycemic mice, considering that hyperalgesia is

one of the sensory abnormalities observed in cases of diabetic neuropathy [32]. Treatment of NA-STZ hyperglycemic mice with formalin solution (1%, *i.pl.*) provided a suitable hyperalgesic condition; a clear increment in the response to chemical stimuli was noticed when compared with the formalin-treated (2%) normal mice group. Formalin-induced hyperalgesic behavior exhibited a biphasic pattern (● Fig. 6A). The initial acute response (phase I) lasting 0–10 min was followed by a relatively quiescent period, and a subsequent late response (phase II) lasting 10–30 min. Pre-treatment (–30 min) with **1** significantly ($p < 0.05$) reduced formalin-induced hyperalgesic behavior during phase I at the dose of 31.6 $\mu\text{g/paw}$ (● Fig. 6B), and during phase II at the doses of 10 and 31.6 $\mu\text{g/paw}$ (● Fig. 6C). Gabapentin (GBP) was used as a positive control in this test. In another set of experiments, it was found that when the NA-STZ hyperglycemic mice were pre-treated with the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil (6 $\mu\text{g/paw}$), there was no reduction of the antihyperalgesic effect (Fig. 19S, Supporting Information) of **1** (31.6 $\mu\text{g/paw}$). These results ruled out the classic benzodiazepine-GABA_A receptor as the molecular target of the quinazolinobenzodiazepinedione. Further work is necessary to establish the *in vivo* mode of action of this interesting alkaloid.

In summary, this study revealed that benzomalvin A (**1**) is a new lead for the development of new antidiabetic compounds with α -glucosidase inhibitory activity. In addition, the antihyperalgesic effect *in vivo* demonstrated in this work for **1** supports the potential of quinazolinobenzodiazepines for pain control. Finally, the chemical profile of the isolate *P. spathulatum* analyzed in this investigation is consistent with the findings of Frisvad et al. [9].

Materials and Methods

Reagents

p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG, $\geq 99\%$), STZ ($\geq 98\%$), nicotinamide (NA, $\geq 98\%$), acarbose ($\geq 95\%$), GBP ($\geq 98\%$), flumazenil (FLU, $\geq 99\%$), sucrose (ACS reagent), *S. cerevisiae* α -glucosidase, and intestinal acetone powder from the rat were purchased from Sigma. Formaldehyde solution (37%) was purchased from J.T. Baker.

General experimental procedures

Melting point was determined on a Fisher-Johns apparatus and is uncorrected. IR spectra were obtained on a PerkinElmer 400 FT-IR spectrophotometer. Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a PerkinElmer model 343 polarimeter at 20°C. 1D and 2D NMR spectra were recorded on a Varian Inova spectrometer at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C) or a Varian Inova spectrometer at 500 MHz (¹H) and 125 (¹³C); spectra were recorded using deuterated solvents and tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. HRESIMS spectra were obtained using a Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL mass spectrometer in the positive and negative ionization modes. HPLC was carried out on a Waters system equipped with a 2535 pump and a 2998 photodiode array detector; data acquisition and management of chromatographic output were performed with the Empower 3 software (Waters). For preparative HPLC, a Gemini (C18, 5 μm , 21.2 \times 250 mm; Phenomenex) column was used. Reagent grade dichloromethane, *n*-hexane, methanol, and HPLC grade acetonitrile and methanol (J.T. Baker) were regularly used in the extraction and isolation procedures. Silica gel 60 (70–230 mesh; Merck) and Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech)

