



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

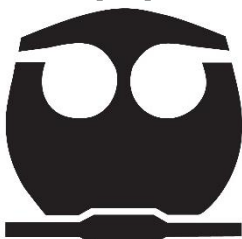
Malbranchea chryso sporoidea Sigler et Carmichael
como fuente de inhibidores de las enzimas alfa-
glucosidasas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ÁNGEL JARED CAMPOS DURÁN



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

VOCAL: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

SECRETARIO: Dr. Abraham Madariaga Mazón

1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2do. SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR:

Dr. Abraham Madariaga Mazón

SUSTENTANTE:

Angel Jared Campos Durán

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
1.1. DIABETES	1
1.1.1. La diabetes: tipos y características.....	1
1.1.2. Panorama actual de la diabetes en México y el mundo.....	3
1.1.3. Tratamiento de la diabetes.....	4
1.2. Generalidades de las enzimas α -glucosidasas	9
1.2.1. Definición de las α -glucosidasas.....	9
1.2.2. Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.....	10
1.3. Productos naturales: Importancia en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.	15
1.4. Género <i>Malbranchea</i>	16
1.4.1. Antecedentes	16
1.5. Metabolitos fúngicos con el núcleo biciclo[2.2.2] diazaoctano	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos generales.....	26
3.2. Objetivos particulares.....	26
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	27
4.1. Obtención del material fúngico.....	27
4.2. Análisis cromatográficos generales	27
4.3. Determinación de las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas	28
4.4. Estudio Químico de <i>M. chrysosporoidea</i>	28
4.4.1. Fermentación de <i>M. chrysosporoidea</i>	28
4.4.2. Obtención del Extracto Orgánico	29
4.4.3. Fraccionamiento biodirigido del EOT de <i>M. chrysosporoidea</i>	29
4.5. Aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de la especie fúngica <i>M. chrysosporoidea</i>	31
Malbranqueamida (32):.....	32
4.6. Ensayos de Actividad Biológica	33
4.6.1. Determinación del efecto del extracto orgánico y de las fracciones sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa.....	33
4.6.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la malbranqueamida en la prueba de tolerancia oral a la sacarosa	33

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 Estudio químico del extracto de <i>Malbranchea chryso sporoidea</i>	35
5.1.1 Aislamiento y purificación de los metabolitos activos	37
5.1.2 Caracterización estructural de la malbranqueamida (32), malbranqueamida B (33), isomalbranqueamida B (34) y premalbranqueamida (35)	37
5.3. Evaluación biológica de los compuestos aislados.....	42
5.3.1. Evaluación <i>in vitro</i> de los compuestos aislados contra las enzimas α -glucosidasas.....	42
5.3.2 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de la malbranqueamida (32) en una prueba oral de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos	48
6. CONCLUSIONES	49
7. PERSPECTIVAS.....	50
8. REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de tipo diels-alder propuesta para formar la estructura del núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano (Williams & Cox 2003).....	23
Esquema 2. Biogénesis propuesta para las malbranqueamidas (Finefield et al. 2012). ...	24
Esquema 3. Obtención del eot de <i>M. chryso sporoidea</i>	29
Esquema 4. Fraccionamiento del EOT de <i>M. chryso sporoidea</i>	30
Esquema 5. Fraccionamiento de la Fx P de <i>M. chryso sporoidea</i>	30
Esquema 6. Fraccionamiento de la Fx P-II de <i>M. chryso sporoidea</i>	31
Esquema 7. Purificación de las malbranqueamidas.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción y acción de la insulina (Atlas de la diabetes, IDF, 2013).....	1
Figura 2. Órganos más afectados en la DM2.	3
Figura 3. Panorama de la prevalencia de la diabetes en el mundo (IDF, 2015).	4
Figura 4. Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas obtenidos de fuentes naturales.....	12
Figura 5. Compuestos con el núcleo característico biciclo[2.2.2] diazaoctano y fuentes de obtención.	20
Figura 6. <i>M. chryso sporoidea</i> (40 días de crecimiento en APD).....	27
Figura 7. Cromatograma de la fracción Fx P-II-I (adquirido a 230 nm).	37
Figura 8. Espectro de ^1H -RMN para la malbranqueamida (32) (400 MHz, CD_3OD).	38
Figura 9. Espectro de ^1H -RMN de los productos 33 y 34 (400 MHz, CD_3OD).	39
Figura 10. Espectro de ^1H -RMN para la premalbranqueamida (35) (400 MHz, CD_3OD). .	39
Figura 11. Vista parcial de la región aromática (6-8 ppm) de los espectros RMN- ^1H de los compuestos 32-35 (* malbranqueamida B e ** isomalbranqueamida B).	40
Figura 12. Reacción enzimática llevada a cabo en el experimento de inhibición de las enzimas α - glucosidasas.....	43
Figura 13. Curva C-R del compuesto 32 en enzima de mamífero.....	44
Figura 14. Curva C-R de los productos 33 y 34 en enzima de mamífero.	44

Figura 15. Curva C-R del compuesto 35 en enzima de mamífero.....	45
Figura 16. Curva C-R del compuesto 32 contra la enzima de levadura.....	46
Figura 17. Curva C-R de los productos 33 y 34 contra la enzima de levadura.....	46
Figura 18. Curva C-R del compuesto 35 contra la enzima de levadura.....	47
Figura 19. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos usados en el tratamiento de la DM2	6
Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados de especies del género <i>malbranchea</i>	17
Tabla 3. Condiciones cromatográficas utilizadas para la resolución de la fracción Fx-P-II-I.	32
Tabla 4. Fraccionamiento secundario del EOT de <i>M. chrysosporoidea</i>	36
Tabla 5. Fraccionamiento terciario de Fx P-II de <i>M. chrysosporoidea</i>	36
Tabla 6. Evaluación de la CI_{50} y % de inhibición de las malbranqueamidas (32-35) utilizando enzimas de raspado intestinal de rata.....	43
Tabla 7. Evaluación de la CI_{50} y % de inhibición de las malbranqueamidas (32-35) utilizando enzimas de levadura.....	45

Abreviaturas

°C	Grado Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
5HP	Hidroxipirazin-2(1H) ona
AcOEt	Acetato de Etilo
CaM	Proteína calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía de capa fina
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cpb	Cuanto baste para
CPD	Cultivo de papa-dextrosa
dL	Decilitros
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestional
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativa
EM	Espectrometría de masas
EOT	Extracto Orgánico Total
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
G	Gramos
GAA	Glucosa anormal en ayunas
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

Hex	Hexano
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IMDA	Reacción intramolecular Diels-Alder
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ITG	Intolerancia a la glucosa
<i>i</i> - α G	Inhibidores de las α -Glucosidasas
kg	Kilogramo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	MegaHertz
min	Minutos
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.f.	Punto de fusión
PDA	Detector en el UV de arreglo de fotodiodos
<i>p</i> -NPG	α -D-glucopiranosido de <i>p</i> -nitrofenol
ppm	Partes por millón
PTSO	Prueba de tolerancia a la sacarosa
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<i>t</i> _R	Tiempo de retención
UPLC	Cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento
λ	Longitud de onda

1. ANTECEDENTES

1.1. DIABETES

1.1.1. La diabetes: tipos y características

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico complejo, el cual se caracteriza por la presencia de concentraciones elevadas de glucosa en sangre, que son el resultado de la incapacidad del cuerpo para producir cantidades adecuadas de insulina; la incapacidad del organismo para utilizar adecuadamente la insulina que se produce; o una combinación de estos factores (Organización Mundial de la Salud, OMS). La producción y acción de la insulina se muestra en la **Figura 1**.

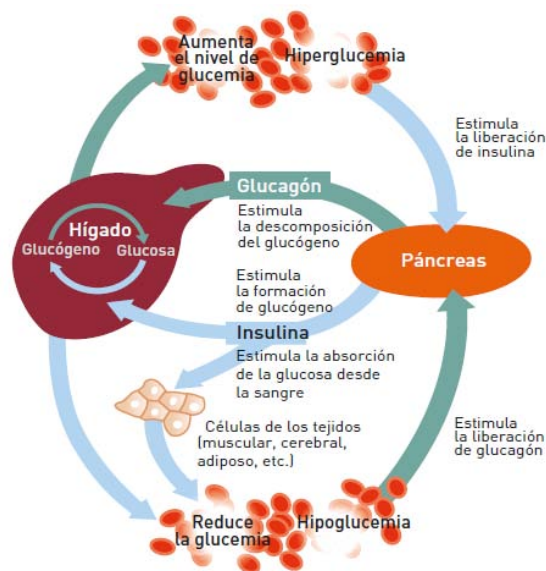


Figura 1. Producción y acción de la insulina (Atlas de la diabetes, IDF, 2013).

La diabetes se diagnostica con base en la medición de los niveles séricos de glucosa en sangre o la hemoglobina A1C, que representa los niveles promedio de glucosa durante un período de tres meses. La diabetes se clasifica en dos tipos principales la de tipo 1 (DM1) también denominada dependiente de la insulina; y la de tipo 2 (DM2) o no insulino-dependiente. La DM1 es generalmente el resultado de un proceso autoinmune mediante el cual las células β pancreáticas, productoras de insulina, están dañadas y ya no pueden producir cantidades adecuadas de esta hormona. La DM2 es resultado de la disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Everett et al., 2011).

Una persona se considera diabética cuando tiene una glucemia plasmática en ayuno mayor a 126 mg/dL; una glucemia casual mayor a 200 mg/dL; o bien una glucemia mayor a 200 mg/dL a las dos horas después de haber recibido una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. Además, existe el caso de prediabetes, donde la persona cuenta con antecedentes genéticos con un estado metabólico intermedio entre el estado normal y la diabetes. Este término se aplica a los casos tanto de Glucosa Anormal en Ayunas (GAA), como a los de Intolerancia a la Glucosa (ITG) (NOM-015-SSA2-2010).

A diferencia de la DM1, el tratamiento de la DM2 no requiere de la administración de insulina, ya que actualmente se cuenta con medicamentos orales. Aunado al tratamiento alopático, es necesario que el paciente lleve una dieta saludable, así como realizar actividad física y mantener su peso ideal, esto con la finalidad de que el paciente tenga una mejor calidad de vida.

Además de los dos tipos de diabetes antes mencionados existe otro tipo que se conoce como diabetes mellitus gestacional (DMG). Este tipo de diabetes generalmente se diagnostica por primera vez durante el embarazo. Esto se debe a que, durante este periodo, la placenta produce varias hormonas que se oponen al efecto de la insulina y producen el incremento en los niveles de glucosa. El efecto hormonal, aunado al incremento normal de peso durante el embarazo predispone a la diabetes (NOM-015-SSA2-2010; IDF, 2016).

Entre las complicaciones que un paciente con DM2 puede desarrollar, se encuentran las enfermedades cerebrovasculares, retinopatías, enfermedad coronaria cardiaca, neuropatías, enfermedades vasculares periféricas y el pie diabético (**Figura 2**).

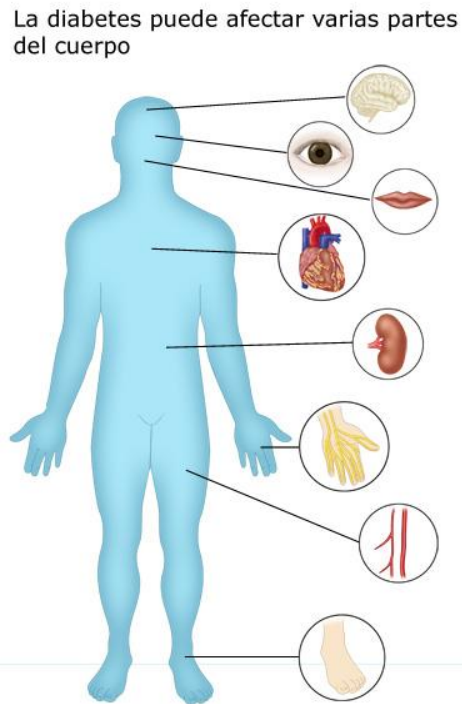


Figura 2. Órganos más afectados en la DM2.

1.1.2. Panorama actual de la diabetes en México y el mundo

Actualmente, la diabetes es un padecimiento de emergencias de salud pública, dado que cada vez más personas padecen de esta enfermedad, ya sea por una reacción inmune, por predisposición genética o bien por llevar una mala alimentación y una vida sedentaria. Además de ser un problema de salud serio, también tiene un impacto económico debido a la incapacidad laboral de los pacientes, así como los elevados costos de los tratamientos y sus complicaciones. Se estima que a nivel mundial el 12% del presupuesto de salud total se ocupa para tratar esta enfermedad (IDF, 2015).

De acuerdo con un estudio realizado por la Federación Internacional de Diabetes en el 2015 (IDF por sus siglas en inglés), en el mundo hay 415 millones de personas con este padecimiento, es decir, uno de cada once personas sufre esta enfermedad; y se estiman que para el 2040 la prevalencia aumente a 642 millones (**Figura 3**). La situación en México no es para nada alentadora, dado que ocupa el sexto lugar de los países con mayor prevalencia de diabetes con 11.5 millones de enfermos (IDF, 2015).

La diabetes y sus complicaciones son unas de las principales causas de muerte a nivel mundial. La IDF reportó que alrededor de 5 millones de personas murieron a consecuencia de este padecimiento en el 2015. En México, de acuerdo a los datos estadísticos más recientes, la DM representa la segunda causa de muerte, después de las enfermedades del corazón, con 94 mil fallecimientos (INEGI, 2014).

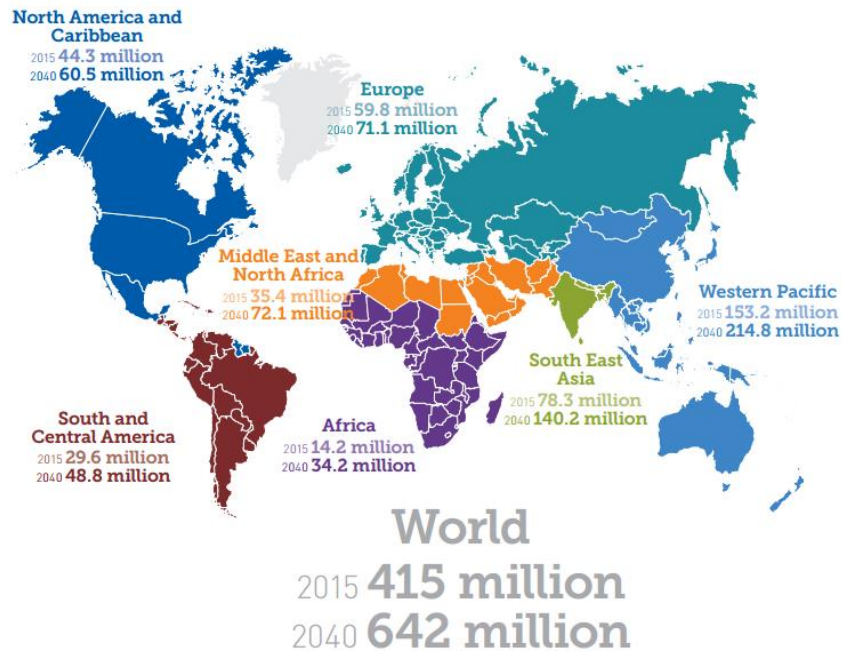


Figura 3. Panorama de la prevalencia de la diabetes en el mundo (IDF, 2015).

1.1.3. Tratamiento de la diabetes

Existen diversas estrategias enfocadas a mantener los niveles de glucosa en sangre sanguínea normales en pacientes con DM, las cuales incluyen el cambio del estilo de vida, alimentación sana, pérdida de peso y actividad física. No obstante, debido a la naturaleza progresiva de la DM y de la dificultad en mantener los cambios de vida a largo plazo, la mayoría de los pacientes requieren de terapias orales y, eventualmente, tratamientos inyectables (Gowtham et al., 2016).

El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad (NOM-015-SSA2-2010).

