



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

ESPECIES SELECTAS DE ASCOMICETOS COMO UNA FUENTE DE  
INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS ALFA-GLUCOSIDASAS Y PROTEÍNA  
TIROSINA FOSFATASA 1B

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Marzo 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

- PRESIDENTE:** Dra. Adela Rodríguez Romero  
**VOCAL:** Dr. Francisco Hernández Luis  
**VOCAL:** Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez  
**VOCAL:** Dr. Martin González Andrade  
**SECRETARIO:** Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

### **Lugar donde se desarrolló el proyecto de tesis:**

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

### **Presentaciones en congresos:**

- 58<sup>th</sup> ASP Meeting del 29 de julio al 2 de agosto de 2017 en Portland, Oregon, EUA (Cartel).

### **Publicaciones:**

- Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Madariaga-Mazón, M., Figueroa, M., Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 3, 582-58.
- Rangel-Grimaldo, M., Macías-Rubalcava, M. L., González-Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 3, 675-683.

---

M. en C. Manuel Eduardo Rangel Grimaldo  
Sustentante

---

Dra. Rachel Mata Essayag  
Tutora

## AGRADECIMIENTOS

- Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de formar parte de esta grandiosa institución y permitirme ampliar mi formación académica y profesional.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado (Becario/CVU: 294309/539676) y, de igual manera, por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT CB A1-S-11226 y DGAPA IN 217320, indispensables para la realización del presente trabajo.
- A la Dra. Rachel Mata Essayag, por darme la oportunidad de ser parte de su increíble equipo de trabajo; por toda la ayuda, consejos, enseñanzas, paciencia, comprensión y confianza otorgados durante el desarrollo de este proyecto. Muchísimas Gracias.
- A los técnicos académicos, Dra. Araceli Pérez Vásquez, Dra. Isabel Rivero Cruz, Dr. Abraham Madariaga Mazón y Berenice Ovalle Magallanes, por brindarme sus conocimientos, su apoyo y, sobretodo, su invaluable amistad. Muchas gracias.
- A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por todo el apoyo y consejos recibidos a lo largo del presente trabajo.
- Al Laboratorio del Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN), del Instituto de Química de la UNAM, el cual es financiado por el proyecto CONACYT-0224747 y la UNAM.
- Al instituto de Química de la UNAM y a los técnicos académicos Dra. Beatriz Quiroz García, Q. María de los Ángeles Peña González, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Dr. Francisco Javier Pérez Flores, Dra. María del Carmen García González y QFB. María del Rocío Patiño Maya, por el apoyo recibido en el registro de los espectros de RMN, IR, UV, DC y espectroscopia de masas.

- A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, por los recursos proporcionados para llevar a cabo los cálculos computacionales a través del clúster de supercómputo Miztli (LANCAD-UNAM-DGTIC-313).
- Al Dr. Martin González Andrade de la Facultad de Medicina, por brindarnos la enzima PTP-1B, indispensable para la evaluación de actividad biológica, así como por todo el apoyo recibido.
- Al Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Greensboro, Carolina del Norte, E.U.A., por su apoyo en la caracterización taxonómica de los organismos fúngicos.
- Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, por todos los consejos, enseñanzas y apoyo recibido durante la realización de este trabajo.
- A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo y al Dr. Francisco Hernández Luis, por sus valiosas observaciones y consejos recibidos durante el desarrollo de este proyecto.
- A los miembros del jurado, por las revisiones y observaciones realizadas, las cuales enriquecieron el presente trabajo.
- A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio 124 y 125, por su ayuda y amistad, gracias a todos.