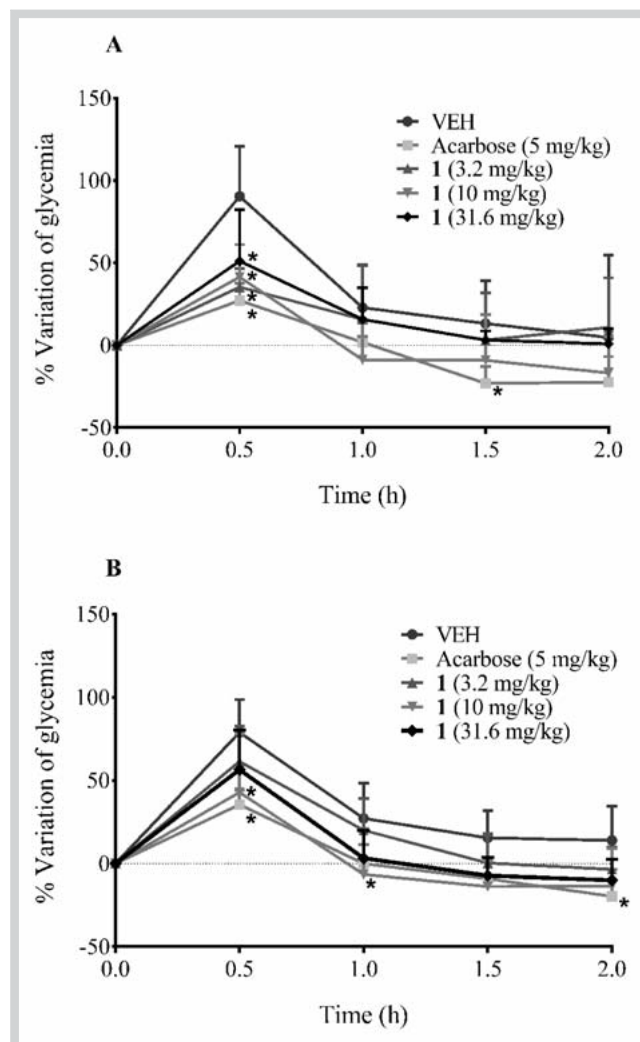


Fig. 3 Effect of benzomalvin A (**1**) on blood glucose levels during an OSTT in normal mice (A) and NA-STZ hyperglycemic mice (B). VEH: vehicle. Each point represents the mean \pm SD for six mice in each group. * $P < 0.05$ significantly different two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparison with respect to vehicle-treated group at the same time.

were used for column chromatography (CC). TLC analyses were performed on precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using different mobile phases, and visualization of the plates was carried out using Dragendorff reagent or Ce₂(SO₄)₃ (10%) solution in H₂SO₄ and heating.

Isolation and identification of *Penicillium spathulatum*

Samples of fresh bat dung were collected aseptically from two locations throughout the Chontalcoatlán cave in the State of Guerrero, Mexico (18°38' 52" N, 99°31' 4" W), in February 2013, using sterile glass tubes and a spatula. The samples were vortexed with 3 mL of sterile water, and 0.5 mL of the supernatant was directly plated on water-agar medium (39 g of agar in 1 L of distilled water) or potato dextrose agar (PDA; Difco). Both media were amended with streptomycin sulfate (30 mg/L) and rose bengal (50 mg/L). Agar plates were incubated aerobically at room temperature until the presence of fungal single colonies was observed. Colonies were transferred and purified on new PDA medium plates. One of the isolates was accessioned as B35 and is preserved in the Department of Pharmacy culture collection at

the Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

For molecular identification of the fungal strain B35, the complete internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2, and the 5.8 S ribosomal DNA were amplified with primers ITS5 and ITS4 [33,34] by PCR using puReTaq® Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences Corp.). The DNA extraction, PCR amplification, sequencing protocols, and phylogenetic analysis were accomplished using methods described previously [21,35,36]. Based on the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of NCBI's GenBank nucleotide database, the closest hits (99%) using the ITS region were members of *P. spathulatum* [GenBank JX313157 (CBS 116972); Identities = 493/494 (99%), Gaps = 0/494 (0%); *P. spathulatum* [GenBank JX313162 (CBS 116977); Identities = 492/494 (99%), Gaps = 0/494 (0%)]. Our ITS sequence from strain B35 was also 99% similar to a sequence of *P. spathulatum* (CBS 117192) obtained from the ex-type culture [9].

In addition to the ITS region, the ribosomal polymerase II subunit 2 (*RPB2*) gene was used to obtain a species level identification of strain B35 based on recommendations provided by Peterson that ITS barcodes may be problematic and not yield an accurate species level identification for members of the genus *Penicillium* [37]. The *RPB2* gene has been used previously for inferring species-level phylogenetic relationships and identifications of *Penicillium* sp. [9,21,38] as a number of type sequences from published taxonomic and phylogenetic studies are available in GenBank for comparison. A portion of the partial *RPB2* gene was sequenced using primers RPB2-5f and RPB2-7cR [39] and PCR conditions outlined previously with some modifications [40]. The PCR reaction was carried out in 25 μ L containing 5 μ L template DNA, 2.5 μ L BSA (New England Bio Labs Inc.), 2.5 μ L 50% DMSO (Sigma), and 1 μ L of each 10 μ M forward (RPB2-5F) and reverse (RPB2-7cR) primer. The rest of the volume was made up to 25 μ L by adding molecular biology grade H₂O (Fisher Scientific). Bidirectional Sanger sequencing of the purified PCR products was performed at Eurofins Genomics (<http://www.operon.com/default.aspx>) using BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing. Sequences were edited using Sequencher 5.2.3 (Gene Codes Corp.). A BLAST search performed with *RPB2* sequences retrieved a high-scoring similarity of 97% with *P. spathulatum* [GenBank JN406636 (CBS 117192); 686/707 (97%), Gaps = 0/707 (0%)]. For phylogenetic analysis, a data matrix of *RPB2* sequences was reconstructed using *Penicillium* spp. from a recent study describing *P. spathulatum* [9]. Multiple sequence alignment and maximum likelihood (ML) analysis were employed using methods outlined previously [41]. Based on the results of phylogenetic analysis of *RPB2* sequences, strain B35 forms a strongly supported (100% RAxML bootstrap) monophyletic group with the type strain of *P. spathulatum* (CBS 117192) within the section *Brevicompecta* [9] (Fig. 20 S, Supporting Information). Therefore, based on the results of both ITS barcoding and ML analysis using *RPB2* gene sequences, it was concluded that strain B35 was *P. spathulatum* (Eurotiales, Trichocomaceae, Ascomycota). The sequence data have been deposited in GenBank (ITS: KX156615; RPB2: KX138224, KX138225).