En individuos normoglucémicos, la homeostasis de glucosa se mantiene dentro de un estrecho rango gracias a la acción de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagón;

por hormonas reguladoras, como la amilina y las denominadas incretinas (secreción intestinal de insulina); el péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Los fármacos actuales para el tratamiento de la DM y en específico la de tipo 2, se han enfocado en favorecer el aumento de los niveles de insulina ya sea por la administración constante de la hormona, por medio de agentes orales que promuevan la secreción de insulina, o que aumenten su sensibilidad en los tejidos (músculo esquelético, tejido adiposo) reduciendo la tasa de absorción de carbohidratos desde el tracto gastrointestinal (**Tabla 1**). Entre los diferentes grupos de fármacos orales que reducen la absorción intestinal, se encuentran los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

Tabla 1. Fármacos usados en el tratamiento de la DM2

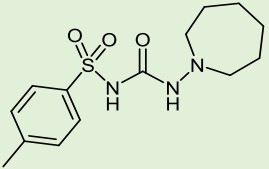
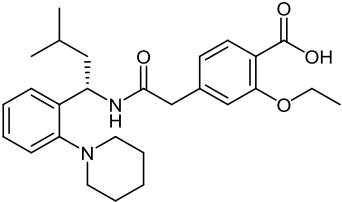
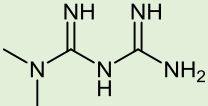
Tipo de Medicamento (Ejemplo)	Mecanismo de Acción	Efectos secundarios conocidos	Referencias
<p>Sulfonilurea</p>  <p>Tolazamida (1)</p>	<p>Estimula la secreción de insulina por células β del páncreas. Reduce la producción hepática de glucosa y aumenta la capacidad de unión y de respuesta de la insulina en tejidos periféricos.</p>	<p>Alergia, riesgo de hipoglucemia y aumento de peso</p>	<p>(Skliros et al., 2016).</p>
<p>Meglitinidas</p>  <p>Repaglinida (2)</p>	<p>Como las sulfonilureas, actúan estimulando la secreción de insulina, por inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP de las células β-pancreáticas, aunque parece que difieren en las zonas de unión a estas.</p>	<p>Riesgo de hipoglucemia</p>	<p>(Skliros et al., 2016).</p>
<p>Biguanidas</p>  <p>Metformina (3)</p>	<p>Reduce la producción hepática de glucosa por inhibición de gluconeogénesis y glucogenólisis. En el músculo incrementa la sensibilidad a insulina y mejora de captación de glucosa periférica y su utilización. Retrasa la absorción intestinal de glucosa. (No estimula la secreción de insulina, por lo que no provoca hipoglucemia).</p>	<p>Efectos secundarios gastrointestinales, acidosis láctica (en disputa), deficiencia de vitamina B12</p>	<p>(Skliros et al., 2016).</p>

Tabla 1 (continuación). Fármacos usados en el tratamiento de la DM2

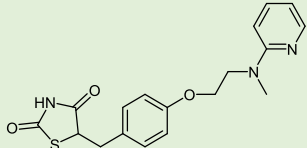
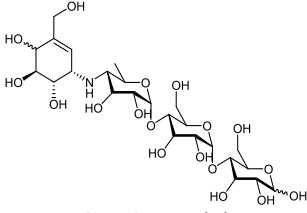
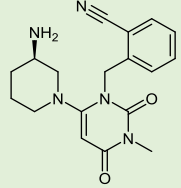
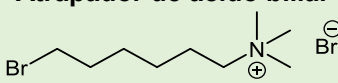
Tipo de Medicamento (Ejemplo)	Mecanismo de Acción	Efectos secundarios conocidos	Referencias
<p>Tiazolidinedionas (TZD)</p>  <p>Rosiglitazona (4)</p>	<p>Aumenta la sensibilidad a la insulina de las células del cuerpo y disminuye la producción de glucosa por el hígado.</p>	<p>Insuficiencia cardíaca, edema, fracturas, cáncer de vejiga urinaria (en disputa)</p>	<p>(Skliros et al., 2016).</p>
<p>Inhibidores de las α-glucosidasas</p>  <p>Acarbosa (5)</p>	<p>Inhibidor oral de aglucosidasa que inactiva la glucoamilasa humana, sucrasa y maltasa; así retarda la absorción de sacarosas, almidones, maltosas y otros polisacáridos; disminuye la secreción de polipéptidos gastrointestinales que aumentan durante la ingesta.</p>	<p>Efectos secundarios gastrointestinales Dosificación frecuente</p>	<p>(Skliros et al., 2016).</p>
<p>Inhibidores de la DDP-4</p>  <p>Alogliptina (6)</p>	<p>Intensifican el efecto de las hormonas intestinales (incretinas) que participan en el control de azúcar en la sangre.</p>	<p>Pancreatitis</p>	<p>(Skliros et al., 2016).</p>
<p>Agonista de GLP-1</p> <p>Exenatida (7)</p>	<p>Mimetiza el efecto de ciertas hormonas intestinales (incretinas) que participan en el control de azúcar en la sangre.</p>	<p>Efectos secundarios gastrointestinales Pancreatitis</p>	<p>(Skliros et al., 2016)</p>

Tabla 1 (continuación). Fármacos usados en el tratamiento de la DM2

Tipo de Medicamento (Ejemplo)	Mecanismo de Acción	Efectos secundarios conocidos	Referencias
<p>Inhibidores de SGLT2</p>  <p>Dapagliflozina (8)</p>	Ayuda a eliminar la glucosa en la orina.	Infecciones en el tracto urinario.	(Skliros et al., 2016)
<p>Agonista de dopamina-2</p>  <p>Bromocriptina de rápida liberación (9)</p>	Activa receptores de dopamina en el hipotálamo	Mareos, náuseas, fatiga	(Tahrani et al., 2016)
<p>Atrapador de ácido biliar</p>  <p>Colesevelam (10)</p>	Incrementa la producción de sales biliares hepáticas Incrementa la secreción de GLP-1 Activa los receptores farnesoides del hígado	Constipación, incremento de triglicéridos, podría afectar absorción de algunos fármacos	(Tahrani et al., 2016)
<p>Análogo de Amilina</p> <p>Pramlintida (11)</p>	Análogo de la amilina humana	Incrementa el riesgo de hipoglucemia	(Tahrani et al., 2016)

1.2. Generalidades de las enzimas α -glucosidasas

Los carbohidratos tales como oligosacáridos y polisacáridos desempeñan un papel importante en la mayoría de los procesos biológicos incluyendo la estructura, el almacenamiento de alimentos y su utilización, la invasión viral y los eventos de señalización celular. Las glucósido-hidrolasas (enzimas que hidrolizan a los carbohidratos), tales como las α -glucosidasas se encuentran implicadas en varias enfermedades. La inhibición de esta enzima es uno de los mecanismos de la clase de fármacos antidiabéticos orales (Giacco et al., 2015).

1.2.1. Definición de las α -glucosidasas

Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.x) son las enzimas clave en la hidrólisis de los carbohidratos en seres vivos, encontrándose en los tres reinos principales: archaeobacteria, eubacterias y eucariotas. Las α -glucosidasas son un grupo de enzimas que pertenecen al grupo de las glicosil hidrolasas, las cuales juegan un papel crucial en la liberación de α -glucosa a partir de los sustratos no reductores terminales (oligo y polisacáridos). Estas enzimas se clasifican, en función de su estructura y la especificidad de su sustrato primario, en dos familias (I y II) y en tres tipos (I, II, III). La familia I (tipo I) hidroliza sustratos heterogéneos como sacarosa y α -glucósidos sintéticos más rápidamente que los sustratos homogéneos como malto-oligosacáridos y la familia II (tipos II y III) tienen una mayor actividad hacia sustratos homogéneos que los sustratos heterogéneos, y solo las de tipo III son capaces de hidrolizar α -glucanos (almidón soluble y glicógeno) (Abid et al., 2016).

Debido que la DM2 representa aproximadamente el 90-95% de todos los casos de este padecimiento, una de las formas para mantener los niveles de azúcar bajos y estables es mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas y α -amilasas que se encuentran en el sistema digestivo, las cuales se secretan a partir de la saliva y el páncreas. Las α -amilasas catalizan la escisión 1,4 de polisacáridos para convertirlos en oligosacáridos más pequeños, tales como la maltosa, maltotriosa, etc. Estos fragmentos son degradados nuevamente por las α -glucosidasas localizadas en el intestino delgado. Por lo tanto, la inhibición de estas enzimas puede retrasar la digestión de los carbohidratos que causa una reducción en la tasa de absorción de glucosa y en consecuencia una supresión de la hiperglucemia posprandial (Trinh et al., 2016).

1.2.2. Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas

Los inhibidores de las α -glucosidasas (*i*- α G) se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluidos en las plantas, algas y microorganismos. Estos inhibidores se unen con gran afinidad al sitio activo de la enzima y se piensa que pueden mimetizar de manera eficiente el estado de transición de la reacción catalizada por la enzima y, por lo tanto, inhibir su actividad. Existe una extensa clasificación de *i*- α G, pero de manera general se pueden clasificar en azúcares, derivados de azúcares y no sacáridos.

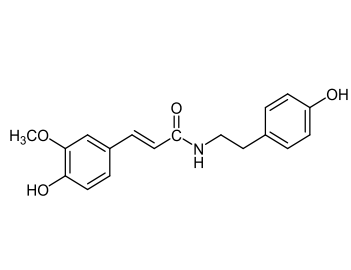
D-Azúcares. Los disacáridos como kojibiosa (**24**) (aislada de *Aspergillus oryzae*) son capaces de inhibir a la α -glucosidasa porque presentan en un extremo α -(1 \rightarrow 2) glicosídicos que asumen conformaciones similares a sustratos de α -glucosidasa.

Derivados de azúcares. Los iminoazúcares, como la nojirimicina (**25**), son compuestos de tipo alcaloide polihidroxilados, en donde el átomo de oxígeno piranósido se sustituye por un átomo de nitrógeno endocíclico. La actividad inhibidora tan alta se debe a su capacidad para imitar el estado de transición de unidades piranósido o furanósido de los sustratos de la α -glucosidasa. Carbazúcares y pseudoaminoazúcares también son potentes inhibidores de la α -glucosidasa en el que el átomo de oxígeno del anillo de piranosa se sustituye por el carbono y el oxígeno del enlace glicosídico se sustituye por nitrógeno, de manera que la configuración general es similar a la de la D-glucosa. El enlace de nitrógeno glicosídico de estos inhibidores interactúa fuertemente, mediante la formación de un puente de hidrógeno con un residuo de ácido aspártico de la α -glucosidasa bloqueando el sitio activo de la enzima. El ejemplo más conocido de este tipo de compuestos es la acarbosa (**5**). Otros productos, los tioazúcares tienen azufre en lugar del átomo de oxígeno del anillo de hidrato de carbono, como el salacinol (**26**) aislado de *Salacia sparagine*.

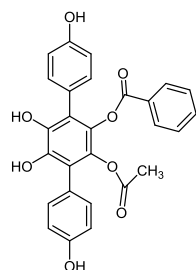
No azúcares. Los derivados de tetracloroftalamida son compuestos que contienen grupos hidrófobos (halógenos o cadenas laterales de *N*-alquilo). La actividad inhibidora de estos *i*- α G se debe a los *N*-sustituyentes hidrófobos y a la influencia positiva de electrones unidos al anillo aromático. Por ejemplo, el ftalato de dibutilo (**27**) aislado de *Streptomyces melanosporofaciens* presenta una inhibición no competitiva de la α -glucosidasa; o las bisamidas, y compuestos representados por la *N-p*-cumaroil-*N*-feruloilputrescina (**28**). Otros compuestos son activos frente a la α -glucosidasa son la Schulzeina A (**29**) (alcaloide tetrahidroisoquinolínico) aislado de *Penares schulzie*.

Una revisión general en la literatura sobre *i-αG* obtenidas de fuentes naturales, reveló que la mayoría presentan núcleos estructurales del tipo de los terpenos, alcaloides, quininas, flavonoides y fenilpropanoides. En la **Figura 4** se enlistan algunos ejemplos de inhibidores selectos.

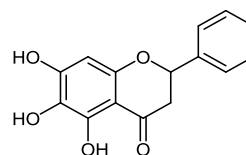
Figura 4. Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas obtenidos de fuentes naturales.



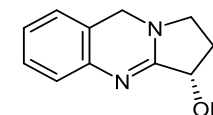
trans-N-feruloil tiramina (12)
Ipomoea batatas
 $Cl_{50} = 4.47 \pm 0.19 \mu\text{M}$
(Zhang et al., 2016).



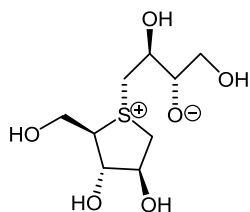
Concrescenina A (13)
Hydrellum concrescens
 $Cl_{50} = 0.99 \pm 0.04 \mu\text{M}$
(Wang et al., 2014).



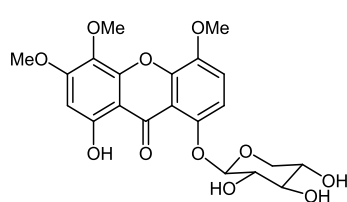
Baicaleina (14)
Scutellaria baicalensis
 $Cl_{50} = 38.19 \pm 1.82 \mu\text{M}$
(Yang et al., 2015).



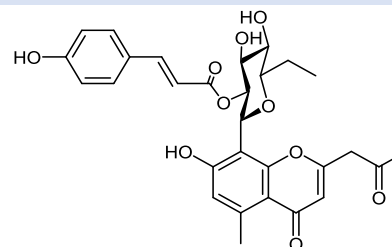
Vasicina (15)
Adhatoda vasica Nees
(Abid et al., 2016)



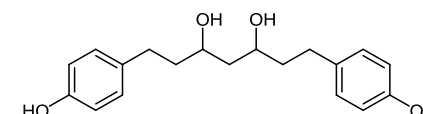
Neosalacinol (16)
Salacia oblonga
(Abid et al., 2016)



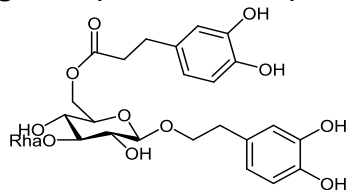
8-O-[[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-1-hidroxi-3,4,5-trimetoxixantona (17)
Swertia bimaculata
 $Cl_{50} = 136 \mu\text{M}$
(Yue et al., 2014)



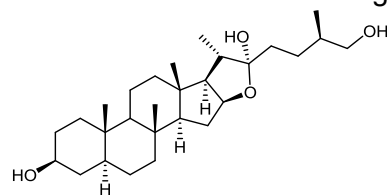
Aloeresin A (18)
Aloe ferox
 $Cl_{50} = 11.94 \mu\text{M}$
(Jong-Anurakkun et al., 2008)



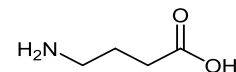
1,7-bis(4-hidroxifenil)heptano-3,5-diol (19)
Dioscorea opposita
 $Cl_{50} = 0.38 \text{ mM}$
(Zhang et al., 2011)

Figura 4 (Continuación). Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas obtenidos de fuentes naturales.

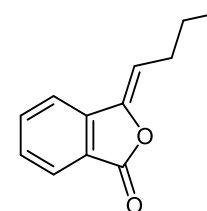
Isoacteosida (**20**)
Clerodendrum bungei
 $CI_{50} = 0.1 \text{ mM}$
 (Liu et al., 2014)



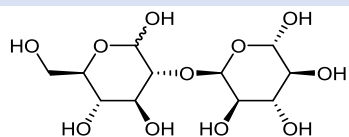
(25S)-5 α -Furastan-3 β ,22,26-triol (**21**)
Tribulus longipetalus
 $CI_{50} = 33.5 \text{ }\mu\text{M}$
 (Naveed et al., 2014)



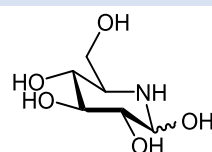
Ácido γ -aminobutírico (**22**)
Triticum aestivum L.
 $CI_{50} = 1.4 \text{ mM}$
 (Jeong et al., 2012)



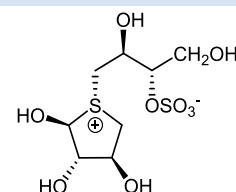
3-(Z)-Butilideneftalida (**23**)
Ligusticum porteri
 $CI_{50} = 2.35 \text{ mM}$
 (Brindis et al., 2011)



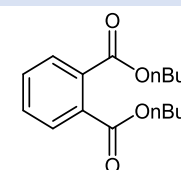
Kojibiosa (**24**)
Aspergillus oryzae
 (Abid et al., 2016)



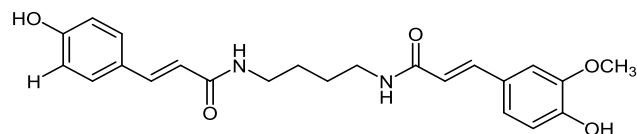
Nojirimicina (**25**)
Streptomyces sp.
 (Abid et al., 2016)



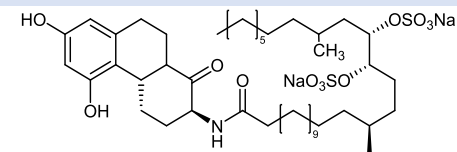
Salacinol (**26**)
Salacia sparagine Wight
 (Abid et al., 2016)



Ftalato de dibutilo (**27**)
Streptomyces melanosporofaciens
 (Abid et al., 2016)

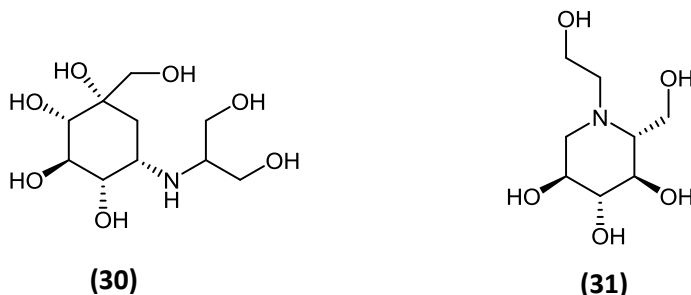


N-p-coumaroil-N-feruloilputrescina (**28**)
 salvado de maíz
 (Abid et al., 2016)



Schulzeina A (**29**)
Penares schulzie
 (Abid et al., 2016)

Actualmente los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas disponibles en el mercado incluyen a la acarbosa, la voglibosa y el miglitol. La acarbosa (**5**), uno de los compuestos con mayor relevancia clínica, es un pseudotetrasacárido, aislado del microorganismo *Actinoplanes sp.* SE-50. La voglibosa (**30**) es un derivado de la valiolamina, un aminociclitol aislado de *Streptomyces hygroscopicus*; y el miglitol (**31**), un derivado de la desoxinojirimicina. La acarbosa y la voglibosa son de origen microbiano, mientras que el miglitol es un derivado sintético. La acarbosa y voglibosa actúan principalmente en el intestino debido a que no se absorben significativamente (acarbosa <2%; voglibosa, aproximadamente 3% a 5%), mientras que el miglitol se absorbe rápidamente a través de un mecanismo de transporte en el yeyuno, que es muy similar al de la glucosa (Lebovitz, 1997).