## DEDICATORIAS

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
1.1. Diabetes mellitus .....	5
1.2. Tratamiento de la diabetes mellitus .....	8
1.3. Inhibidores de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas utilizados en el tratamiento de la diabetes .....	12
1.3.1. Inhibidores selectos de la enzima $\alpha$ -glucosidasa obtenidos a partir de fuentes naturales .....	15
1.4. Inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B).....	17
1.4.1. Proteína tirosina fosfatasa 1B.....	19
1.4.2. Inhibidores selectos de la PTP-1B obtenidos a partir de fuentes naturales ....	21
1.5. Productos naturales de origen fúngico como fuente de compuestos bioactivos ....	22
1.6. Antecedentes del genero <i>Preussia</i> .....	24
1.7. Antecedentes de las especie <i>Preussia minimoides</i> .....	28
1.8. Antecedentes del genero <i>Malbranchea</i> .....	30
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1. Hipótesis .....	38
3.2. Objetivo .....	38
3.3. Objetivos Particulares.....	38
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>40</b>
4.1. Material fúngico .....	40
4.1.1. <i>Preussia minimoides</i> .....	40
4.1.2. <i>Malbranchea circinata</i> .....	40
4.2. Procedimientos generales .....	41
4.2.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas ..	41
4.2.2. Análisis cromatográficos.....	42
4.3. Preparación de los cultivos y obtención de los extracto orgánicos .....	43

4.4.	Estudio químico de la especie <i>Preussia minimoides</i> .....	44
4.4.1.	Fraccionamiento del extracto orgánico.....	44
4.4.2.	Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en <i>P. minimoides</i> .....	45
4.4.3	Obtención de mayor cantidad de minimoidionas A ( <b>114</b> ) y B ( <b>115</b> ) mediante la adición de sulfato de dietilo (DES) al medio de cultivo para inducir la producción de metabolitos secundarios .....	46
4.4.3.1	Preparación de la Suspensión Inicial de Esporas (SIE) .....	46
4.4.3.2	Tratamiento la suspensión de esporas de <i>P. minimoides</i> con DES .....	46
4.5.	Estudio químico de la especie <i>Malbranchea circinata</i> .....	48
4.5.1.	Fraccionamiento del extracto orgánico.....	48
4.5.2.	Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en <i>M. circinata</i> .....	50
4.6.	Hidrolisis ácida del compuesto <b>122</b> .....	53
4.7.	Ensayos biológicos .....	53
4.7.1.	Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
4.7.2.	Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B .....	55
4.7.2.1.	Expresión y purificación de la enzima <i>h</i> PTP-1B .....	55
4.7.2.2.	Ensayo de inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B .....	55
4.8.	Prueba de tolerancia oral a la sacarosa para la malbranqueamida .....	56
4.9.	Cálculos computacionales .....	57
4.10.	Estudios de acoplamiento molecular .....	58
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>60</b>
5.1.	Estudio químico de la especie <i>Preussia minimoides</i> .....	60
5.1.1.	Caracterización estructural de la minimoidiona A ( <b>118</b> ) .....	63
5.2.	Ensayos biológicos .....	68
5.2.1.	Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura. 68	
5.2.2.	Evaluación del efecto inhibitorio sobre la PTP-1B humana.....	69
5.3.	Estudios de Acoplamiento Molecular.....	70
5.3.1.	Enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	70
5.3.2.	Enzimas $\alpha$ -glucosidasas de humano .....	77
5.3.3.	Enzima PTP-1B de <i>Homo sapiens</i> .....	78
5.4.	Estudio químico de la especie <i>Malbranchea circinata</i> .....	83
5.4.1.	Compuesto <b>120</b> .....	85
5.4.2.	Compuesto <b>121</b> .....	89
5.4.3.	Compuestos <b>122</b> , <b>123</b> y <b>124</b> .....	91



5.4.4. Compuesto <b>125</b> .....	97
5.4.5. Compuesto <b>126</b> .....	99
5.4.6. Compuesto <b>127</b> .....	102
5.4.7. Compuesto <b>128</b> .....	105
5.4.8. Compuestos previamente reportados.....	108
5.5. Ensayos biológicos .....	108
5.5.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	108
5.5.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B humana .....	110
5.6. Estudios de Acoplamiento Molecular.....	111
5.6.1. Enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura.....	111
5.6.2. Enzimas $\alpha$ -glucosidasas humanas .....	120
5.6.3. Proteína tirosina fosfatasa 1B humana.....	121
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>130</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>131</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>144</b>
ANEXO 1 .....	144
ANEXO 2 .....	180
ANEXO 3 .....	257