Fermentation, extraction, and isolation

Seed cultures of *P. spathulatum* B35 (15 mL) grown for one week on potato dextrose broth (Difco) were used to inoculate five Fernbach flasks containing 200 g of moist rice. Fermentation was carried out at room temperature for 40 days. The solid cultures were extracted exhaustively with CH₂Cl₂-MeOH (8:2). The

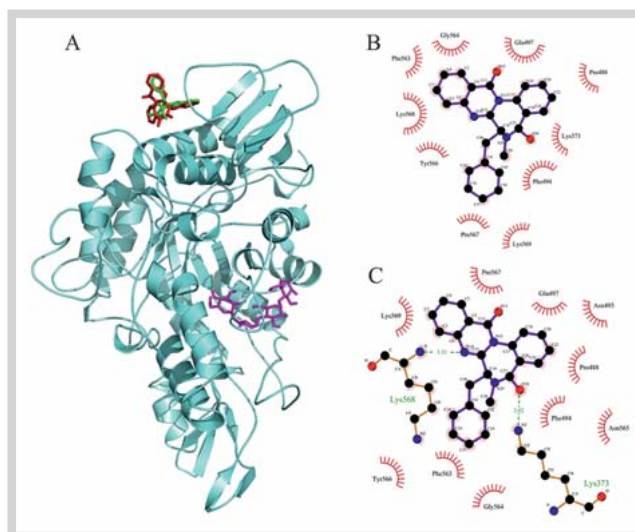


Fig. 4 Structural model of the complex of acarbose (pink sticks), **1a** (green sticks), and **1b** (red sticks) with yeast α -glucosidase (A). 2D model of interactions of **1a** (B) and **1b** (C) with amino acids of yeast α -glucosidase. (Color figure available online only.)

cultures were decanted and the extracts were combined and filtered. The combined filtrate was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure to produce 16 g of a blackish residue. The latter was subsequently extracted with 200 mL of MeOH-MeCN (1:1) and *n*-hexane (3 \times 100 mL). The biphasic solution was transferred to a separation funnel and shaken vigorously. The MeOH-MeCN layer was drawn off and evaporated to dryness under vacuum to yield 5.5 g of a defatted fraction. Of this fraction, 5.4 g were subjected to silica gel CC (4.8 \times 40 cm; CH₂Cl₂-MeOH 100:1 \rightarrow 1:100) to generate 10 fractions (Fr. I-X). From Fr. II precipitated a pale yellow solid with *n*-hexane. The resolution of this precipitate (500 mg) by preparative RP-HPLC eluted with MeCN-H₂O (80:20) at a flow rate of 21.24 mL/min led to the isolation of **1** [**1a** (t_R = 5.8 min) and **1b** (t_R = 4.9 min)] as an inseparable conformational mixture (150 mg) and asperphenamate (**6**, 15 mg, t_R = 7.5 min); it is important to mention that **1a** and **1b**, once purified, reformed into a mixture containing both conformers in a 4:1 ratio. Fr. V (25 mg) was chromatographed on Sephadex LH-20 CC (1.7 \times 45 cm) eluted with MeOH-CH₂Cl₂ (9:1) to yield 5 mg of compound **7**. The fractionation of Fr. VIII (450 mg) with Sephadex LH-20 CC (2.5 \times 50 cm) eluted with MeOH-CH₂Cl₂ (9:1) yielded compounds **2** and **3** (epimeric mixture, 80 mg) and **5** (20 mg), which crystallized spontaneously. Finally, (50 mg) compound **4** (racemate, 15 mg) was separated from Fr. IX by silica gel CC (1.7 \times 45 cm) eluting with CH₂Cl₂ with increasing amounts of MeOH (100:0 \rightarrow 0:100).