No obstante, y a pesar de la basta cantidad de fármacos disponibles en el mercado, la nueva tendencia en los pacientes con DM ha sido el acercamiento y uso de alimentos funcionales, así como medicinas alternativas y complementarias. Algunos pacientes practican el uso de plantas medicinales, hongos y otro tipo de preparaciones para complementar su tratamiento alopático. En este sentido, estudios etnofarmacológicos han llevado a diversos grupos de investigación en todo el mundo a encontrar una gran variedad de moléculas activas a partir de las fuentes naturales empleadas en el tratamiento tradicional de la DM. Ejemplos exitosos del uso de productos naturales en la terapia de la DM son la metformina, desarrollada a partir del estudio químico de la planta medicinal *Galega officinalis*; la exenatida obtenida por semisíntesis a partir de un metabolito encontrado en la saliva del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*); o bien los inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas anteriormente descritos aislados a partir de diversos microorganismos.

1.3. Productos naturales: Importancia en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.

Por muchos años, los productos naturales y sus derivados han sido de gran importancia para el tratamiento y/o prevención de padecimientos que afectan al ser humano.

La naturaleza ha sido una fuente valiosa de fármacos desde el inicio de la historia y en muchas culturas lo sigue siendo hoy en día, como en la medicina tradicional china o ayurveda. Tal es así, que cerca de un 50% de los fármacos actualmente usados en la medicina del mundo occidental derivan directa o indirectamente de la naturaleza, como la Aspirina® o el Taxol®. El camino que una sustancia recorre desde la naturaleza hasta convertirse en un nuevo fármaco es largo, laborioso y, en general, muy costoso. Los pasos más importantes a lo largo de este camino son el aislamiento a partir de la fuente natural, su elucidación estructural de los metabolitos aislados, sus ensayos en diferentes sistemas biológicos, su evaluación en fases clínicas y, finalmente - si todo va bien - la aprobación por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés).

Por otra parte, la aparición de nuevas enfermedades infecciosas, la persistencia de enfermedades que aún no tienen tratamiento o la aparición de resistencia, amenazan la eficacia de los medicamentos actualmente en uso. En este contexto, la búsqueda de nuevas sustancias más eficaces y con menos efectos adversos se ha enfocado principalmente en productos de origen natural.

Entre las principales fuentes de investigación de productos naturales, los hongos constituyen un grupo muy diverso y ampliamente distribuido en la naturaleza, el cual incluye mohos, setas y levaduras. A la fecha se han descrito más de 100,000 especies y se estima que podrían existir hasta 5.1 millones de especies a nivel mundial (Blackwell, 2011). La actividad biológica descrita para los metabolitos de origen fúngico es muy diversa, ya que cerca del 80% de estos compuestos presentan importantes actividades biológicas como agentes antimicrobianos, fitotóxicos, antitumorales, antivirales, antifúngicos, inmunosupresores; para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, diabetes, hipercolesterolemia, entre otras (Newman and Cragg, 2016).

Durante los últimos 50 años, los metabolitos secundarios de los hongos han revolucionado la medicina produciendo medicamentos de mayor éxito. Desde el descubrimiento de la penicilina, el primer antibiótico β -lactámico, los hongos han

proporcionado a la medicina moderna con antibióticos importantes para curar enfermedades infecciosas mortales. Una nueva era en la inmunofarmacología y el trasplante de órganos comenzó con el descubrimiento de la ciclosporina. Otros medicamentos o productos para la agricultura derivados o inspirados por los productos naturales de origen fúngico incluyen a las estatinas, equinocandinas y estrobilurinas (Aly et al., 2011).

La investigación de especies fúngicas nuevas o sin antecedentes de estudios químicos precede al descubrimiento de moléculas con estructuras inéditas y, muy probablemente, con actividad biológica y/o mecanismos de acción novedosas. Es por ello que en el presente trabajo se decidió estudiar una especie del género *Malbranchea*, la cual no tiene reportes previos sobre estudios químicos y actividad biológica.

1.4. Género *Malbranchea*

1.4.1. Antecedentes

El género *Malbranchea* fue descrito por primera vez por Saccardo en 1899, donde sólo se incluía una especie, *Malbranchea pulchella* Saccardo & Penig, la cual se caracteriza por la producción de arthroconidias en ramas curvas. No obstante, en 1976 Sigler y Carmichael propusieron la adición de especies que producían arthroconidias en ramas rectas al género, de tal forma que el número de especies en el género se amplió a 15 (Okada et al., 1995). El género *Malbranchea* se ha convertido en objeto de diversos estudios químicos, que han permitido el aislamiento de metabolitos secundarios con actividad biológica importante. Entre los tipos estructurales a los que pertenecen estos metabolitos destacan los alcaloides, hidroquinonas, sesquiterpenos, benzofuranos y benzoquinonas; con actividades biológicas como: antibióticos, antioxidantes, vasorrelajantes, inhibidores de la proteína calmodulina (CaM) y como agentes citotóxicos. En la **Tabla 2** se ilustran algunos de los metabolitos biodinámicos aislados de las especies del género y que presentan una relevante actividad biológica. Dentro de los metabolitos aislados de este género, aquellos pertenecientes a la familia de las malbranqueamidas han despertado un gran interés tanto por su característico núcleo biciclo[2.2.2] diazaoctano, así como por su notable actividad biológica. Para fines del presente trabajo de investigación, se profundizará sobre compuestos que contienen este núcleo.

Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados de especies del género *Malbranchea*.

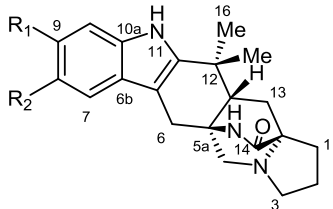
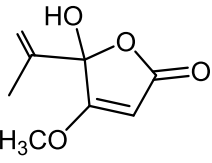
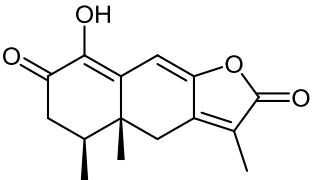
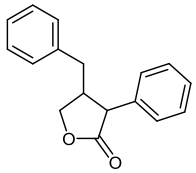
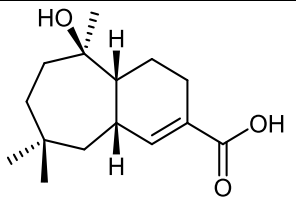
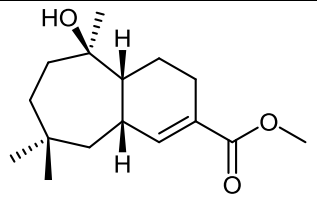
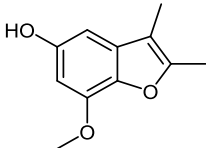
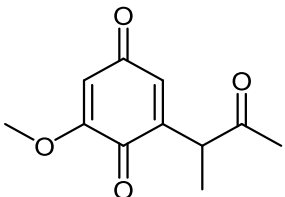
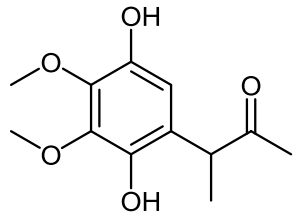
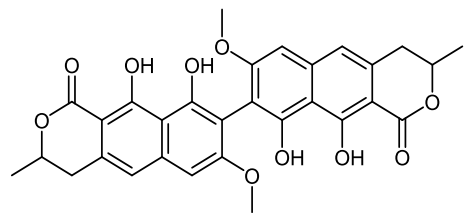
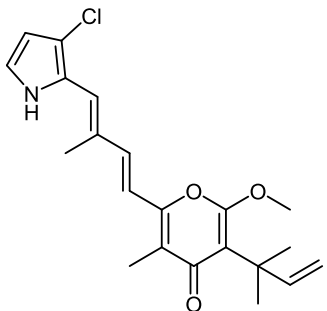
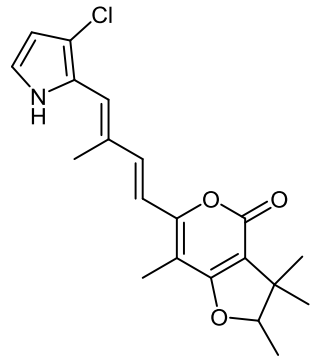
<i>Malbranchea aurantiaca</i>																	
 <table border="0"> <tr> <td></td> <td>R₁</td> <td>R₂</td> </tr> <tr> <td>Malbranqueamida (32)</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Malbranqueamida B (33)</td> <td>Cl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Isomalbranqueamida B (34)</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Premalbranqueamida (35)</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </table>		R₁	R₂	Malbranqueamida (32)	Cl	Cl	Malbranqueamida B (33)	Cl	H	Isomalbranqueamida B (34)	H	Cl	Premalbranqueamida (35)	H	H	 Ácido penicílico (36)	 1-Hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olido (37)
	R₁	R₂															
Malbranqueamida (32)	Cl	Cl															
Malbranqueamida B (33)	Cl	H															
Isomalbranqueamida B (34)	H	Cl															
Premalbranqueamida (35)	H	H															
Vasorelajante (Madariaga-Mazón et al., 2015). Inhibidores de CaM (Miller et al. 2008). Fitotóxico (Martínez-Luis et al., 2006).	Fitotóxico (Martínez-Luis et al., 2005)	Fitotóxico (Martínez-Luis et al., 2005)															
<i>Malbranchea filamentosa</i>																	
 4-Bencil-3-fenil-5H-furan-2-ona (38)	 Malfilanol A (39)	 Malfilanol B (40)															
Vasorelajante y antifúngico (Hosoe et al., 2005)	Citotóxico y antifúngico (Wakana et al., 2009)	Citotóxico y antifúngico (Wakana et al., 2009)															

Tabla 2. (Continuación) Metabolitos secundarios aliados de especies del genero *Malbranchea*.

<i>Malbranchea cinnamomea</i>		
 <p>7-Metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (41)</p>	 <p>Malbranicina A (42)</p>	 <p>7-metoximalbranicina (43)</p>
<p>Antioxidante (Schlegel et al., 2003a)</p>	<p>Antibiótico y citotóxico (Chiung et al., 1993)</p>	<p>Inhibidor del gen de transcripción viral HTLV-I (Schlegel et al., 2003b)</p>
<i>Malbranchea sulfurea</i>		
 <p>Tf-26Vx (44)</p>	 <p>Malbranpirrol C (45)</p>	 <p>Malbranpirrol D (46)</p>
<p>Antibiótico (Saito et al., 1979)</p>	<p>Citotóxico (Yang et al., 2009)</p>	<p>Citotóxico (Yang et al., 2009)</p>

1.5 Metabolitos fúngicos con el núcleo biciclo[2.2.2] diazaoctano

La Brevianamida A (**49**), fue aislada por primera vez a partir de *Penicillium brevicompactum* por Birch y Wright en el año de 1969 y representa el primer compuesto conocido de la familia de metabolitos fúngicos con el anillo biciclo[2.2.2] diazaoctano (Sanz-Cervera et al., 2000). Posteriormente fue aislada de cultivos de *Penicillium viridicatum* y *P. ochraceum* (Williams, 2002). Esta familia de metabolitos posee un sistema de anillos con un núcleo característico biciclo[2.2.2] diazaoctano, que forman parte de una clase diversa de alcaloides indólicos prenilados biológicamente activos aislados de varias especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Las brevianamidas, paraherquamidas, estefacidinas, notoamidas, asperparalinas, marcfortinas, crisofenamidas, y malbranqueamidas presentan una gran diversidad de características estructurales (Finefield et al., 2012), destacando el esqueleto con el núcleo diazaoctano y un sistema de oxidación complejo (**Figura 5**).

Uno de los grupos más abundantes de estos compuestos son las paraherquamidas, que se aislaron por primera vez de *Penicillium paraherquei*, una sinonimia de *P. brasilianum*. La paraherquamida A (**53**) fue el primer miembro de esta familia en ser aislado de *P. paraherquei* (Finefield et al., 2012). La asperparalina A (**70**) es un alcaloide de tipo indólico que contiene el biciclo[2.2.2] diazaoctano, aislado en 1997 por Hayashi y colaboradores a partir de *A. japonicus* JV-23, en Sakai, Japón. En el 2000, el mismo grupo de trabajo logró aislar dos nuevos metabolitos (asperparalina B (**71**) y asperparalina C (**72**)) obtenidos del mismo hongo (Hayashi et al., 2000). En 2007, Tsukamoto y colaboradores aislaron notoamidas de un *Aspergillus* sp MF297-2 de origen marino encontrado en el mejillón *Mytilus edulis*, recolectado en la península de Noto, en el Mar de Japón (Kato et al., 2007).

Figura 5. Compuestos con el núcleo característico biciclo[2.2.2] diazoctano y fuentes de obtención.

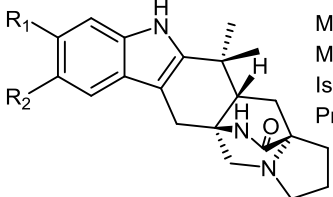
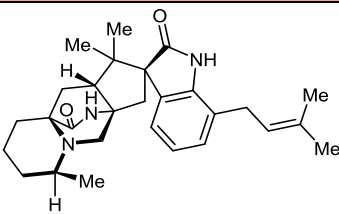
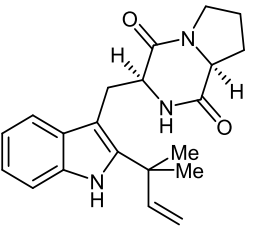
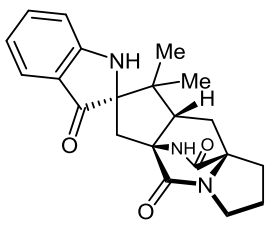
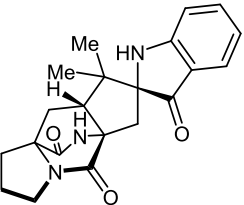
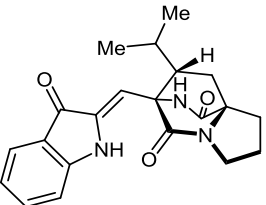
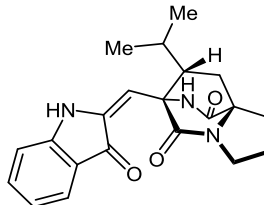
Malbrancheamidas		Crisogenamidas		
	Malbrancheamida (32)	R ₁ Cl	R ₂ Cl	
	Malbrancheamida B (33)	R ₁ Cl	R ₂ H	
	Isomalbrancheamida B (34)	R ₁ H	R ₂ Cl	
	Premalbrancheamida (35)	R ₁ H	R ₂ H	
<i>Malbranchea aurantiaca</i> ; <i>M. graminicola</i>		Crisogenamida A (47) <i>P. chrysogenum</i>		
Desoxibrevianamidas	Brevianamidas			
 <p>Desoxibrevianamida E (48) <i>A. pseudoustus</i>, <i>P. italicum</i>, <i>P. ulaiense</i></p>	 <p>Brevianamida A (49)</p>	 <p>Brevianamida B (50)</p>	 <p>Brevianamida C (51)</p>	 <p>Brevianamida D (52)</p>
	<i>P. viridicatum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>A. carlsbadensis</i>			

Figura 5 (Continuación). Compuestos con el núcleo característico biciclo[2.2.2]diazaoctano y fuentes de obtención.