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Criterios de diagnóstico para la diabetes (Tomado de IDF Atlas, 9 ed. 2019).	6
2	Número de personas con DM por región (IDF Atlas, 9 ed. 2019).	7
3	Proyección de personas con DM a nivel mundial (IDF Atlas, 9 ed. 2019).	7
4	Principales complicaciones de la diabetes (Modificado de IDF Atlas, 8 ed. 2017).	8
5	Mecanismo de acción de los fármacos más usados para el tratamiento de DMT2.	9
6	Mecanismo de reacción de la hidrólisis del enlace glicosídico con retención de la configuración <b>(A)</b> y con inversión de la configuración <b>(B)</b> .	12
7	Ubicación de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas.	13
8	Clasificación de las PTP humanas. El gen que codifica cada PTP está en paréntesis (Rong-jun et al., 2014).	18
9	Mecanismo de reacción de las PTPs (Kolmodin y Åqvist, 2001).	19
10	Vías de señalización que involucran PTP-1B (Tomado de Rong-jun et al., 2014).	20
11	Fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019 (Newman y Cragg, 2020).	23
12	<i>Preussia minimoides</i> .	29
13	Ruta biosintética de la malbranqueamida y la espiromalbramida (Fraleley et al., 2017).	34
14	Cromatograma obtenido del fraccionamiento secundario de la fracción MeCN-MeOH de <i>P. minimoides</i> M479ME.	48
15	Cromatograma del fraccionamiento primario tipo flash de la fracción MeCN-MeOH de <i>M. circinata</i> .	49
16	Cromatograma del fraccionamiento secundario tipo flash de la fracción F2 de <i>M. circinata</i> .	51
17	Cromatograma del fraccionamiento secundario tipo flash de la fracción F7 de <i>M. circinata</i> .	52
18	Estructuras de los compuestos aislados de <i>P. minimoides</i> .	61
19	Placas de CCF para los extractos obtenidos de las cepas tratadas con DES observadas a 254 nm <b>(a)</b> , 364 nm <b>(b)</b> .	61
20	Estructuras parciales <i>a</i> y <i>b</i> ; correlaciones selectas de HMBC y NOESY de la minimoidiona A <b>(118)</b> .	64

<b>21</b>	Comparación del espectro DCE experimental de la minimoidiona A (negro) con los calculados utilizando B3LYP/6-31+G(d) para los enantiómeros 7a <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,11a <i>S</i> (rojo) y 7a <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,11a <i>R</i> (azul).	<b>66</b>
<b>22</b>	Representación ORTEP de la estructura del compuesto <b>118</b> determinada cristalográficamente.	<b>66</b>
<b>23</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>118</b>	<b>67</b>
<b>24</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>118</b> .	<b>67</b>
<b>25</b>	Espectro NOESY del compuesto <b>118</b> mostrando las principales interacciones.	<b>68</b>
<b>26</b>	a) Vista general de la α-glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> (PDB 3A4A), dominio A (azul), dominio B (rojo) y dominio C (verde). b) Vista de los residuos catalíticos en anaranjado y la glucosa en verde. c) Cavidad del sitio catalítico formada por el dominio A (azul) y B (rojo), al fondo en verde se observa la glucosa.	<b>71</b>
<b>27</b>	Posibles sitios de unión para la acarbosa (verde azulado), minimoidiona A (verde), minimoidiona B isómero- <i>S</i> (amarillo) en el sitio catalítico (recuadro rojo) y el isómero- <i>R</i> (anaranjado) en un sitio alosterico (recuadro azul) con la enzima α-glucosidasa de levadura (cian, PDB 3A4A).	<b>73</b>
<b>28</b>	Representación en 3D del modo de unión de la acarbosa con la αGHY.	<b>73</b>
<b>29</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con la αGHY.	<b>74</b>
<b>30</b>	Representación en 3D del modo de unión de la minimoidiona A con la αGHY.	<b>74</b>
<b>31</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidiona A con la αGHY.	<b>75</b>
<b>32</b>	Representación en 3D del modo de unión de la minimoidiona B, isómero- <i>S</i> con la αGHY.	<b>75</b>
<b>33</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidiona B, isómero- <i>S</i> con la αGHY.	<b>76</b>
<b>34</b>	Representación en 3D del modo de unión de la minimoidiona B, isómero- <i>R</i> con la αGHY.	<b>76</b>
<b>35</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidiona B, isómero- <i>R</i> con la αGHY.	<b>77</b>
<b>36</b>	A) Asa pTyr (residuos 43–49; rosa), asa R (residuos 113–118; amarillo), asa Lys120 (residuos 119–120; rojo), asa WPD (residuos 177–185; cian), asa S (residuos 201–209; anaranjado), asa P (residuos 215–221; azul) y asa Q (residuos 261-263; violeta). B) Residuos catalíticos.	<b>79</b>