2-Chloro-6-[2'(S)-hydroxypropyl]-1,3,8-trihydroxy-anthraquinone (**7**): amorphous red solid (MeOH); m.p. 194 $^{\circ}$ C; R_f 0.45, silica gel 60 F₂₅₄, CH₂Cl₂/MeOH (90:10); $[\alpha]_D^{20}$ +51.5, (c 0.007, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) nm: 218.5 (4.26), 256.5 (3.99), 308.5 (3.85) and 433 (3.5) nm; IR (ATR) ν_{max} 759, 1008, 1256, 1381, 1622, and 2920 cm⁻¹; ¹H NMR and ¹³C NMR see Table {V1}; HR ESIMS m/z 349.0457 [M + H]⁺ (calcd. for C₁₇H₁₄O₆Cl 349.0473).

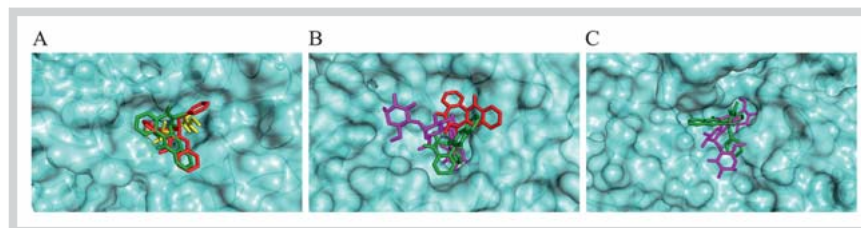


Fig. 5 Structural model of the complex of kotalanol (yellow sticks), **1a** (green sticks), **1b** (red sticks), and acarbose (pink sticks) with human N-terminal sucrose-isomaltase (A); human N-terminal maltase-glucoamylase (B); and human C-terminal maltase-glucoamylase (C). (Color figure available online only.)

X-ray crystal structure analysis

X-ray diffraction data were collected on a Bruker D8 Venture diffractometer with Cu K α radiation. The structures were solved by the SHELXS-2013 method and refined using full-matrix least-squares on F^2 . Suitable crystals of **2/3** and **5** were obtained by evaporation of CH₂Cl₂-MeOH (9:1). Crystallographic data for **2/3** and **5** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) with the accession nos. 1475815 and 1475814, respectively. These data are available, free of charge, from the CCDC via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. Crystal data for **2/3**: C₃₂H₄₂ClN₄NaO₈, H₂O, $M = 669.13$, triclinic, space group P-1 with $a = 11.0143(13)$ Å, $b = 11.7181(14)$ Å, $c = 13.4538(17)$ Å, $\alpha = 85.899(3)^\circ$, $\beta = 83.045(3)^\circ$, $\gamma = 74.322(3)^\circ$, $V = 1658.2(3)$ Å³, $Z = 2$, $T = 150(2)$ K, $D_c = 1.340$ Mg/m³, $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.184$ mm⁻¹, $F(000) = 708$, 26718 reflections collected, 5981 independent reflections ($R_{int} = 0.0963$). The final R_1 values were 0.0763 [$I > 2\sigma(I)$]. The final wR_2 (F^2) values were 0.1656 [$I > 2\sigma(I)$]. The final R_1 values were 0.1154 (all data). The final wR_2 (F^2) values were 0.1832 (all data).

Crystal data for **5**: C₁₂H₈N₂O₃, H₂O, $M = 246.22$, monoclinic, space group P2₁/n with $a = 8.2025(3)$ Å, $b = 7.4003(3)$ Å, $c = 17.7053(6)$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 103.1508(13)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1046.54(7)$ Å³, $Z = 4$, $T = 296(2)$ K, $D_c = 1.563$ Mg/m³, $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 1.012$ mm⁻¹, $F(000) = 512$, 12449 reflections collected, 1910 independent reflections ($R_{int} = 0.1125$). The final R_1 values were 0.0396 [$I > 2\sigma(I)$]. The final wR_2 (F^2) values were 0.1027 [$I > 2\sigma(I)$]. The final R_1 values were 0.0450 (all data). The final wR_2 (F^2) values were 0.1092 (all data).

α -Glucosidase inhibition assay

Yeast α -glucosidase was prepared at 1 U/mL in phosphate buffer (PBS, 100 mM, pH 7). The mammalian enzyme was prepared from intestinal acetone powder from the rat (40 mg) by sonication (10 min) with 1 mL of ice-cold PBS and centrifugation at 6400 rpm for 10 min. The supernatant was recovered and used for the *in vitro* assay. Fungal extract, fractions, and isolated metabolites were dissolved in MeOH. Aliquots of 1–10 μ L of the testing matter were incubated for 10 min with 10 μ L of yeast enzyme stock solution or 20 μ L of mammalian enzyme. After incubation with enzymes, 10 μ L of substrate pNPG (5 mM for yeast or 10 mM for mammalian enzyme, in PBS) were added and incubated at 37 °C for 20 min. The final volume of the reaction mixture was 100 μ L per well. Absorbance at 405 nm was measured in a BIO-RAD 96-well microplate reader model 680. Three replicates were made for each assay. The inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the negative control. The concentration required to inhibit the activity of enzymes by 50% (IC₅₀) was calculated with a nonlinear fitting analysis using Origin 8.0 software.