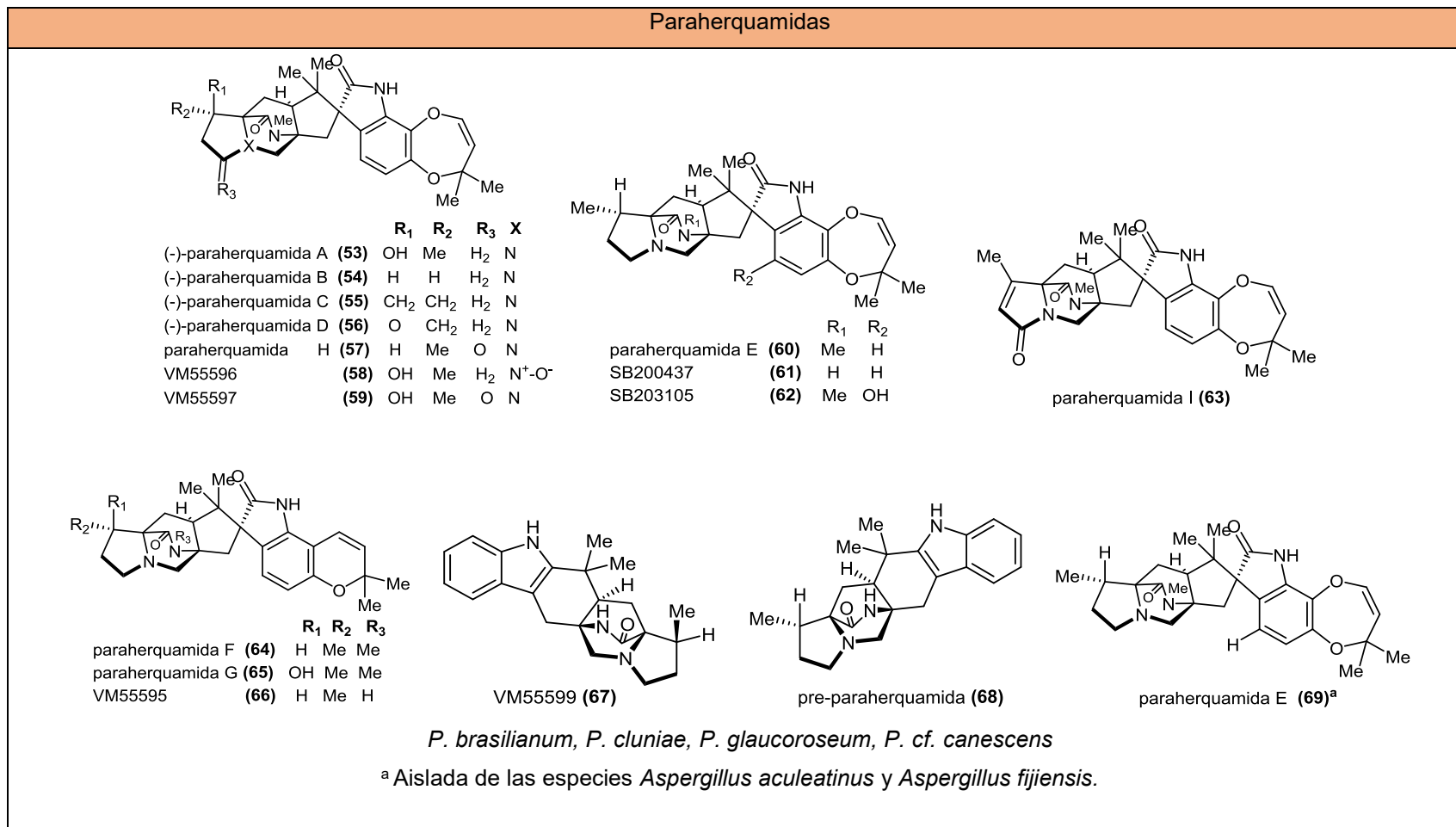
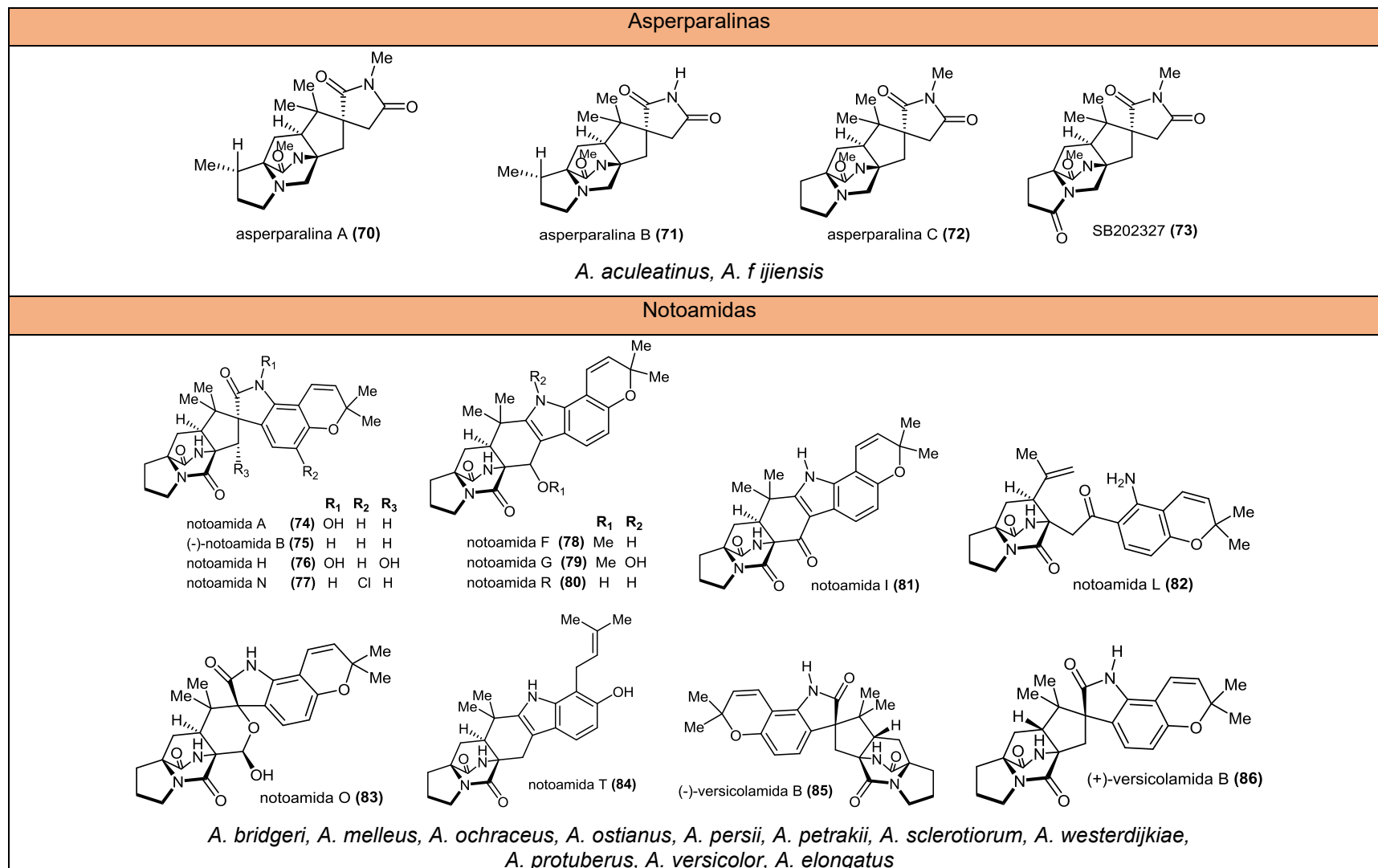
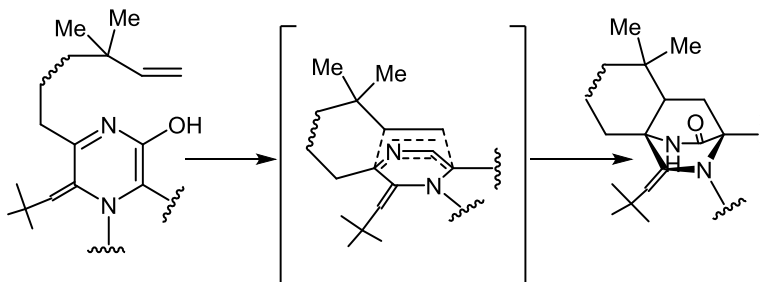


Figura 5 (Continuación). Compuestos con el núcleo característico biciclo[2.2.2] diazaoctano y fuentes de obtención.

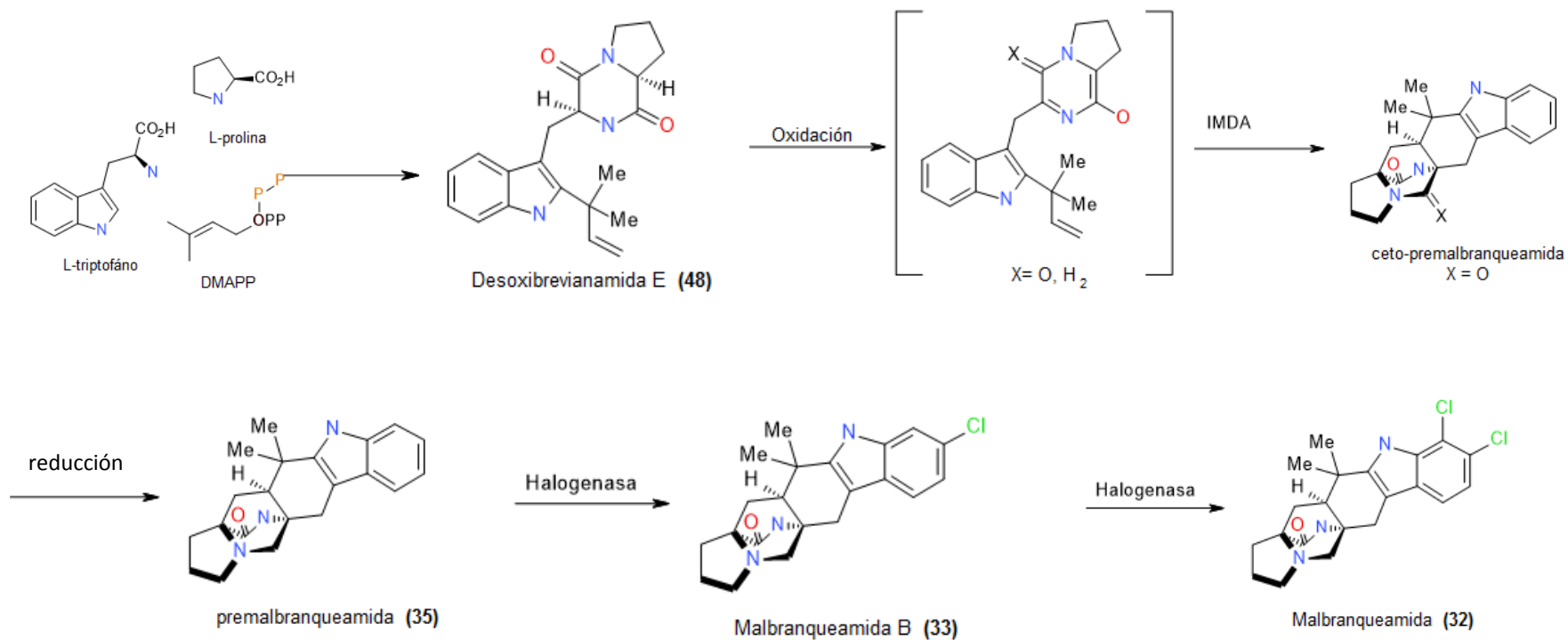


Desde el primer aislamiento de este tipo de compuestos, se han llevado a cabo numerosos estudios enfocados al entendimiento biosintético y sintético de este sistema único de anillos. Porter y Sammes propusieron que la formación del sistema de anillos biciclo[2.2.2] diazaoctano se lleva a cabo mediante una reacción intramolecular Diels-Alder (IMDA) de una 5-hidroxipirazin-2(1*H*)-ona (5HP) (**Esquema 1**), lo cual fue comprobado posteriormente en estudios de síntesis biomimética de diferentes metabolitos del tipo por Williams y colaboradores.



Esquema 1. Reacción de tipo Diels-Alder propuesta para formar la estructura del núcleo biciclo[2.2.2] (Williams and Cox, 2003).

La propuesta de biogénesis de estos alcaloides inicia con la condensación de triptófano, prolina o lisina, y al menos una unidad de isopreno, para dar lugar al compuesto **48** (**Esquema 2**). A partir de este punto, dos posibles rutas podrían seguirse para la formación de **35**. Por un lado, la oxidación de **48** produce el precursor 5HP, que sufre una cicloadición para formar la ceto-premalbranqueamida; una reducción del carbonilo resultaría en **35**. Por otro lado, la reducción del carbonilo podría ocurrir previo a la reacción IMDA para producir el compuesto **35**. La halogenación en el núcleo indólico se produciría posteriormente vía halogenasas independientes.



Esquema 2. Biogénesis propuesta para las malbranqueamidas (Finefield et al. 2012).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus es una de las mayores emergencias del siglo XXI, considerada actualmente como una epidemia. La terapia para la DM se enfoca principalmente en aumentar la producción de insulina o sensibilizar tejidos blanco a esta hormona. A pesar de la existencia de estos tratamientos, la creciente demanda por esta enfermedad exige el descubrimiento de nuevas moléculas más eficientes y con menos efectos adversos; siendo los productos naturales la fuente principal de búsqueda para el cumplimiento de este objetivo. Es por ello que el presente trabajo de investigación se enfocó en la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas, a partir del estudio químico de una especie del género *Malbranchea*.

En este contexto, el estudio de fuentes naturales sin precedentes de investigación química aumenta la probabilidad de encontrar metabolitos con estructuras inéditas, factor clave en el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción biológica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

Realizar el estudio químico de *Malbranchea chrysosporoidea* con la finalidad de encontrar nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas de utilidad en el potencial desarrollo de fármacos empleados en el tratamiento de la diabetes.

3.2. Objetivos particulares

- ✓ Realizar el cultivo del hongo objeto de estudio en mediana escala para obtener el correspondiente extracto orgánico.
- ✓ Efectuar el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico empleando como ensayo biológico la actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas obtenidas de raspado intestinal de mamífero (rata) y de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).
- ✓ Realizar el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas mediante técnicas cromatográficas.
- ✓ Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- ✓ Evaluar a los metabolitos puros utilizando el mismo ensayo biológico de monitoreo.
- ✓ Evaluar a los metabolitos puros activos en un experimento de tolerancia a la sacarosa con la finalidad de confirmar su actividad antihiper glucémica en un sistema *in vivo*.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Obtención del material fúngico

El hongo *Malbranchea chrysosporoidea*, inicialmente denominado como AcaH3, fue proporcionado por la Dra. Ma. del Carmen González del Instituto de Biología (IB), UNAM, aislado de zonas intermareales de la Bahía de Acapulco, Guerrero. Cabe mencionar que durante el desarrollo del proyecto se llevó a cabo la identificación taxonómica de la especie. Una muestra del espécimen se depositó en el Herbario del IB bajo el número de voucher MEXU27860.



Figura 6. *M. chrysosporoidea* (40 días de crecimiento en APD).

4.2. Análisis cromatográficos generales

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron en su modalidad analítica en placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (0.25 mm de espesor, Merck®) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución (Hex-AcOEt-MeOH).

Para visualizar a las placas se utilizó una lámpara de luz ultravioleta (UV) a dos longitudes de onda (254 y 365 nm). Como agente cromógeno se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico (12 g sulfato cérico con 22.5 mL de H₂SO₄ en 350 mL de H₂O).

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes volúmenes empacadas con gel sílice Kiesegel 60 Merck® (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) o Sephadex® LH-20 (Pharmacia-Biotech) de

acuerdo con las técnicas convencionales y empleando diferentes sistemas de elución. En el primer caso se utilizaron mezclas de polaridad crecientes de hexano, acetato de etilo y metanol. En el segundo, se utilizó CH₂Cl₂-MeOH (2:8) como fase móvil.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia en modo preparativo se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2998), una bomba 2535 y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Para la resolución de las muestras analizadas se utilizó una columna analítica Gemini C-18 3 µm (4.6 x 250 mm) y una columna modo preparativo Gemini 5µ C18 110A AXIA (21.1 x 250 mm). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La longitud de onda (λ) utilizada para la detección de los compuestos fue de 230 nm.

4.3. Determinación de las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance a 400 MHz (Instituto de Química, UNAM) utilizando CD₃OD como disolvente; los desplazamientos químicos fueron registrados en ppm (δ).

El análisis de espectrometría de masas se realizó en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) Clase H marca Waters Chromatography Division (Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA) y un detector de masas SQD2 simple cuadrupolo con una fuente de ionización por electrospray (ESI/EM), una bomba cuaternaria e inyector automatizado. El control del equipo, la obtención de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizó utilizando el programa MassLynk versión 4.1. El análisis de las muestras se realizó en una columna BEH C-18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) (Waters. Milford, MA, USA).