<b>37</b>	Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (morado) y la minimoidiona B isómero-S ( <b>119-S</b> ; amarillo) con la PTP-1B (verde, PDB 1SUG).	<b>80</b>
<b>38</b>	Representación en 3D del modo de unión del ácido ursólico con la PTP-1B.	<b>81</b>
<b>39</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B.	<b>81</b>
<b>40</b>	Representación en 3D del modo de unión de la minimoidiona B, isómero-S ( <b>119</b> ) con la PTP-1B.	<b>82</b>
<b>41</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidiona B, isómero-S ( <b>119</b> ) con la PTP-1B.	<b>82</b>
<b>42</b>	Representación del sitio de unión de la minimoidiona B ( <b>119-S</b> ) con la PTP-1B, se observa como <b>119-S</b> se une en la parte externa del sitio catalítico.	<b>83</b>
<b>43</b>	Estructuras de los compuestos aislados de <i>M. circinata</i> .	<b>84</b>
<b>44</b>	Estructuras parciales <i>a</i> y <i>b</i> ; correlaciones selectas de HMBC del compuesto <b>120</b> .	<b>86</b>
<b>45</b>	Correlación clave observada en el espectro NOESY para el compuesto <b>120</b> .	<b>86</b>
<b>46</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CD <sub>3</sub> OD) del compuesto <b>120</b> .	<b>87</b>
<b>47</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CD <sub>3</sub> OD) del compuesto <b>120</b> .	<b>87</b>
<b>48</b>	Espectro de COSY del compuesto <b>120</b> .	<b>88</b>
<b>49</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CD <sub>3</sub> OD) del compuesto <b>121</b> .	<b>89</b>
<b>50</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CD <sub>3</sub> OD) del compuesto <b>121</b> .	<b>90</b>
<b>51</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> +gotas de CD <sub>3</sub> OD) de <b>122</b>	<b>92</b>
<b>52</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> +gotas de CD <sub>3</sub> OD) de <b>122</b> .	<b>93</b>
<b>53</b>	Correlaciones HMBC selectas para <b>123</b> y <b>124</b> .	<b>93</b>
<b>54</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>123</b> .	<b>94</b>
<b>55</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>123</b> .	<b>94</b>
<b>56</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>124</b> .	<b>95</b>
<b>57</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>124</b> .	<b>95</b>
<b>58</b>	Comparación de la estructura de la crisofaneína y el compuesto <b>125</b> .	<b>97</b>
<b>59</b>	Correlaciones HMBC selectas del compuesto <b>125</b> .	<b>97</b>
<b>60</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>125</b> .	<b>98</b>
<b>61</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>125</b> .	<b>98</b>
<b>62</b>	Estructura de la ravenelina comparada a la del compuesto <b>126</b> .	<b>100</b>
<b>63</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>126</b> .	<b>100</b>