Experimental animals

All animal assays were conducted in agreement with the Mexican Official Norm for animal care and handling (NOM-062-ZOO-1999) and were approved by the local ethical committee (FQ/CICUAL/132/16 and FQ/CICUAL/136/16; both protocols were approved on March 8, 2016). Male ICR mice, weighing 20–25 g, were purchased from Envigo (Envigo RMS). The animals were contained in groups of 10 under standard laboratory conditions (12-h light/12-h dark cycle under a controlled temperature, 22 \pm 1 °C) and maintained on a standard pellet diet and water *ad libitum*.

Nicotinamide-streptozotocin experimental-induced type 2 diabetes mellitus in mice

Induction of hyperglycemia in mice was achieved by a single *i.p.* administration of NA (50 mg/kg) in saline solution (SS) followed by *i.p.* administration of STZ (130 mg/kg) in citrate buffer (0.1 M, pH 4.5) 15 min latter. After seven days, blood glucose levels were determined and mice with ≥ 200 mg/dL were considered hyperglycemic and selected for the study [25].

Oral sucrose tolerance test

Freshly prepared sucrose solution in SS was used for the carbohydrate tolerance test. Compound **1** was suspended in SS with 0.05% of Tween 80 (vehicle) and sonicated for 10 min. Acarbose (5 mg/kg) was prepared in SS and was used as a positive control. The control group received only vehicle. All animals were orally administrated. Blood samples were obtained from the caudal vein by means of a small incision at the end of the tail. Blood glucose levels (mg/dL) were measured by the enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson).

Both types of mice, healthy and NA-STZ hyperglycemic, were placed in containing boxes forming groups of six animals. Group 1 was administrated with the vehicle, group 2 with acarbose, and groups 3 to 5 received **1** at different doses (3.2, 10, and 31.6 mg/kg). Basal blood glucose levels were measured before treatments (0 min). Thirty min after treatment administration, a sucrose load (3.0 g/kg) was given to the animals. Blood glucose levels were measured at 30, 60, 90, and 120 min after the sucrose load. The variation of glycemia (%) was calculated with respect to the initial (0 h) glucose level according to the following equation:

$$\% \text{ Variation of glycemia} = (G_t/G_i) \times 100$$

where G_i is the initial glycemia value and G_t is the glycemia value after treatment.

Formalin-induced hyperalgesia in nicotinamide-streptozotocin hyperglycemic mice

Hyperalgesia in NA-STZ hyperglycemic mice (two weeks) was achieved using the formalin test. Animals were placed in open plastic cylinders for 30 min at 25 °C to acclimatize, then 40 μ L of formalin solution (formaldehyde at 1.0% in SS) were adminis-

trated subcutaneously into the dorsal surface of the right paw. The animals were returned to the cylinder and observed immediately after formalin injection. Hyperalgesic behavior was quantified as the licking or biting time of the injected paw during 5-min periods up to 30 min after injection. Treatments were administered subcutaneously 30 min before formalin injection. NA-STZ hyperglycemic mice were placed in containing boxes forming groups of six animals. Group 1 was administrated with SS, group 2 with GBP (31.6 $\mu\text{g/paw}$ in SS) and groups 3 to 5 received **1** at different doses (3.2, 10, and 31.6 $\mu\text{g/paw}$ in SS). Area under the curve (AUC) for phase I (0–10 min) and phase II (10–30 min) was calculated by means of the trapezoidal rule.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SD of six animals in each group. Statistical significance differences were ascertained by means of two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for temporal courses to analyze the antihyperglycemic effect, while one-way ANOVA followed by Dunnett's tests was used for concentration-response curves to analyze the antihyperalgesic effect. $P < 0.05$ was considered to be significant. GraphPad Prism 6 software was used for data analysis.

Cell viability assay

Human gingival fibroblast (HGFs) were obtained from a healthy patient from Facultad de Odontología, UNAM, with non-inflamed gingiva, with their consent. HGFs were cultured and maintained as previously described [42]. The cells were cultured in a monolayer to the first passage and then treated with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA for 5 min, collected by centrifugation, washed, and suspended in PBS containing 1% FBS. The HGFs were regulated at 3×10^3 cells/100 μL and were pipetted into a 96-well microplate. After incubation for 24 h, the culture medium was changed to a medium with different concentrations of compound **1** (1–100 μM). The viability of the fibroblasts was analyzed at 96 h after the addition of media with and without the compound at different concentrations. The culture medium containing the compound was removed, the cells were washed with a solution of saline phosphate, and dried to analyze them. Cell viability was assessed using the MTT dye procedure according to a standard protocol [43]. Six replicates were performed in each test. Cytotoxicity was rated on % of cell viability relative to the control. The CI_{50} (value at which 50% of cell viability was observed) was calculated from this data. Compound **1** showed a CI_{50} of 54.5 ± 3.3 μM .