4.4. Estudio Químico de *M. chrysosporioidea*

4.4.1. Fermentación de *M. chrysosporioidea*

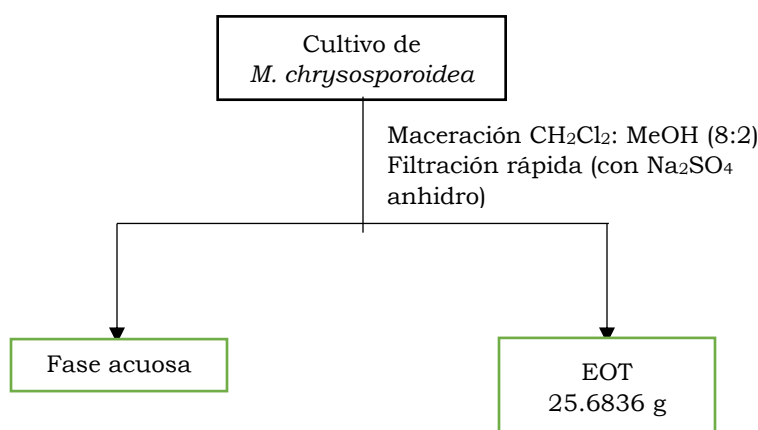
Para los cultivos en mediana escala, se preparó un cultivo semilla en 150 mL del medio líquido PDA (Almidón de papa 4.0 g, Dextrosa 20.0 g, Agua destilada cpb 1 L) y se

dejó fermentar durante 14 días. Este cultivo sirvió para inocular el medio de arroz sólido (500 g integral, 500 g blanco, c.p.b de agua), el cual se dejó en crecimiento durante 31 días en condiciones de luz-sombra normal y temperatura ambiente.

4.4.2. Obtención del Extracto Orgánico

Una vez terminado el tiempo de fermentación se procedió a la obtención del extracto orgánico total (EOT) (**Esquema 3**). Para ello, se realizaron sucesivas extracciones por maceración con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH en una proporción 8:2 (6 x 700 mL). El extracto obtenido de cada maceración se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida.

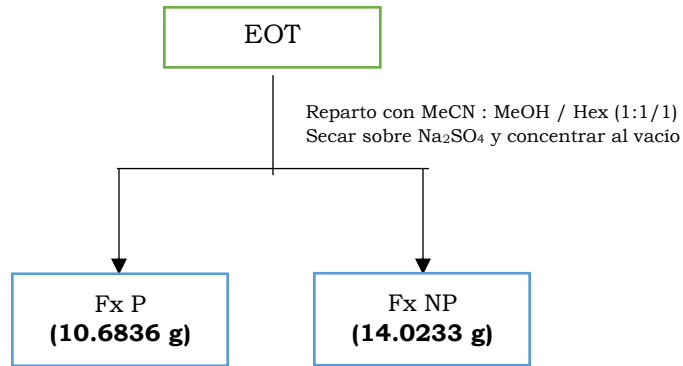
Esquema 3. Obtención del EOT de *M. chrysosporoidea*



4.4.3. Fraccionamiento biodirigido del EOT de *M. chrysosporoidea*

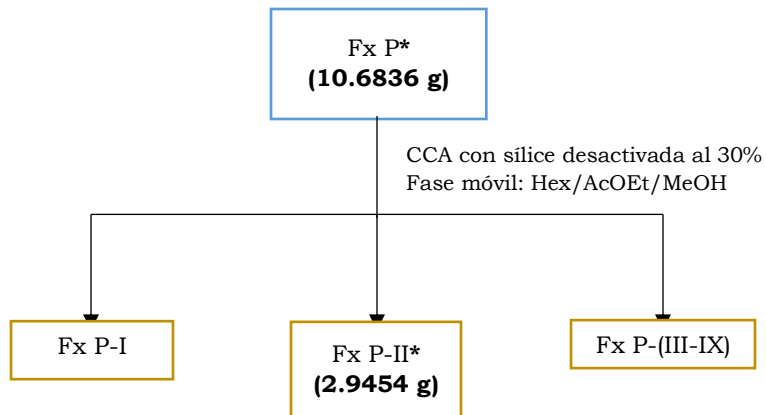
El EOT seco obtenido se evaluó de manera preliminar en un ensayo espectrofotocolorimétrico para determinar su actividad inhibitoria contra las enzimas α -glucosidasas, presentando un 30% de actividad. A continuación, se sometió a un proceso de desgrase con una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y hexano en volúmenes iguales (600 mL x 5), obteniéndose una fracción no polar (Fx NP, 14.0233 g) y otra polar (Fx P, 10.6836 g). Ambas fases se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y fueron concentradas al vacío (**Esquema 4**).

Esquema 4. Fraccionamiento del EOT de *M. chrysosporoidea*.



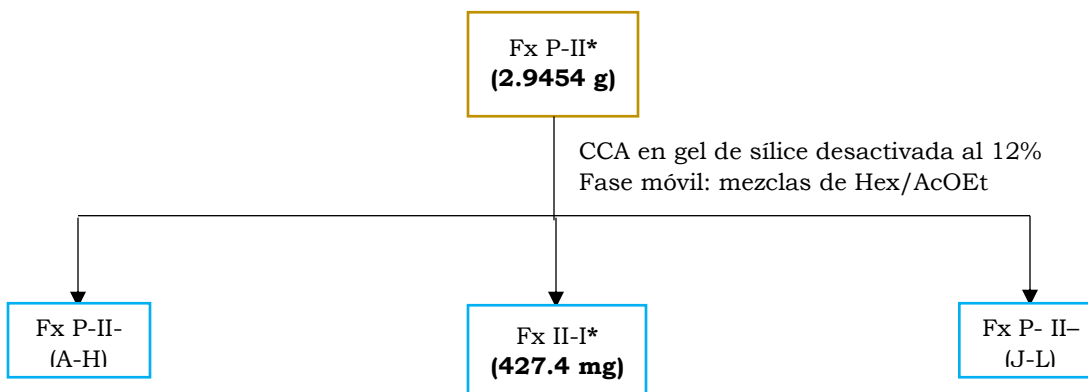
La FxP activa (desgrasada) se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) usando 625 g de gel sílice desactivada al 30% y mezclas de Hex-AcOEt-MeOH en orden creciente de polaridad (**Esquema 5**). De este fraccionamiento se obtuvieron 253 fracciones, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en 9 conjuntos de fracciones primarias (Fx P-I - Fx P-IX)

Esquema 5. Fraccionamiento de la Fx P de *M. chrysosporoidea*.



Posteriormente, se realizó el fraccionamiento secundario de la fracción activa Fx P-II por medio de CCA (20 g de gel sílice desactivada al 12%); obteniéndose 381 eluatos reunidos en un conjunto de 12 fracciones secundarias (**Esquema 6**).

Esquema 6. Fraccionamiento de la Fx P-II de *M. chrysosporidea*.



4.5. Aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de la especie fúngica *M. chrysosporidea*.

La fracción Fx P-II-I obtenida se purificó siguiendo la estrategia metodológica resumida en el **Esquema 7** y las condiciones de análisis especificadas en la **Tabla 3**. La resolución de la fracción permitió el aislamiento de 4 compuestos mayoritarios identificados como malbranqueamida (**32**, 61.3 mg, $t_R = 5.91$ min), premalbranqueamida (**35**, 38.4 mg, $t_R = 5.02$ min) y una mezcla de malbranqueamida B (**33**) e isomalbranqueamida B (**34**) (46,2 mg, $t_R = 5.44$ min).

Esquema 7. Purificación de las malbranqueamidas.

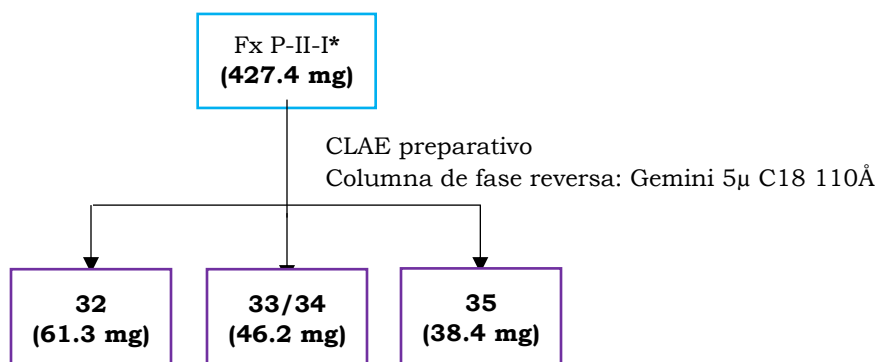


Tabla 3. Condiciones cromatográficas utilizadas para la resolución de la fracción Fx-P-II-I.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Fase Móvil	
		Agua (Ac. Fórmico, 0.1% v/v)	MeCN
0	1.0	85	15
15	1.0	0	100
20	1.0	0	100

Malbranqueamida (32):

Polvo amorfo color crema, p.f. 321–324 °C; UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 229 y 290, RMN- H^1 (400Hz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7.47 (H-7, s, 1H), 7.39 (H-10, s, 1H), 3.42 (H-5, d, $J = 10.3$, 1H), 3.07 (H-3, m, 1H), 2.83 (H 6a-6b, m, 2H), 2.55 (H-1, m, 1H), 2.29 (H-5, dd, $J = 10.4$, 1.8 Hz, 1H), 2.17 (m, 6H), 1.43 (H-17, s, 3H), 1.32 (H-16, s, 3H).

Malbranqueamida B e Isomalbranqueamida B (33 y 34)

Polvo color amarillo, p.f. 315-321 °C, UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ)= 230 y 292, RMN- H^1 (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): **Mal B** 7.30 (H-7, d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.25 (H-10, d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.93 (H-8, dd, $J = 8.3$, 1.9 Hz, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.16 (H-5, d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 2.10-1.74 (m, 7H), 1.32 (H-17, s, 3H); **Iso B** 7.32 (H-7, d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.22 (H-10, d, $J = 8.6$, 1H), 7.00 (H-9, dd, $J = 8.5$, 1.9, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.10-1.81 (m, 7H), 1.42 (H-17, s, 3H), 1.33 (s, 3H).

Premalbranqueamida (35)

Polvo incoloro, p.f. 296 - 299 °C, UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ)= 233 y 288, RMN- H^1 MR (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7.33 (H-7, ddd, $J = 7.7$, 1H), 7.23 (H-10, s, 1H), 6.98 (H-8 y 9, ddd, 2H), 3.51 (H-5, d, $J = 10.6$, 1H), 3.14 (H-3, m, 1H) 2.95-2.80 (H-6, m, $J = 2$, 10 Hz, 2H), 2.33 (H-1, m, 1H), 2.27 (H-5, dd, $J = 9.0$ Hz, 1H), 2.16 (H-3, q, 1H), 2.00 (H-13, m, 2H), 1.87 (H-2, m, 2H), 1.51 (H-1, m, 1H), 1.41 (H-17, s, 3H), 1.32 (H-16, s, 3H).

4.6. Ensayos de Actividad Biológica

4.6.1. Determinación del efecto del extracto orgánico y de las fracciones sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa

La evaluación de la actividad biológica se determinó mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico en un equipo iMark (BioRad®) utilizando cajas de 96 pozos. Los valores de las absorbancias se registraron utilizando el programa Microplate Manager 6.

La determinación se realizó utilizando una concentración de 500 ppm para el extracto orgánico desgrasado y fracciones, mientras que para los compuestos puros una concentración de 2.5 mM. Como control positivo se utilizó a la acarbosa (10 μ M), se prepararon alícuotas en el rango de 0-24 μ L. Para los compuestos de prueba (inhibidores), 16 μ L de enzima de raspado de intestino de rata (40 mg del lisado intestinal en 1 mL de solución amortiguadora) o 1 U/mL de α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en amortiguador de fosfatos (6 μ L) y se incubó por 10 minutos a una temperatura de 37°C. Después del periodo de incubación se adicionó el sustrato (10 μ L de una solución 10 mM de *p*-NPG) e inmediatamente se realizó la primer lectura. A continuación, se incubó por segunda vez durante 30 min, y al finalizar el tiempo se realizó la segunda lectura.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición empleando la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = \left[1 - \frac{Ab_f - Ab_i}{Ab_b} \right] \times 100$$

Dónde A_{bf} corresponde al valor de absorbancia final (30 minutos), A_{bi} al valor de absorbancia al tiempo cero de cada muestra y A_{bb} a la absorbancia del blanco (pozo sin inhibidor). Los datos obtenidos de la ecuación fueron procesados con el programa Origin 9 para calcular la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

4.6.2. Evaluación *in vivo* de la malbranqueamida en la prueba de tolerancia oral a la sacarosa

La evaluación biológica *in vivo* de la malbranqueamida (**32**) aislada de *M. chryso sporoidea* se realizó mediante una prueba oral de tolerancia a la sacarosa (POTS)

en ratones macho ICR de 25-30 g de peso corporal. La evaluación se realizó en ratones normoglucémicos.

Los ratones utilizados fueron proporcionados por el Centro UNAM-Envigo (Envigo México S.A. de C.V.). Los animales se mantuvieron a temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al alimento y agua. El estudio fue realizado bajo los principios y recomendaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química (FQ/CICUAL/132/16).

Para realizar la prueba de tolerancia, los ratones normoglucémicos se dividieron en cinco grupos ($n = 8$). Los animales de experimentación se mantuvieron durante 4 horas en ayuno. Posteriormente al grupo I se le administró vehículo, al grupo II se le administró el control positivo (acarbosea; 5 mg/kg) y los grupos III-V fueron tratados con 3.1, 10 y 31.6 mg/kg del compuesto **32**. Al cabo de treinta minutos de la administración, los ratones recibieron una carga oral de sacarosa (3 g/kg). Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración. El porcentaje de variación de la glucemia fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Variación de glucemia: } \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100$$

Donde, G_i representa el valor de la glucemia inicial y G_t representa el valor de la glucemia al tiempo de determinación posterior a la administración de los tratamientos correspondientes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo describe el estudio químico del hongo *Malbranchea chryso sporoidea*, teniendo como finalidad contribuir al descubrimiento e investigación de nuevos metabolitos capaces de inhibir a las enzimas α -glucosidasas. La selección de la especie *M. chryso sporoidea* se realizó utilizando el criterio quimiotaxonómico, tomando en consideración que algunos estudios previos del género *Malbranchea* han resultado en la obtención de nuevos metabolitos biodinámicos. Además, la presente investigación representa el primer estudio químico de la especie *M. chryso sporoidea*, aportando al conocimiento químico del género.

El estudio químico de la especie fúngica se realizó a partir de la fermentación en mediana escala para obtener el extracto orgánico correspondiente. A continuación, se evaluó preliminarmente la actividad inhibitoria del EOT sobre las enzimas α -glucosidasa obtenidas de dos diferentes fuentes (levadura *Saccharomyces cerevisiae* y raspado intestinal de rata), presentando el preparado un 30 % de inhibición, revelando la presencia de compuestos con actividad biológica. En seguida, se realizó un fraccionamiento biodirigido con la finalidad de aislar a los metabolitos responsables de la actividad evaluada. Los compuestos obtenidos se purificaron y caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales. Finalmente, con el objetivo de correlacionar la actividad observada en los experimentos *in vitro* con una actividad antihiper glucémica, se llevó a cabo la evaluación *in vivo* del compuesto más abundante.

Los resultados obtenidos aplicando la metodología antes descrita se presentan a continuación. Se iniciará con la discusión de la evaluación del extracto desgrasado contra a las enzimas α -glucosidasas de mamífero. Posteriormente, se discutirán los resultados de estudio químico de la especie, así como los resultados de la actividad biológica de los productos aislados. Por último, se discutirá el ensayo de tolerancia a la sacarosa.

5.1 Estudio químico del extracto de *Malbranchea chryso sporoidea*

El EOT fue en primer lugar desgrasado, utilizando cantidades iguales de hexano y una mezcla de MeCN-MeOH (1:1), obteniéndose una fracción en donde se localizaban a los compuestos menos polares (Fx NP, 12.2780 g), y otra donde se localizaban a los metabolitos de interés (Fx P, 10.6836 g). Enseguida, la fracción Fx P se sometió a un

fraccionamiento secundario mediante CCA. Este procedimiento generó un total de 253 fracciones reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en un conjunto de 9 fracciones secundarias (F_I-F_{IX}) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Fraccionamiento secundario del EOT de *M. chrysosporioidea*.