<b>64</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>126</b> .	<b>101</b>
<b>65</b>	Correlaciones HMBC selectas del compuesto <b>127</b> .	<b>102</b>
<b>66</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>127</b> .	<b>103</b>
<b>67</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>127</b> .	<b>103</b>
<b>68</b>	Correlaciones HMBC selectas del compuesto <b>127</b> .	<b>105</b>
<b>69</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>128</b> .	<b>106</b>
<b>70</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>128</b> .	<b>106</b>
<b>71</b>	Curva de tolerancia oral a la sacarosa de la malbranqueamida ( <b>89</b> ).	<b>109</b>
<b>72</b>	Posible modo de unión del compuesto <b>72</b> (rosa), <b>89</b> (rojo), <b>120</b> (amarillo), <b>121</b> (verde), <b>122</b> (naranja), <b>127</b> (azul) y acarbosa ( <b>7</b> ; turquesa) con la enzima α-glucosidasa de levadura (αGHY; cian, PDB 3A4A).	<b>113</b>
<b>73</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>120</b> con la αGHY.	<b>113</b>
<b>74</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>120</b> con la αGHY.	<b>114</b>
<b>75</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>121</b> con la αGHY.	<b>114</b>
<b>76</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>121</b> con la αGHY.	<b>115</b>
<b>77</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>122</b> con la αGHY.	<b>115</b>
<b>78</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>122</b> con la αGHY.	<b>116</b>
<b>79</b>	Representación en 3D del modo de unión de la amauromina ( <b>72</b> ) con la αGHY.	<b>116</b>
<b>80</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la amauromina ( <b>72</b> ) con la αGHY.	<b>117</b>
<b>81</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>127</b> con la αGHY.	<b>117</b>
<b>82</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>127</b> con la αGHY.	<b>118</b>
<b>83</b>	Representación en 3D del modo de unión de la malbranqueamida ( <b>89</b> ) con la αGHY.	<b>118</b>
<b>84</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la malbranqueamida ( <b>89</b> ) con la αGHY.	<b>119</b>
<b>85</b>	Representación en 3D del modo de unión de la acarbosa con la αGHY.	<b>119</b>
<b>86</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con la αGHY.	<b>120</b>
<b>87</b>	Posible sitio de unión para los compuestos <b>72</b> (azul), <b>89</b> (rosa), <b>120</b> (cian), <b>126</b> (anaranjado), <b>127</b> (amarillo) y ácido ursólico (morado) con la PTP-1B (verde, PDB 1SUG).	<b>123</b>
<b>88</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>120</b> con la PTP-1B.	<b>123</b>
<b>89</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>120</b> con la PTP-1B.	<b>124</b>
<b>90</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>126</b> con la PTP-1B.	<b>124</b>

<b>91</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>126</b> con la PTP-1B.	<b>125</b>
<b>92</b>	Representación en 3D del modo de unión de la <b>127</b> con la PTP-1B.	<b>125</b>
<b>93</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>127</b> con la PTP-1B.	<b>126</b>
<b>94</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>72</b> con la PTP-1B.	<b>126</b>
<b>95</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>72</b> con la PTP-1B.	<b>127</b>
<b>96</b>	Representación en 3D del modo de unión de <b>89</b> con la PTP-1B.	<b>127</b>
<b>97</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D de <b>89</b> con la PTP-1B.	<b>128</b>
<b>98</b>	Representación en 3D del modo de unión del ácido ursólico con la PTP-1B.	<b>128</b>
<b>99</b>	Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B.	<b>129</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Actividad inhibitoria de la fracción MeCN-MeOH y fracciones de <i>P. minimoides</i> M479ME.	63
2	Datos de RMN del compuesto <b>118</b> $^1\text{H}$ (500 MHz) y $^{13}\text{C}$ (125 MHz) en $\text{CDCl}_3$ .	65
3	Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa.	69
4	Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima PTP-1B humana.	70
5	Principales interacciones entre los metabolitos aislados y la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura.	72
6	Principales interacciones entre los metabolitos modelados y la enzima PTP-1B.	80
7	Evaluación del efecto inhibitorio de las fracciones flash de <i>M. circinata</i> sobre la $\alpha$ -glucosidasa.	84
8	Datos de RMN del compuesto <b>120</b> en $\text{CD}_3\text{OD}$ ( $^1\text{H}$ , 700 MHz and $^{13}\text{C}$ , 175 MHz).	88
9	Datos de RMN del compuesto <b>121</b> en $\text{CD}_3\text{OD}$ ( $^1\text{H}$ , 700 MHz and $^{13}\text{C}$ , 175 MHz).	90
10	Datos de RMN de los compuestos <b>122–124</b> .	96
11	Datos de RMN de $^1\text{H}$ (700 MHz) y $^{13}\text{C}$ (175 MHz) del compuesto <b>125</b> en $\text{CDCl}_3$ .	99
12	Datos de RMN $^1\text{H}$ (700 MHz) y $^{13}\text{C}$ (175 MHz) del compuesto <b>126</b> en $\text{CDCl}_3$ .	101
13	Datos de RMN de $^1\text{H}$ (700 MHz) y $^{13}\text{C}$ (175 MHz) de <b>127</b> en $\text{CDCl}_3$ .	104
14	Datos de RMN de $^1\text{H}$ (700 MHz) y $^{13}\text{C}$ (175 MHz) de <b>128</b> en $\text{CDCl}_3$ .	107
15	Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa ( $\alpha\text{GHY}$ ).	109
16	Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la PTP-1B.	110
17	Principales interacciones entre los metabolitos evaluados y la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura.	112
18	Principales interacciones entre los metabolitos evaluados y la enzima PTP-1B.	122