^1H and ^{13}C chemical shift and optical rotation calculations

Minimum energy structures for each candidate molecule were built with Spartan'10 software (Wavefunction, Inc.). A conformational search was performed with the Monte Carlo search protocol as implemented in the same software under the MMFF molecular mechanics force field. The resulting library of conformers within an energy window of 5 kcal/mol was subjected to geometry optimization and frequency calculation by using DFT at the B3LYP/DGDZVP or B3LYP/6–311+G(2 d,p) level of theory for prediction of optical rotations and chemical shifts, respectively, employing Gaussian 09 software (Gaussian, Inc.). NMR isotropic shielding constants were computed for each conformer using the GIAO (gauge-independent atomic orbitals) method with the same program at the B3LYP/6–311+G(2 d,p) level. To address solvation, the integrated equation formalism polarized continuum model (IEFPCM) was used. Isotropic shielding constants for each

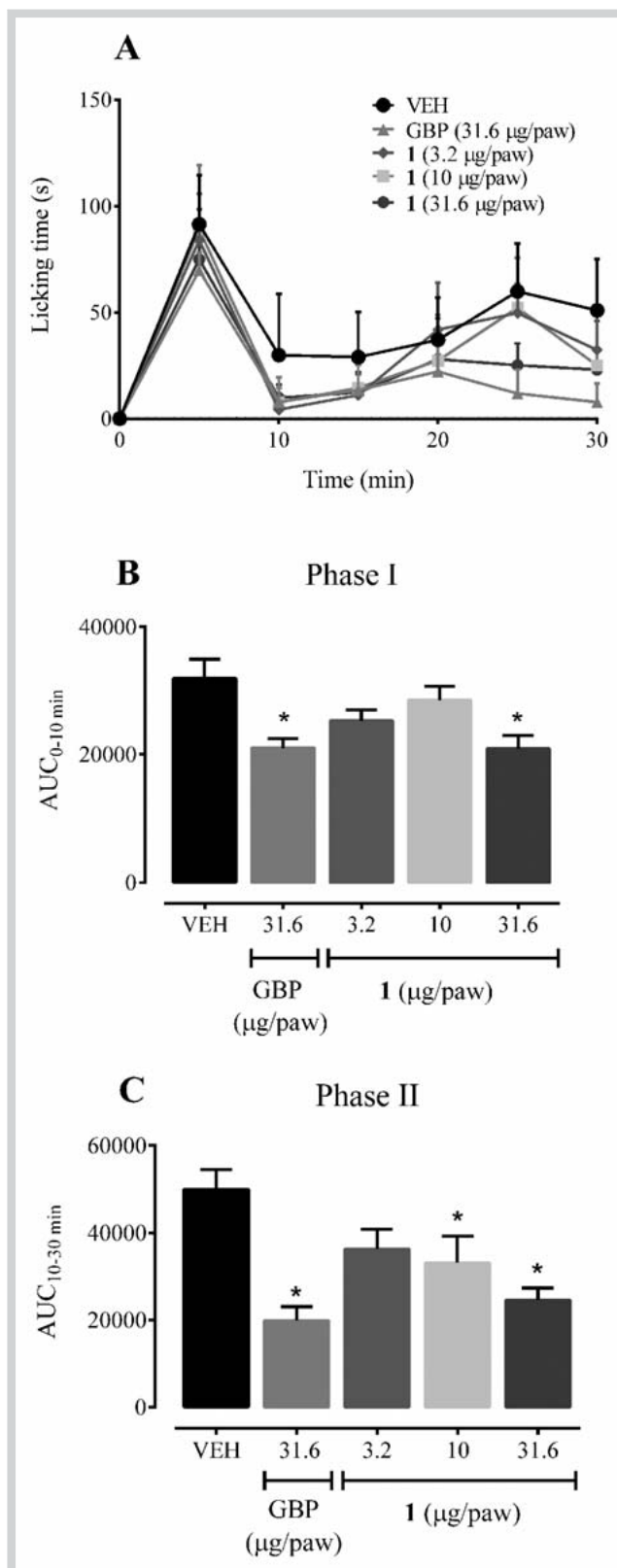


Fig. 6 Antihyperalgesic effect of benzomalvin A (**1**) on NA-STZ hyperglycemic mice in the formalin test. Temporal course of licking time; each point represents the mean \pm SD for six mice in each group (A). AUC (area under the curve) during phases I (B) and II (C). * $P < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparison. VEH: vehicle; GBP: gabapentin.

nucleus in all conformers were Boltzmann-weighted and then converted to empirically scaled chemical shift values applying reference factors (slope and intercept) [22]. Each set of computed data was compared with the experimental data of **7** and the MAE was determined [21]. The studies for prediction of theoretical optical rotation were achieved at the B3LYP/DGDZVP level in MeOH and the obtained Boltzmann-weighted value was compared to the experimental optical rotation of **7**. All calculations were carried out on the Miztli supercomputer at the Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.super.unam.mx/>).