Proporción de Disolventes (Hex-AcOEt-MeOH)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Rendimiento (mg)
70:30:0	1-51	1-2	Fx P-I	1.9875
65:35:0	52-61	3-18	Fx P-II	2.9454
60:40:0	62-70	19-28	Fx P-III	0.1486
50:50:0	71-86	29-64	Fx P-IV	0.2513
40:60:0	87-109	65-98	Fx P-V	1.5807
30:70:0	110-129	99-174	Fx P-VI	1.8773
20:80:0	130-138	175-200	Fx P-VII	0.3179
10:90:0	139-152	201-224	Fx P-VIII	0.8778
0:100:0	153-168	225-253	Fx P-IX	0.5914
0:90:10	169-185			
0:85:15	186-191			
0:80:20	192-210			
0:70:30	211-227			
0:60:40	228-244			
0:50:50	245-253			

Para la búsqueda de los metabolitos bioactivos, se llevó a cabo un fraccionamiento biodirigido, encontrándose que la fracción Fx P-II (2.9454 g) presentó la mejor actividad. La resolución cromatográfica de esta fracción (**Tabla 5**) indicó de nueva cuenta en el monitoreo de la actividad biológica que ésta se concentraba en la fracción Fx P-II.

Tabla 5. Fraccionamiento terciario de Fx P-II de *M. chrysosporioidea*.

Proporción de Disolventes (Hex-AcOEt)	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave	Rendimiento (mg)
90:10	1-164	1-22	Fx P-II-A	180.9
85:15	165-194	23-66	Fx P-II-B	868.8
80:20	195-299	67-123	Fx P-II-C	143.3
70:30	300-329	124-166	Fx P-II-D	17.5
60:40	330-351	167-172	Fx P-II-E	149.5
50:50	352-371	173-254	Fx P-II-F	12.5
20:80	372-381	255-284	Fx P-II-G	124.1
		285-320	Fx P-II-H	153.6
		321-342	Fx P-II-I	427.4
		343-372	Fx P-II-J	106.7
		373-379	Fx P-II-K	34.2
		380-381	Fx P-II-L	385.3

5.1.1 Aislamiento y purificación de los metabolitos activos

La purificación de los compuestos responsables de la actividad biológica presentes en la fracción Fx P-II-I se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). En primera instancia, se determinó el perfil cromatográfico usando una columna de fase reversa, tal como se detalla en la parte experimental. El cromatograma obtenido evidenció la presencia de al menos tres compuestos (P_1 , P_2 y P_3 ; **Figura 7**).

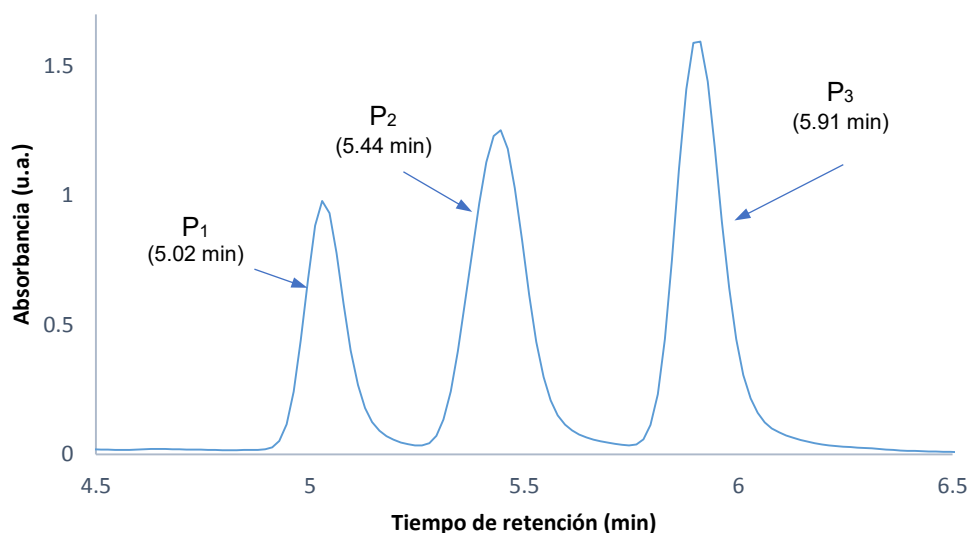


Figura 7. Cromatograma de la fracción Fx P-II-I (adquirido a 230 nm).

La purificación de los compuestos presentes en la fracción se realizó mediante CLAE en modo preparativo, resultando en el aislamiento de dos compuestos puros y una mezcla. El análisis los espectros de RMN- H^1 y espectrometría de masas reveló que los compuestos aislados correspondían al grupo de las malbranqueamidas, previamente reportadas para otras especies del género (Martínez-Luis et al., 2006; Miller et al., 2008; Finefield et al., 2012).

5.1.2 Caracterización estructural de la malbranqueamida (32), malbranqueamida B (33), isomalbranqueamida B (34) y premalbranqueamida (35)

El análisis de los compuestos aislados mediante cromatografía en capa delgada y, el uso de agentes cromógenos específicos, sugirió la presencia de compuestos de tipo alcaloideo. Adicionalmente, el análisis por espectrometría de masas permitió evidenciar la

presencia de al menos un átomo de nitrógeno en los productos analizados además de halogenados (ion molecular impar, característico de compuestos nitrogenados).

La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en los experimentos de RMN- ^1H con aquellos obtenidos en trabajos previos, confirmó la identidad de estos compuestos como malbranqueamida (**32**), malbranqueamida B (**33**), isomalbranqueamida B (**34**) y premalbranqueamida (**35**). En este sentido, los desplazamientos observados en todos los productos fueron muy similares, difiriendo únicamente en las señales de la región aromática correspondientes al anillo de indol (**Figuras 8-10**).

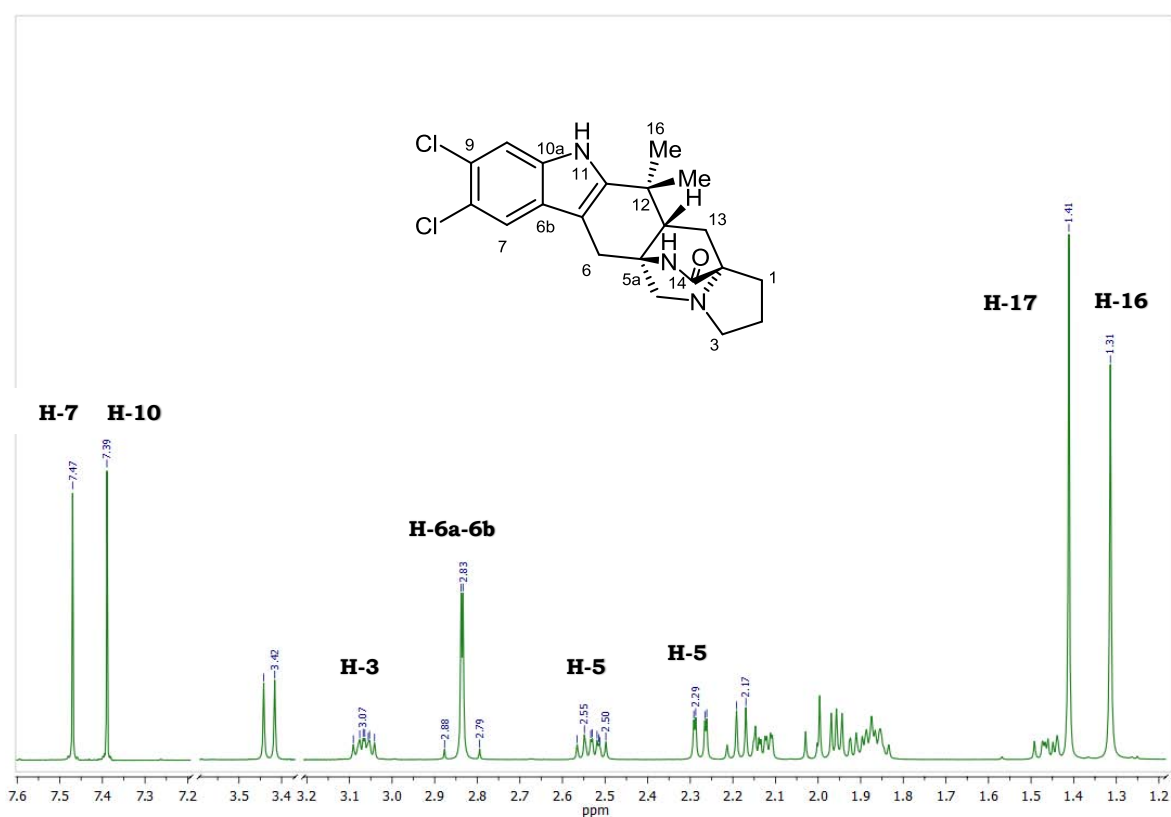


Figura 8. Espectro de ^1H -RMN para la malbranqueamida (**32**) (400 MHz, CD_3OD).

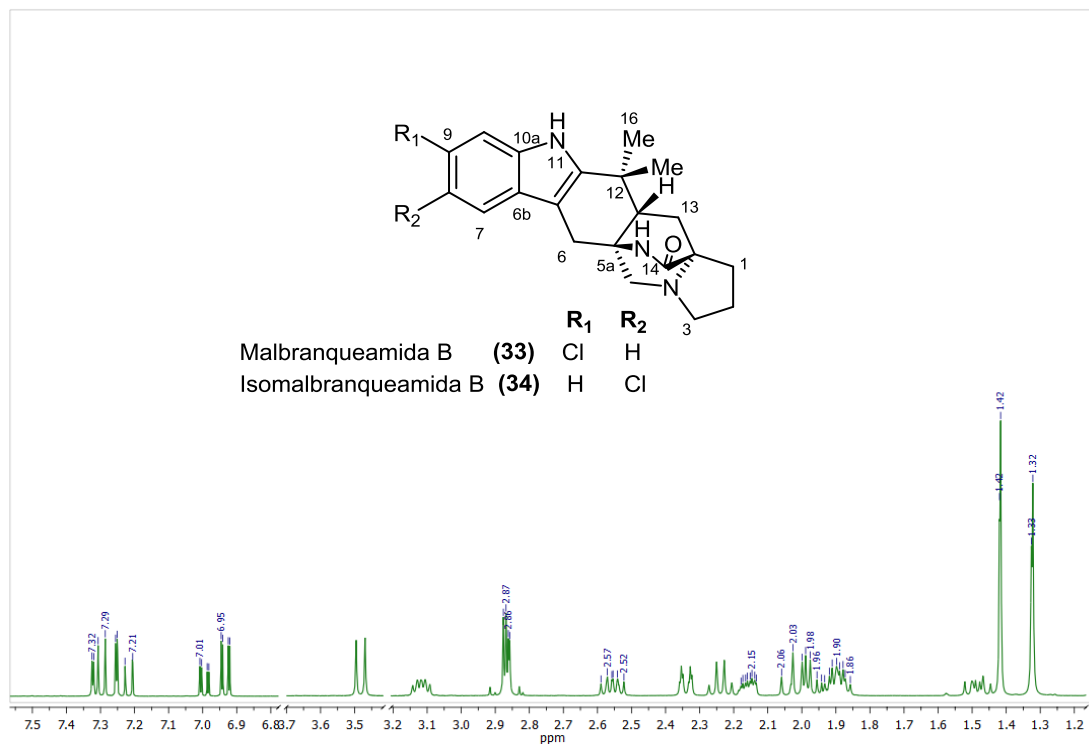


Figura 9. Espectro de H^1 -RMN de los productos **33** y **34** (400 MHz, CD_3OD).

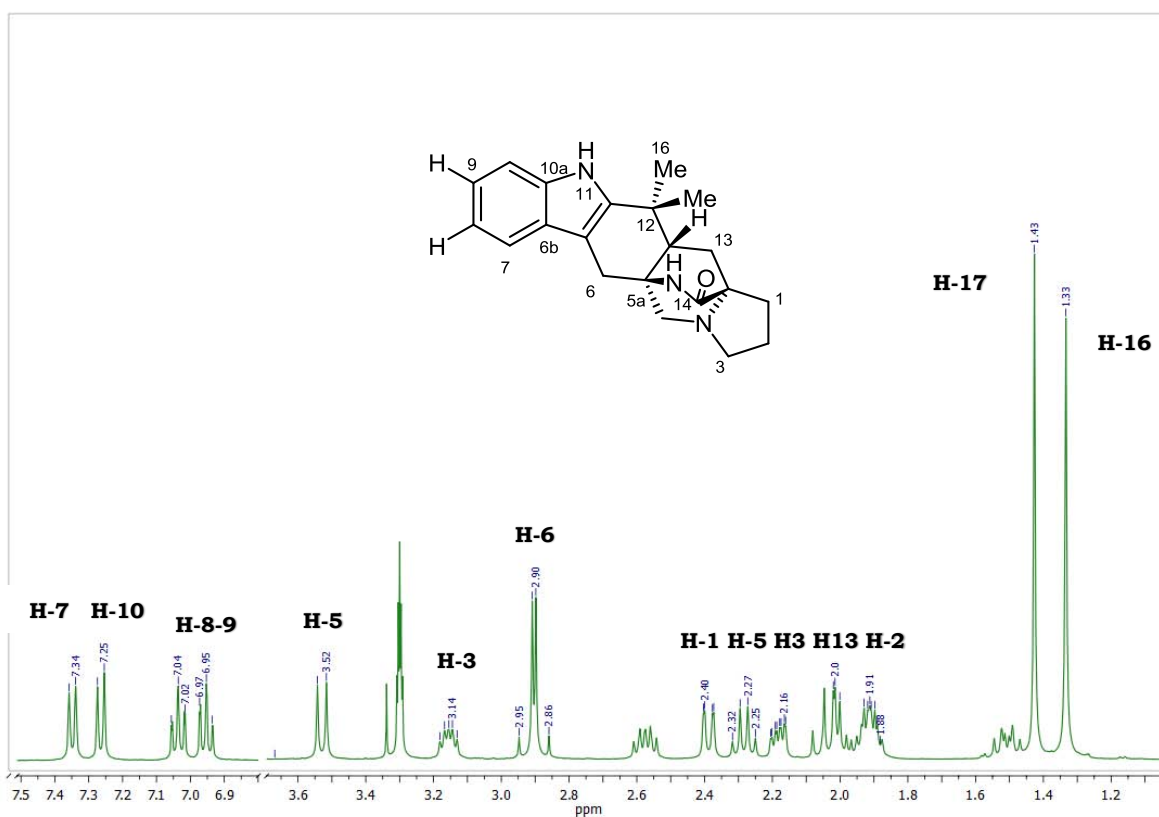


Figura 10. Espectro de H^1 -RMN para la premalbranqueamida (**35**) (400 MHz, CD_3OD).

La identidad de cada una de las malbranqueamidas aisladas se estableció mediante el análisis de los desplazamientos observados en los espectros de RMN. En primer lugar, las señales observadas en el espectro del producto bi-halogenado (**32**) indicaban la presencia de un sistema AB en el anillo aromático del grupo indol, denotado por dos singuletes en 7.48 ppm y 7.39 ppm, correspondientes a los protones H-7 y H-10, respectivamente. En el caso de la premalbranqueamida (**35**), se observa un sistema ABCD, para los protones en H-7, H-8, H-9 y H-10, en donde H-7 (δ_H 7.33 ppm) y H-10 (δ_H 7.23 ppm) se observan como doblete ($J = 7.7$ Hz). Por último, la mezcla de la malbranqueamida B (**33**) y la isomalbranqueamida B (**34**) se identificó por las señales correspondientes a los protones aromáticos, en donde en ambos casos se observó un sistema ABX, caracterizado por la multiplicidad de los protones H-7, H-8/H9 y H10; observándose para H-7 una señal doble ($J = 8.3$ Hz), para H-8/H-9 un doble de dobles ($J = 8.3, 1.9$ Hz) y para H-10 un doblete ($J = 1.7$ Hz) (**Figura 11**).

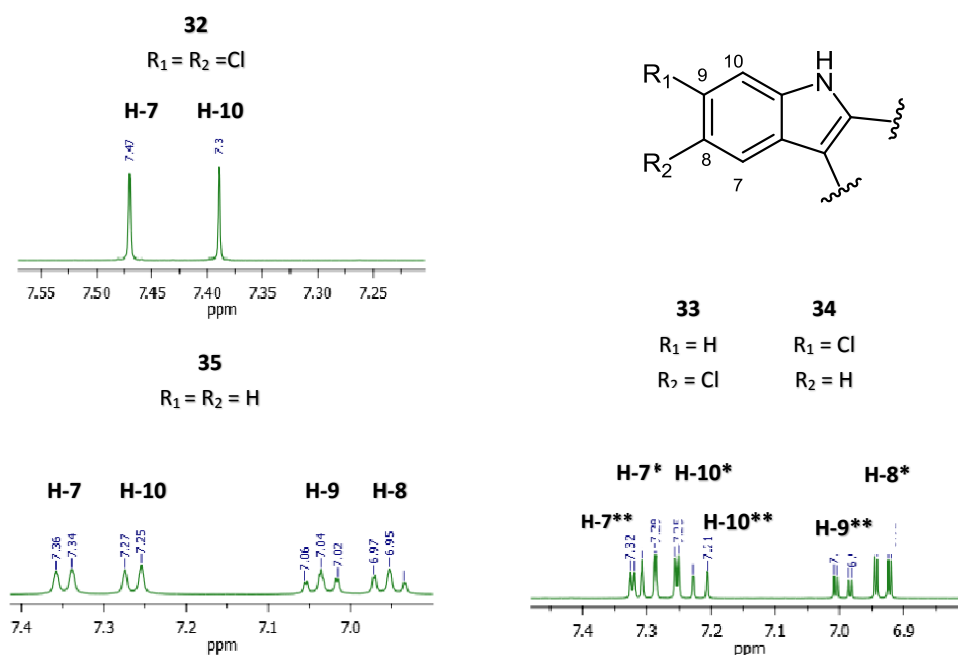


Figura 11. Vista parcial de la región aromática (6-8 ppm) de los espectros RMN-H¹ de los compuestos **32-35** (* Malbranqueamida B e ** Isomalbranqueamida B).