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Pagina</b>
<b>1</b>	Fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes.	<b>10</b>
<b>2</b>	Ejemplos selectos de inhibidores las $\alpha$ -glucosidasas.	<b>16</b>
<b>3</b>	Ejemplos selectos de inhibidores la PTP-1B.	<b>21</b>
<b>4</b>	Ejemplos de farmacos de origen fungico utilizados en la terapéutica.	<b>24</b>
<b>5</b>	Metabolitos reportados para la especie <i>S. minimoides</i> .	<b>29</b>
<b>6</b>	Tratamiento de las esporas con sulfato de dietilo (DES) y dimetilsulfóxido (DMSO).	<b>46</b>
<b>7</b>	Condiciones de análisis por cromatografía fase normal tipo flash de la fracción MeCN-MeOH de <i>P. minimoides</i> M479ME.	<b>48</b>
<b>8</b>	Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de la fracción MeCN-MeOH de <i>M. circinata</i> .	<b>48</b>
<b>9</b>	Fraccionamiento primario de la fracción MeCN-MeOH de <i>M. circinata</i> .	<b>49</b>
<b>10</b>	Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de la fracción F2 de <i>M. circinata</i> .	<b>50</b>
<b>11</b>	Fraccionamiento primario de la fracción F2 de <i>M. circinata</i> .	<b>50</b>
<b>12</b>	Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de la fracción F5 de <i>M. circinata</i> .	<b>52</b>
<b>13</b>	Fraccionamiento primario de la fracción F5 de <i>M. circinata</i> .	<b>52</b>
<b>14</b>	Minimoidiona B obtenida de la cepa original y las tratadas con DES.	<b>62</b>



## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
AcOEt	Acetato de etilo
MeCN	Acetonitrilo
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
H <sub>2</sub> O	Agua
cm	Centímetro
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CCF	Cromatografía en capa fina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
DCE	Dicroísmo circular electrónico
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Hz	Hertz
h	Horas
IR	Infrarrojo
L	Litros
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol

msnm	Metros sobre nivel del mar
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear protónica
UV	Espectroscopia en el ultravioleta
TMS	Tetrametilsilano

## RESUMEN

El presente trabajo forma parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de compuestos novedosos de origen fúngico con actividad inhibitoria frente a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y la proteína tirosina fosfatasa 1B, útiles como posibles agentes en el tratamiento de la diabetes mellitus. En este trabajo, se estudiaron el hongo endófito *Preussia minimoides*, especie que ha demostrado en estudios previos ser una fuente de compuestos bioactivos novedosos; y la especie *Malbranchea circinata*, la cual se eligió mediante un criterio quimiotaxonómico.

El estudio químico de *P. minimoides* derivó en la obtención de dos policétidos con esqueleto carbonado inédito, las minimoidionas A y B (**118** y **119**) y tres compuestos conocidos. El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico de *M. circinata* condujo al aislamiento de doce entidades químicas, ocho de ellas novedosas. La elucidación estructural de los compuestos se llevó a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y cálculos *in silico* para brindar mayor certeza en la elucidación estructural de los compuestos novedosos.

Se realizaron las evaluaciones biológicas de los compuestos aislados para determinar su actividad como inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y la proteína tirosina fosfatasa 1B. Las minimoidionas A (**118**;  $95.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ) y B (**119**;  $2.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), la malbranqueamida (**89**;  $71.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ), la amauromina (**72**;  $57.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ) y el compuesto **120** ( $116.8 \pm 7.2 \mu\text{M}$ ), trímero de ácido antranílico, inhibieron de manera significativa a la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura en comparación con la acarbosa (**7**;  $585 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ), utilizada como control positivo. Mientras que la malbranqueamida (**89**;  $14.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ), la amauromina (**72**;  $15.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) y el compuesto **120** ( $17.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ), inhibieron a la PTP-1B, en comparación con el control positivo, el ácido ursólico ( $27.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ).