Docking studies

The crystallographic structures of the selected hydrolases (3LPP, 3TOP, 3A4A, and 2QMJ) were obtained from the Protein Data Bank [31]. The addition of polar and nonpolar hydrogen atoms, Kollman charges, and solvation parameters to the proteins were performed with the AutoDock Tools 1.5.6 package (<http://mgtools.scripps.edu>). Fully optimized structures with Gaussian 09 software at the B3LYP/DGDZVP were prepared by adding Gasteiger atomic charges and setting the number of torsions using AutoDock Tools. Docking studies were accomplished using the AutoDock Vina 1.1.2 program [44]. Default parameters of exhaustiveness and number of modes were not altered. Initially a blind docking was conducted with a grid box size covering the entire protein. Then, a refinement procedure was carried out with the center of the grid box corresponding to the ligand at the pose with the minimum energy obtained in the blind docking. The docking results were analyzed with AutoDock Tools, PyMOL (<https://www.pymol.org/>), and LigPlot Plus (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) software.

Supporting information

Spectroscopic data of compounds **1–4**, **6**, and **7**, and experimental details are available as Supporting Information.

Acknowledgments

▼ This research was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 219765). We thank I. Rivero, A. Madariaga, S. Hernández, M. Macías, R. Del Carmen, R. Del Villar, M. Gutierrez, and G. Duarte for their valuable technical assistance. We are indebted to Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to perform the computational calculations through the Miztli supercomputing system. P. Del Valle acknowledges a fellowship from CONACyT (234569) to pursue graduate studies. A.L. Martínez acknowledges a fellowship from DGAPA-UNAM to pursue a postdoctoral stay at UNAM.

Conflict of Interest

▼ The authors declare no conflict of interest.

References

- DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, Hu FB, Kahn CR, Raz I, Shulman GI, Simonson DC, Testa MA, Weiss R. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Disease Primers* 2015; 1: 1–22
- DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009; 58: 773–795
- Israïli ZH. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Ther* 2011; 18: 117–152
- Patel SS. Cerebrovascular complications of diabetes: alpha glucosidase inhibitor as potential therapy. *Horm Metab Res* 2016; 48: 83–91
- Borges de Melo E, Silveira Gomes A, Carvalho I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 2006; 62: 10277–10302
- Ingavat N, Dobereiner J, Wiyakrutta S, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Aspergillusol A, an α -glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. *J Nat Prod* 2009; 72: 2049–2052
- Rivera-Chávez J, González-Andrade M, González MC, Glenn AE, Mata R, Thielavins A, J and K: α -glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophyte fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 2013; 94: 198–205
- Lui Y, Yang Q, Xia G, Huang H, Li H, Ma L, Lu Y, He L, Xia X, She Z. Polyketides with α -glucosidase inhibitory activity from a mangrove endophytic fungus, *Penicillium* sp. HN29-3B1. *J Nat Prod* 2015; 78: 1816–1822
- Frisvad JC, Houbraken J, Popma S, Samson RA. Two new *Penicillium* species *Penicillium buchwaldii* and *Penicillium spathulatum*, producing the anticancer compound asperphenamate. *FEMS Microbiol Lett* 2013; 339: 77–92
- Oki T, Matsui T, Osajima Y. Inhibitory effect of α -glucosidase, inhibitors varies according to its origin. *J Agric Chem* 1999; 47: 550–553
- Sun HH, Barrow CJ, Sedlock DM, Gillum AM, Cooper R. Benzomalvins, new substance P inhibitors from a *Penicillium* sp. *J Antibiot* 1994; 47: 515–522
- Sun HH, Barrow CJ, Cooper R. Benzomalvin D, a new 1,4-benzodiazepine atropisomer. *J Nat Prod* 1995; 58: 1575–1580
- Kakinuma N, Iwai H, Takahashi S, Hamano K, Yanagisawa T, Nagai K, Tanaka K, Suzuki K, Kirikae F, Kirikae T, Nakagawa A. Quinolactacins A, B, and C: novel quinolone compounds from *Penicillium* sp. EPF-6. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J Antibiot* 2000; 53: 1247–1251
- Takahashi S, Kakinuma N, Iwai H, Yanagisawa T, Nagai K, Suzuki K, Tokunaga T, Nakagawa A. Quinolactacins A, B, and C: Novel quinolone compounds from *Penicillium* sp. EPF-6. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot* 2000; 53: 1252–1256
- Kim WG, Song NK, Yoo ID. Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* 2001; 54: 831–835
- Pomini AM, Ferreira DT, Braz-Filho R, Saridakis HO, Schmitz W, Ishikawa NK, Faccione M. A new method for asperphenamate synthesis and its antimicrobial activity evaluation. *Nat Prod Res* 2006; 20: 537–541
- Clark B, Capon RJ, Lacey E, Tennant S, Hill JH. Quinolactacins revisited: from lactams to imide and beyond. *Org Biomol Chem* 2006; 4: 1512–1519
- Sugimori T, Okawa T, Eguchi S, Kakehi A, Yashima E, Okamoto Y. The first total synthesis of (–)-benzomalvin A and benzomalvin B via the intramolecular aza-Wittig reactions. *Tetrahedron* 1998; 54: 7997–8008
- Raistrick H, Ziffer J. Studies in the biochemistry of micro-organisms. The colouring matters of *Penicillium nalgiovensise* Laxa. I. Nalgiovensin and nalgiolaxin. Isolation, derivatives and partial structures. *Biochem J* 1951; 49: 563–574
- Birch AJ, Stapleford KSJ. The structure of nalgiolaxin. *J Chem Soc C* 1967; 2570–2571
- Willoughby PH, Jansma MJ, Hoye TR. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. *Nat Protoc* 2014; 9: 643–660
- Lodewyk MW, Siebert MR, Tantillo DJ. Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic and synthetic organic chemistry. *Chem Rev* 2012; 112: 1839–1862
- Figueroa M, Jarmusch AK, Raja HA, El-Elimat T, Kavanaugh JS, Horswill AR, Cooks RG, Cech NB, Oberlies NH. Polyhydroxyanthraquinones as quorum sensing inhibitors from the guttates of *Penicillium restrictum* and their analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Nat Prod* 2014; 77: 1351–1358
- Yuan L, Li Y, Zou C, Wang C, Gao J, Miao C, Ma E. Synthesis and *in vitro* antitumor activity of asperphenamate derivatives as autophagy inducer. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 2216–2220
- Masiello P, Christophe B, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 1998; 47: 224–229