Los compuestos **32** y **33** fueron identificados por primera vez por Mata y colaboradores en el 2006. Estos metabolitos fueron aislados de la especie *Malbranchea aurantiaca*, un hongo obtenido de guano de murciélago. Esta familia de productos fúngicos

representa los únicos metabolitos con núcleo biciclo[2.2.2] diazaoctano en ser reportados para una especie que no corresponde a los géneros *Penicillium* o *Aspergillus*. Adicionalmente, las malbranqueamidas son los primeros miembros de esta clase de metabolitos en presentar una halogenación en el núcleo de tipo indol.

Hasta hace poco se pensaba que estos alcaloides eran producto exclusivo del metabolismo de *M. aurantiaca*, sin embargo, la purificación de malbranqueamida (**32**), malbranqueamida B (**33**) y premalbraqueamida (**35**) de *M. graminícola* indicaba que estos compuestos podrían ser comunes en el género *Malbranchea* (Finefield et al., 2012). De esta manera, el hallazgo en el presente trabajo de investigación sobre la producción de **32-35** por *M. chrysosporioidea*, corrobora la distribución biogenética de estos compuestos en el género *Malbranchea*.

Debido a su inusual y característico núcleo, las malbranqueamidas han sido objeto de estudio por varios grupos de investigación, desde el punto de vista biosintético o bien por su actividad biológica. En este sentido, y en un intento por descubrir nuevos herbicidas de origen natural, Martínez-Luis y colaboradores evaluaron el efecto fitotóxico de la malbranquemida (**32**) usando plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*. Los resultados obtenidos permitieron restablecer que **32** inhibe el crecimiento radicular de estas especies con una $CI_{50}=0.37\mu\text{M}$, comparable con el compuesto de referencia, el ácido 2,2-diclorofenoxiacético [2,4-D; $CI_{50}=0.18\mu\text{M}$] (Martínez-Luis et al., 2006). Después, con el objetivo de determinar el probable mecanismo de acción fitotóxico, se realizó una evaluación enzimática funcional usando la fosfodiesterasa PDE1 sensible a la calmodulina (CaM) como enzima monitora. La proteína CaM se encuentra implicada en procesos de desarrollo vegetal temprano a nivel celular, resultando en un blanco biológico para compuestos herbicidas. El alcaloide **32** tuvo un efecto de inhibición en la activación de PDE1 de manera dependiente a la concentración ($CI_{50}=3.65\pm 0.74\mu\text{M}$), efecto comparable al de la clorpromazina ($CI_{50}=2.75\pm 0.87\mu\text{M}$) un antagonista de la CaM bien caracterizado (Martínez-Luis et al., 2006). El probable potencial quimioterapéutico de los inhibidores de la PDE1, como la malbranqueamida (**32**), incluye aplicaciones en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, vasculares y cáncer, debido al efecto sobre las concentraciones de AMPc y GMPc.

Posteriormente, basados en la información generada sobre la actividad inhibitoria de la CaM por las malbranqueamidas, Figueroa y colaboradores determinaron por métodos de fluorescencia, dicroísmo circular en estado estacionario y estudios *in silico*, que los alcaloides **32-35** se unen al sistema Ca^{2+} -CaM, siendo **32**, **33** y **34** más afines que **35** (Figueroa et al., 2011).

En un estudio publicado por Madariaga y colaboradores, buscando aplicaciones terapéuticas en donde la actividad inhibitoria de la proteína CaM estuviera involucrada, se evaluó a los alcaloides **32**, **33** y **34** como inhibidores de la contracción en músculo liso. En este estudio se determinó que dichos metabolitos inducen un efecto vasorrelajante en aorta de rata, probablemente por mecanismos dependientes del endotelio y alcanzando efectos máximos de casi el 100%, poco común en productos naturales (CE_{50} 2.74, 33.28 y 25.49 μM , respectivamente). Sin embargo, los tres alcaloides fueron menos potentes que el carbacol (un agonista de receptor de acetilcolina muscarínico) y la nifedipina (un bloqueador de los canales de calcio) (Madariaga-Mazón et al., 2015).

Con el objetivo de enriquecer la información sobre la actividad biológica de las malbranqueamidas, y con la finalidad de descubrir nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas, en el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la evaluación de dicha actividad, que se describe a continuación.

5.3. Evaluación biológica de los compuestos aislados

5.3.1. Evaluación *in vitro* de los compuestos aislados contra las enzimas α -glucosidasas

La evaluación de la actividad biológica del extracto, fracciones y compuestos puros se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico empleando enzimas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y mamífero (raspado intestinal de rata). Este ensayo se basa en la cuantificación de *p*-nitrofenol generado a partir de la hidrólisis enzimática del α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenol (*p*-NPG) (**Figura 12**). El *p*-nitrofenol liberado se cuantifica a una longitud de onda de 415 nm y este es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

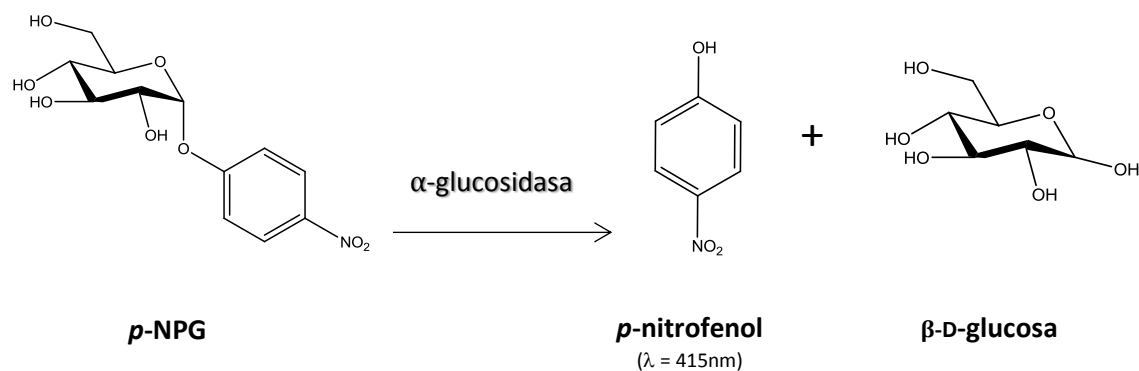


Figura 12. Reacción enzimática llevada a cabo en el experimento de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

Inicialmente, los compuestos fueron evaluados contra las enzimas obtenidas del raspado intestinal de rata en un rango de concentración de 0-2 mM. Todos los metabolitos inhibieron a las enzimas con una CI_{50} de alrededor de 1.5 mM. Sin embargo, no fueron más activos que la acarbosa, la cual fue usada como control positivo ($CI_{50} = 0.24 \pm 0.06$ mM). Los resultados mostraron que los 2 compuestos puros (**32** y **35**) y la mezcla (**33** y **34**) presentan una actividad moderada, con un efecto máximo de inhibición del 75%. No obstante, a pesar de que estas actividades no son mayores que la de acarbosa, son comparables con muchos productos naturales reportados como *i*- α G. Los resultados de la CI_{50} , así como el porcentaje de inhibición se indican en la **Tabla 6**. Las **Figuras 13-15** muestran las curvas concentración-respuesta de los metabolitos **32**, **33** y **34**, y **35** respectivamente.

Tabla 6. Evaluación de la CI_{50} y % de inhibición de las malbranqueamidas (**32-35**) utilizando enzimas de raspado intestinal de rata.

Compuestos	CI_{50} (mM)	% de Inhibición
32	1.40 ± 0.04	77.99
33-34	1.55 ± 0.05	76.65
35	1.64 ± 0.06	63.96
Acarbosa	0.24 ± 0.06	89.81

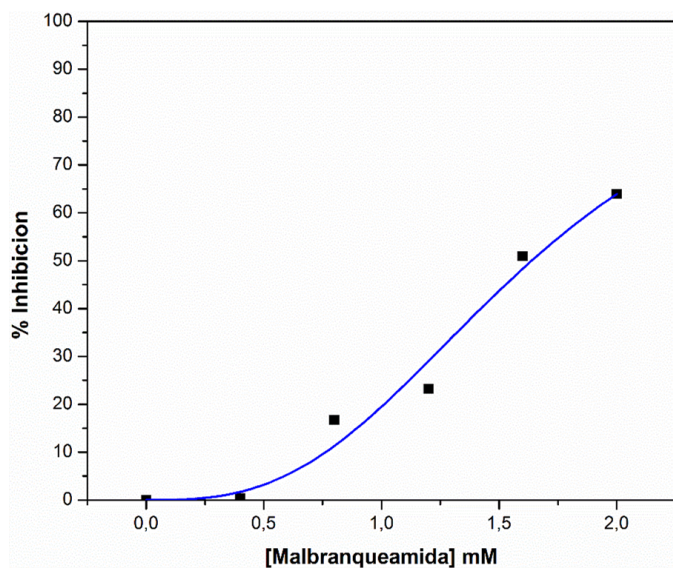


Figura 13. Curva C-R del compuesto **32** en enzima de mamífero.

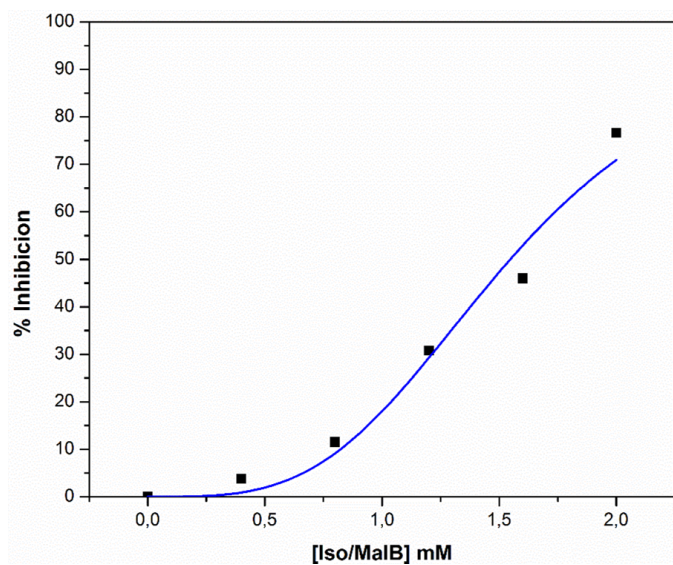


Figura 14. Curva C-R de los productos **33** y **34** en enzima de mamífero.

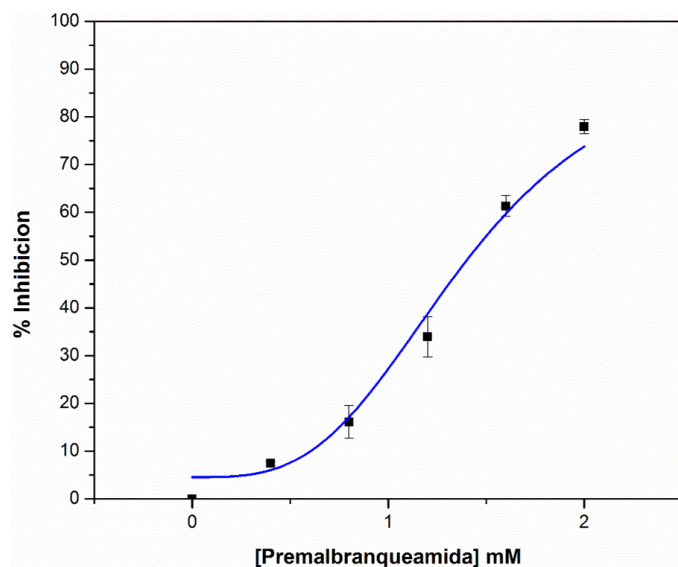


Figura 15. Curva C-R del compuesto **35** en enzima de mamífero.

Posteriormente, los compuestos fueron evaluados con la enzima de levadura en un rango de concentraciones de 0.0-0.6 mM. Todos los metabolitos inhibieron a las enzimas con una CI_{50} de alrededor de 0.4 mM. En este caso los metabolitos fueron más activos que la acarbosa ($CI_{50} = 0.706 \pm 0.028$), siendo la mezcla de (**33** y **34**) la más activa presentando una $CI_{50} = 260 \mu\text{M}$. Todos los productos presentaron un efecto máximo de inhibición cercanos al 100%. Los valores de CI_{50} , así como el porcentaje de inhibición de estas evaluaciones se indican en la **Tabla 7**. Las **Figuras 16-18** muestran las curvas concentración-respuesta de los metabolitos evaluados.

Tabla 7. Evaluación de la CI_{50} y % de inhibición de las malbranqueamidas (**32-35**) utilizando enzimas de levadura.

Compuestos	CI_{50} (mM)	% de Inhibición
32	0.407 ± 0.016	99.14
33-34	0.262 ± 0.003	99.32
35	$0.645 \pm 3.3E^{-4}$	99.50
Acarbosa	0.706 ± 0.028	77.12

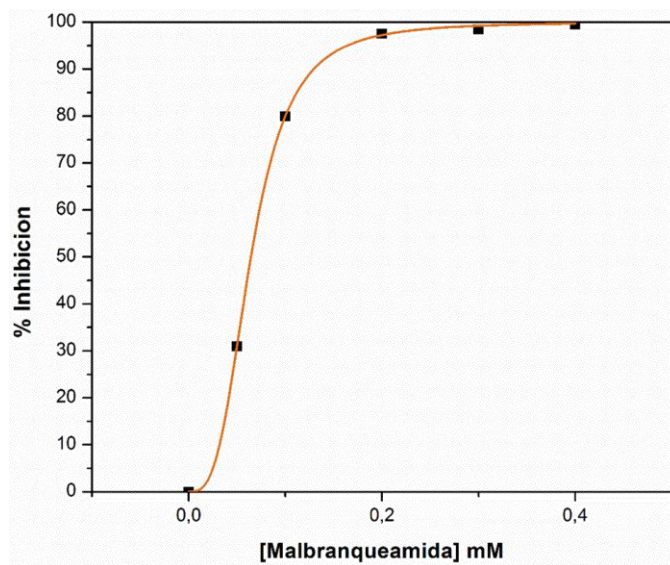


Figura 16. Curva C-R del compuesto **32** contra la enzima de levadura.

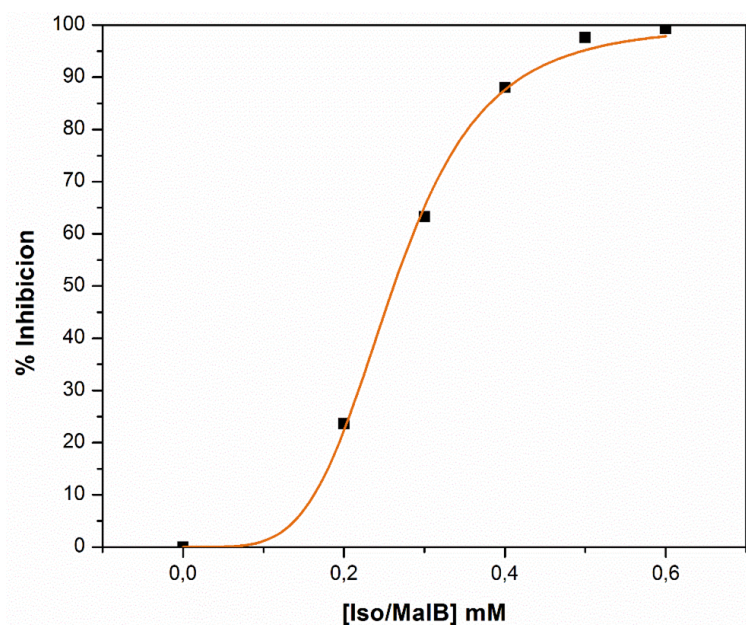


Figura 17. Curva C-R de los productos **33** y **34** contra la enzima de levadura.