Finalmente, para complementar la actividad biológica observada, se realizaron estudios de acoplamiento molecular de los metabolitos bioactivos con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (PDB 3A4A) y la PTP-1B humana (PDB 1SUG). Se encontró que los metabolitos aislados se unen preferentemente al sitio catalítico de cada enzima.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación contribuyen al conocimiento químico de las especies estudiadas y posicionan a estas dos especies fúngicas como una fuente de inhibidores de las enzimas objeto de estudio. Los metabolitos aislados representan nuevos prototipos de inhibidores y, por ende, posibles agentes para el desarrollo de fármacos enfocados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

## ABSTRACT

The present work is part of a project focused on the search for novel compounds of fungal origin with activity against  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B enzymes, which might be useful for the development of new agents for the treatment of diabetes mellitus. The species selected were *Preussia minimoides*, an endophyte fungus which has shown in previous studies to be a source of novel bioactive compounds; and *Malbranchea circinata*, which was chosen by a chemotaxonomic criterion; this genus is also an important source of secondary metabolites.

The chemical study of *P. minimoides* resulted in the isolation of two polyketides with novel carbon skeletons, minimoidiones A and B (**118** and **119**) and three known compounds. The bioactivity-directed fractionation of an organic extract of *M. circinata* led to the isolation of twelve chemical entities, eight of them novel. The structural elucidation of these compounds was carried out using spectroscopic and spectrometric techniques and *in silico* calculations.

The isolated compounds were evaluated as  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. Minimoidiones A (**118**;  $95.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ) and B (**119**;  $2.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), malbrancheamide (**89**;  $71.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ), amauromine (**72**;  $57.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ) and compound **116** ( $116.8 \pm 7.2 \mu\text{M}$ ), a trimer of anthranilic acid, significantly inhibited yeast  $\alpha$ -glucosidase compared to acarbose (**7**;  $585 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ), used as a positive control. Malbrancheamide (**89**;  $14.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ), amauromine (**72**;  $15.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) and compound **120** ( $17.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ), inhibited PTP-1B, compared to the positive control, ursolic acid ( $27.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ).

Docking studies of the bioactive metabolites with the yeast  $\alpha$ -glucosidase (PDB 3A4A) and human PTP-1B (PDB 1SUG) predicted that most of the active compounds bind to the catalytic site of each enzyme.

The results obtained in this research contribute to the knowledge of the metabolic profiles of the species analyzed. In addition, new prototypes of inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and PTP-1B were discovered; these compounds could be valuable for the development of new treatments for type 2 diabetes mellitus.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) está definida como un grupo de trastornos metabólicos de carácter sistémico, crónico-degenerativo, heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria, poligenético, que involucra diversos factores ambientales y está asociado a un estado de hiperglucemia crónico, resultado de un déficit total o parcial en la producción o acción de la insulina, lo cual afecta directamente el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (OMS, 2019; PROY-NOM-015-SSA2-2018).

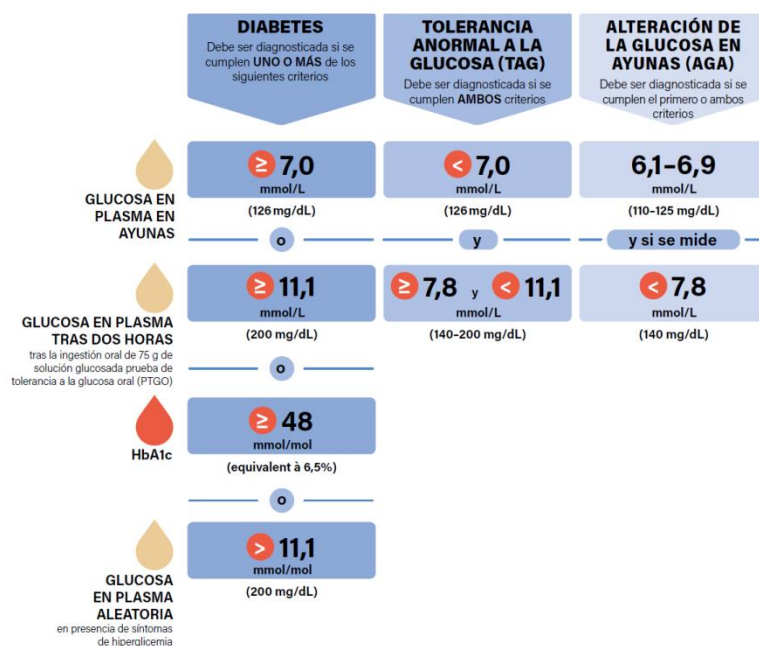
Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó el sistema de clasificación de la diabetes en cinco grupos, tomando en cuenta la atención clínica, la etiopatología y estudios epidemiológicos en: tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2), hiperglucemia durante el embarazo, formas híbridas y otros tipos específicos (OMS, 2019). La de mayor prevalencia es la DMT2.