- 26 Irwin JJ, Shoichet BK. Docking screens for novel ligands conferring new biology. *J Med Chem* 2016; 59: 4103–4120
- 27 Yamamoto K, Miyake H, Kusunoki M, Osaki S. Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *FEBS J* 2010; 277: 4205–4214
- 28 Sim L, Willemsma C, Mohan S, Naim HY, Pinto BM, Rose DR. Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrose-isomaltase N-terminal domains. *J Biol Chem* 2010; 23: 17763–17770
- 29 Sim L, Quezada-Calvillo R, Sterchi EE, Nichols BL, Rose DR. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *J Mol Biol* 2008; 375: 782–792
- 30 Ren LM, Qin XH, Cao XF, Wang LL, Bai F, Bai G, Shen Y. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein Cell* 2011; 2: 827–836
- 31 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 1999; 28: 235–242
- 32 Peltier A, Goutman SA, Callaghan BC. Painful diabetic neuropathy. *BMJ* 2014; 348: g1799
- 33 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct Sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990: 315–322
- 34 Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993; 2: 113–118
- 35 Raja HA, Kaur A, El-Elimat T, Figueroa M, Kumar R, Deep G, Agarwal R, Faeth SH, Oberlies NH. Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn. (milk thistle). *Mycology* 2015; 6: 8–27
- 36 Raja HA, El-Elimat T, Oberlies NH, Shearer CA, Miller AN, Tanaka K, Hashimoto A, Fournier J. Minutisphaerales (Dothideomycetes, Ascomycota): a new order of freshwater including a new family, Minutisphaeraeaceae, and two new species from North Carolina, USA. *Mycologia* 2015; 107: 845–862
- 37 Peterson SW. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 95: 339–344
- 38 Houbraken J, Samson RA. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Stud Mycol* 2011; 70: 1–51
- 39 Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 1799–1808
- 40 Malkus A, Chang PF, Zuzga SM, Chung KR, Shao J, Cunfer BM, Arseniuk E, Ueng PP. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycol Res* 2006; 110: 1152–1164
- 41 Raja HA, Schoch CL, Hustad VP, Shearer CA, Miller AN. Testing the phylogenetic utility of MCM7 in the Ascomycota. *MycKeys* 2011; 1: 63–94
- 42 Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 2005; 102: 371–376
- 43 Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: the MTT Assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. N.Y.: Humana Press; 2011: 237–245
- 44 Trot O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multi-threading. *J Comput Chem* 2010; 31: 445–461