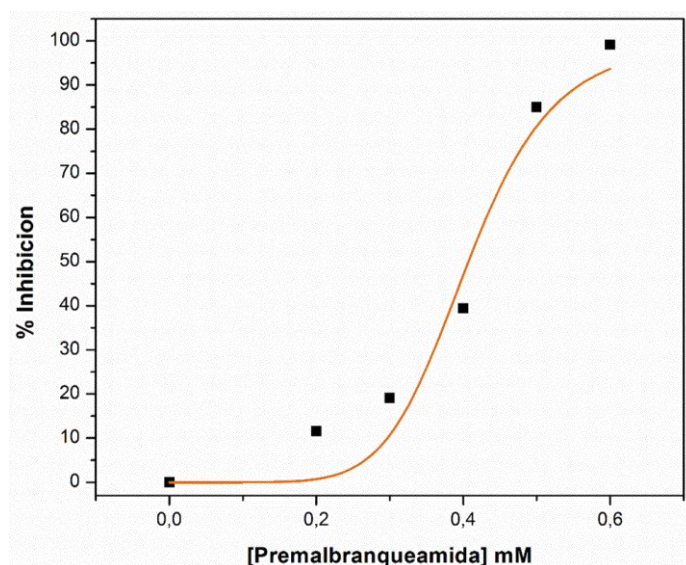
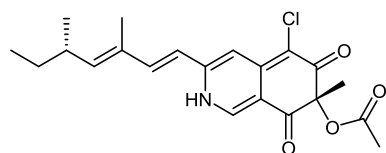


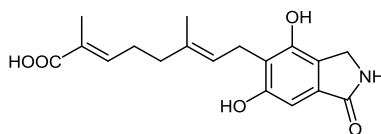
Figura 18. Curva C-R del compuesto **35** contra la enzima de levadura.

Los metabolitos secundarios halogenados poseen una gran variedad de actividades biológicas, lo que ha hecho posible su aplicación en la terapéutica y la agricultura vaya en aumento.

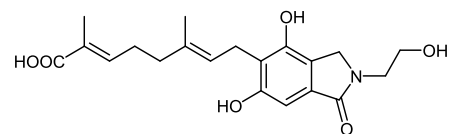
En este sentido, a la fecha se han descrito algunos compuestos fúngicos de naturaleza alcaloidea con actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas. Tal es el caso de la esclerotioramina (**87**), un alcaloide halogenado aislado de *Penicillium citreonigrum* con una actividad comparable a la de la acarbosa (Yuan et al., 2014); las eranicerinas C-F (**88-91**) producidas por *Hericium erinaceus*, un hongo comestible en el este de Asia (Wang et al., 2015), o bien la dicetopiperazina amaumina (**92**) aislada de *Aspergillus terreus*.



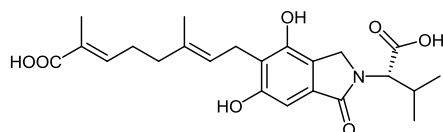
87



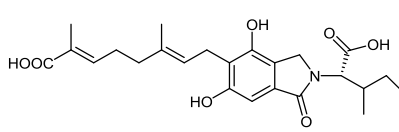
88



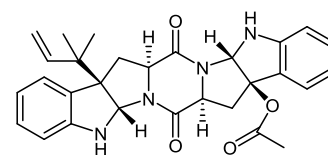
89



90



91



92

5.3.2 Evaluación *in vivo* del efecto de la malbranqueamida (**32**) en una prueba oral de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos

Con base en los resultados obtenidos y, con el objetivo de comprobar el efecto como agentes antihiperoglucémicos de los productos aislados, se decidió realizar la evaluación *in vivo* del compuesto **32**, debido a que fue el producto más abundante.

La malbranqueamida (**32**) se evaluó mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos (**Figura 19**). La finalidad de esta prueba es determinar si existe una disminución significativa del pico posprandial en las dosis evaluadas (3.1, 10 y 31.6 mg/kg).

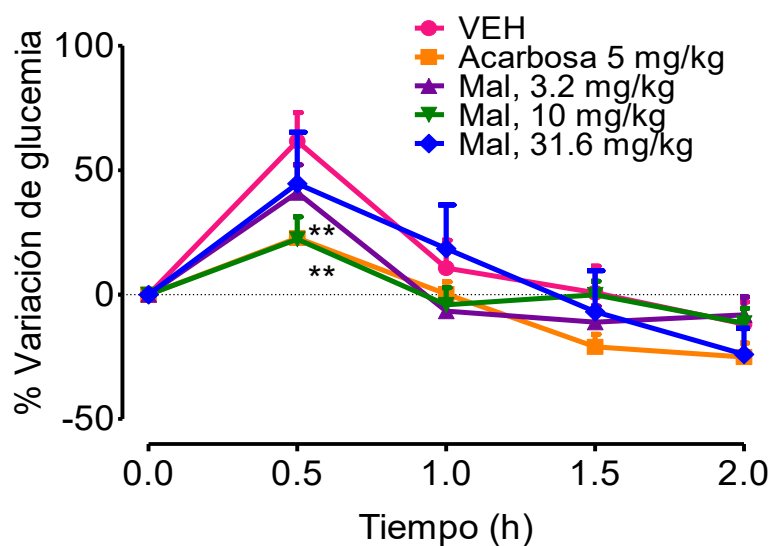


Figura 19. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos.

Como se puede observar en la **Figura 19**, el compuesto no provocó una disminución en el pico posprandial de manera significativa en ninguna de las tres dosis ensayadas. Estos resultados podrían explicarse en términos de la baja solubilidad de los compuestos en el vehículo utilizado.

6. CONCLUSIONES

- Ψ El estudio químico de *Malbranchea chrysosporoidea* resultó en el aislamiento de cuatro metabolitos pertenecientes al grupo de las malbranqueamidas: la malbranqueamida (**32**), la malbranqueamida B (**33**), la isomalbranqueamida B (**34**) y la premalbranqueamida (**35**).

- Ψ Este hallazgo resulta de particular interés para la química del género *Malbranchea*, siendo el tercer reporte de aislamiento de las malbranqueamidas en diferentes especies, lo que apoya la teoría de que estos productos podrían ser biogenéticamente comunes en el género.

- Ψ Los metabolitos **32-35** presentaron una actividad inhibitoria significativa sobre las enzimas α -glucosidasas aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* comparable con el control positivo. Sin embargo, el producto mayoritario, la malbranqueamida (**32**), no presentó actividad significativa en el modelo *in vivo*.

- Ψ El presente trabajo de investigación representa el primer estudio químico y de evaluación de la actividad biológica de la especie *M. chrysosporoidea*, contribuyendo así a la información generada hasta ahora para el género de ascomicetos *Malbranchea*.

7. PERSPECTIVAS

- Seguir con el estudio químico de las fracciones activas encontradas en el fraccionamiento biodirigido, con la finalidad de encontrar los metabolitos minoritarios.
- Realizar estudios teóricos de acoplamiento molecular (docking) para determinar el modo de interacción de las malbranqueamidas (**32-35**) con las enzimas α -glucosidasas.
- Llevar a cabo el aislamiento en mayor proporción de los alcaloides **33-35** para evaluar su actividad en un sistema *in vivo*.

8. REFERENCIAS

Abid, S.; Berraouan, A.; Bnouham, M. Natural alpha-glucosidase inhibitors: Therapeutic Implication and Structure-Activity Relationship. *Letters in Drug Design & Discovery*. **2016**, , 605–637.

Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. Fifty Years of Drug Discovery from Fungi. *Fungal Divers*. **2011**, *50*, 3–19.

Blackwell, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *Am. J. Bot.* **2011**, *98* (3), 426–438.

Brindis, F.; Rodríguez, R.; Bye, R.; González-Andrade, M.; Mata, R. (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum Porteri*, an α -Glucosidase Inhibitor. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (3), 314–320.

Chiung, Y.; Fujita, T.; Nakagawa, M.; Nozaki, H.; Chen, G.-Y.; Chen, Z.-C.; Nakayama, M. A Novel Quinone Antibiotic from *Malbranchea Cinnamomea* TAIM 13T54. *The Journal of Antibiotics* **1993**, *46* (12), 1819–1826.

Everett, C. J.; Frithsen, I.; Player, M. Relationship of Polychlorinated Biphenyls with Type 2 Diabetes and Hypertension. *J. Environ. Monit.* **2011**, *13*, 241–251.

Figuroa, M.; González-Andrade, M.; Sosa-Peinado, A.; Madariaga-Mazón, A.; Del Río-Portilla, F.; González, M. D. C.; Mata, R. Fluorescence, Circular Dichroism, NMR, and Docking Studies of the Interaction of the Alkaloid *Malbrancheamide* with Calmodulin. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (3), 378–385.

Finefield, J. M.; Frisvad, J. C.; Sherman, D. H.; Williams, R. M. Fungal Origins of the bicyclo[2.2.2]diazaoctane Ring System of Prenylated Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (4), 812–833.

Giacco, R.; Costabile, G.; Riccardi, G. Metabolic Effects of Dietary Carbohydrates: The Importance of Food Digestion. *Food Res. Int.* **2015**, 1–6.

Gowtham, M.; Asharani, I. V.; Paridhavi, M.; Thirumalai, D. A Comprehensive Review on Folklore Antidiabetic Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2016**, *39* (2), 213–215.

Hayashi, H.; Nishimoto, Y.; Akiyama, K.; Nozaki, H. New Paralytic Alkaloids, Asperparalines A, B and C, from *Aspergillus Japonicus* JV-23. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64* (1), 111–115.

Hosoe, T.; Iizuka, T.; Komai, S. I.; Wakana, D.; Itabashi, T.; Nozawa, K.; Fukushima, K.; Kawai, K. I. 4-Benzyl-3-Phenyl-5H-Furan-2-One, a Vasodilator Isolated from *Malbranchea Filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry* **2005**, *66* (23), 2776–2779.

IDF. **2015**. International Diabetes Federation Atlas (7th Ed)

IDF. **2016**. Factores de Riesgo Obtenido el 17 de Octubre de 2016, de <http://www.idf.org/node/26455>

INEGI. **2013**. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Obtenido el 17 de Octubre de 2016, de <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Jeong, E. Y.; Cho, K. S.; Lee, H. S. α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitors Isolated from *Triticum Aestivum* L. Sprouts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2012**, *55* (1), 47–51.

Jong-Anurakkun, N.; Bhandari, M. R.; Hong, G.; Kawabata, J. α -Glucosidase Inhibitor from Chinese Aloes. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 456–457.

Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. Notoamides A-D: Prenylated Indole Alkaloids Isolated from a Marine-Derived Fungus, *Aspergillus* Sp. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46* (13), 2254–2256.

Lebovitz, H. E. Alpha-Glucosidase Inhibitors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **1997**, *26* (3), 539–551.

Liu, Q.; Hu, H. J.; Li, P. F.; Yang, Y. B.; Wu, L. H.; Chou, G. X.; Wang, Z. T. Diterpenoids and Phenylethanoid Glycosides from the Roots of *Clerodendrum Bungei* and Their Inhibitory Effects against Angiotensin Converting Enzyme and α -Glucosidase. *Phytochemistry* **2014**, *103*, 196–202.

Madariaga-Mazón, A.; Hernández-Abreu, O.; Estrada-Soto, S.; Mata, R. Insights on the Vasorelaxant Mode of Action of Malbrancheamide. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67* (4), 551–558.

Martínez-Luis, S.; González, M. C.; Ulloa, M.; Mata, R. Phytotoxins from the Fungus *Malbranchea Aurantiaca*. *Phytochemistry* **2005**, *66* (9), 1012–1016.

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 (8), 1817–1822.

Miller, K. A.; Figueroa, M.; Valente, M. W. N.; Greshock, T. J.; Mata, R.; Williams, R. M. Calmodulin Inhibitory Activity of the Malbrancheamides and Various Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (24), 6479–6481.

Naveed, M. A.; Riaz, N.; Saleem, M.; Jabeen, B.; Ashraf, M.; Ismail, T.; Jabbar, A. Longipetalosides A-C, New Steroidal Saponins from *Tribulus Longipetalus*. *Steroids* **2014**, 83, 45–51.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (3), 629–661.

Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales en el laboratorio.

Okada, K.; Takizawa, K.; Maebayashi, Y.; Nishimura, K.; Miyaji, M.; Fukushima, K. Ubiquinone System, GC Contents and Cellular Fatty Acid Composition of Species of the Form-Genus *Malbranchea* and *Coccidioides Immitis* for Chemotaxonomic Study. *Mycoscience* **1995**, 36 (4), 385–389.

OMS. 2016. Complicaciones de la diabetes. Obtenido el 29 de Octubre de 2016, de http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index3.html

Saito, M.; Matsuura, I.; Okazaki, H. Tf-26Vx, an Antibiotic Produced by a Thermophilic Fungus. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1979**, 32 (11), 1210–1212.

Sanz-Cervera, J. F.; Williams, R. M.; Alberto Marco, J.; María López-Sánchez, J.; González, F.; Eugenia Martínez, M.; Sancenón, F. A Synthetic Model for the [4+2] Cycloaddition in the Biosynthesis of the Brevianamides, Paraherquamides, and Related Compounds. *Tetrahedron* **2000**, 56 (34), 6345–6358.

Schlegel, B.; Hartl, A.; Gollmick, F. A. 7-Methoxy-2,3-Dimethylbenzofuran-5-Ol, a New Antioxidant from *Malbranchea Cinnamomea* HKI 0286. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2003a**, 56 (9), 792–794.

Schlegel, B.; Hanel, F.; Gollmick, F. A.; Saluz, H.-P.; Gräfe, U. New Quinones and Hydroquinones from *Malbranchea*. *The Journal of Antibiotics*, **2003b**, *56* (11), 917–922.

Skliros, N. P.; Vlachopoulos, C.; Tousoulis, D. Treatment of Diabetes: Crossing to the Other Side. *Hell. J. Cardiol.* **2016**, 1–10.

Tahrani, A. A.; Barnett, A. H.; Bailey, C. J. Pharmacology and Therapeutic Implications of Current Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 566–592.

Trinh, B. T. D.; Staerk, D.; Jäger, A. K. Screening for Potential α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Constituents from Selected Vietnamese Plants Used to Treat Type 2 Diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *186*, 189–195.

Wakana, D.; Hosoe, T.; Wachi, H.; Itabashi, T.; Fukushima, K.; Yaguchi, T.; Kawai, K. The Cytotoxic and Antifungal Activities of Two New Sesquiterpenes, Malfilanol A and B, Derived from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2009**, *62* (4), 217–219.

Wang, K.; Bao, L.; Qi, Q.; Zhao, F.; Ma, K.; Pei, Y.; Liu, H. Erinacerins c-L, Isoindolin-1-Ones with α -Glucosidase Inhibitory Activity from Cultures of the Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (1), 146–154.

Wang, S.-M.; Han, J.-J.; Ma, K.; Jin, T.; Bao, L.; Pei, Y.-F.; Liu, H. W. New α -Glucosidase Inhibitors with P-Terphenyl Skeleton from the Mushroom *Hydnellum concrescens*. *Fitoterapia* **2014**, *98*, 149–155.

Williams, R. M. Total Synthesis and Biosynthesis of the Paraherquamides: An Intriguing Story of the Biological Diels-Alder Construction. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2002**, *50* (6), 711–740.

Williams, R. M.; Cox, R. J. Paraherquamides, Brevianamides, and Asperparalines: Laboratory Synthesis and Biosynthesis. An Interim Report. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 127–139.

Yang, J. R.; Luo, J. G.; Kong, L. Y. Determination of α -Glucosidase Inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Using Liquid Chromatography with Quadrupole Time of Flight Tandem Mass Spectrometry Coupled with Centrifugal Ultrafiltration. *Chin. J. Nat. Med.* **2015**, *13* (3), 208–214.

Yang, Y.-L.; Liao, W.-Y.; Liu, W.-Y.; Liaw, C.-C.; Shen, C.-N.; Huang, Z.-Y.; Wu, S.-H. Discovery of New Natural Products by Intact-Cell Mass Spectrometry and LC-SPE-NMR:

Malbranpyrroles, Novel Polyketides from Thermophilic Fungus *Malbranchea Sulfurea*. *Chemistry* **2009**, *15* (43), 11573–11580.

Yuan, W. H.; Wei, Z. W.; Dai, P.; Wu, H.; Zhao, Y. X.; Zhang, M. M.; Jiang, N.; Zheng, W. F. Halogenated Metabolites Isolated from *Penicillium Citreonigrum*. *Chem. Biodivers.* **2014**, *11* (7), 1078–1087.

Yue, Y.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Min, Q.; Wan, L.; Wang, Y.; Xiao, Z.; Chen, J. Xanthone Glycosides from *Swertia Bimaculata* with α -Glucosidase Inhibitory Activity. *Plant Med* **2014**, *80*, 502–508.

Zhang, L.; Bai, B.; Liu, X.; Wang, Y.; Li, M.; Zhao, D. α -Glucosidase Inhibitors from Chinese Yam (*Dioscorea Opposita* Thunb.). *Food Chem.* **2011**, *126* (1), 203–206.

Zhang, L.; Tu, Z.-C.; Yuan, T.; Wang, H.; Xie, X.; Fu, Z.-F. Antioxidants and α -Glucosidase Inhibitors from *Ipomoea Batatas* Leaves Identified by Bioassay-Guided Approach and Structure-Activity Relationships. *Food Chem.* **2016**, *208*, 61–67.