La DMT1, anteriormente conocida como diabetes juvenil o insulino dependiente, es un desorden autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células beta del páncreas y, en consecuencia, la producción de insulina es muy baja o nula; por lo que su tratamiento consiste de la administración diaria de esta hormona. Los síntomas característicos de la DMT1 son poliuria, polifagia, polidipsia, fatiga y pérdida repentina de peso (OMS, 2019; PROY-NOM-015-SSA2-2018).

La DMT2 es la forma más común y se estima que cerca del 90% de los individuos con diabetes mellitus padecen esta forma. Los pacientes que sufren DMT2 presentan grados variables de resistencia a la acción de la insulina, lo cual desencadena una sobreproducción de esta hormona. Como resultado, se puede producir un fallo de las células beta-pancreáticas y, en consecuencia, muchos casos de DMT2 transcurren con un déficit en la secreción de la insulina. La falta de sensibilidad a la acción de esta hormona, principalmente, en el tejido adiposo, músculo e hígado da origen a los altos

niveles de glucosa en sangre (IDF Atlas, 2019; Kahn et al., 2014). Los síntomas son muy parecidos a los presentes en la DMT1, aunque no en todos los casos se presentan los síntomas, por lo que la enfermedad puede pasar desapercibida, dificultando su diagnóstico.

La condición prediabética está definida por niveles de glucosa en sangre por encima de lo normal, pero por debajo de los umbrales de la diabetes (**Figura 1**). Se caracteriza por niveles de glucosa anormal en ayuno (100-125 mg/dL) y/o valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) entre 5.7 - 6.4 % (IDF Atlas, 2019). Es un estado de riesgo que define una alta probabilidad de desarrollar DMT2, sin embargo, se ha comprobado que al disminuir los factores de riesgo, la prediabetes puede ser reversible (Tabák et al., 2012).



**Figura 1.** Criterios de diagnóstico para la diabetes (Tomado de IDF Atlas, 9 ed. 2019).

La DMT2 se considera a la fecha como uno de los problemas de salud pública más importantes del siglo XXI; sin un diagnóstico temprano o una mala atención provoca complicaciones graves como enfermedades cardiovasculares y vasculares periféricas, neuropatía diabética, falla renal y amputaciones, entre otras, lo que resulta en un aumento de la discapacidad y una reducción de la esperanza de vida de los pacientes (Gregg et al., 2014). Tan solo en México se calcula que el número de personas con



DMT2 es cercano a los 12.8 millones y se estima que para el año 2045 esta cifra se incremente hasta 22.3 millones. Esta situación coloca a nuestro país en el sexto lugar a nivel mundial con mayor número de casos. A nivel global, la diabetes es la séptima causa de muerte con 1.6 millones de defunciones en el 2016 (OMS, 2018). Hasta el año 2019 cerca de 463 millones de personas padecían diabetes a nivel mundial y se estima que esta cifra llegue a superar los 700 millones de personas para el año 2045, lo cual representa un aumento del 51 % (**Figuras 2 y 3**; IDF Atlas, 2019; Saeedi et al., 2019; Guariguata et al., 2014). Según estadísticas recientes, la diabetes es la segunda causa de muerte en nuestro país, con 101,257 defunciones, lo cual representa el 14.1 % del total de fallecidos en el 2018 (INEGI, 2019).

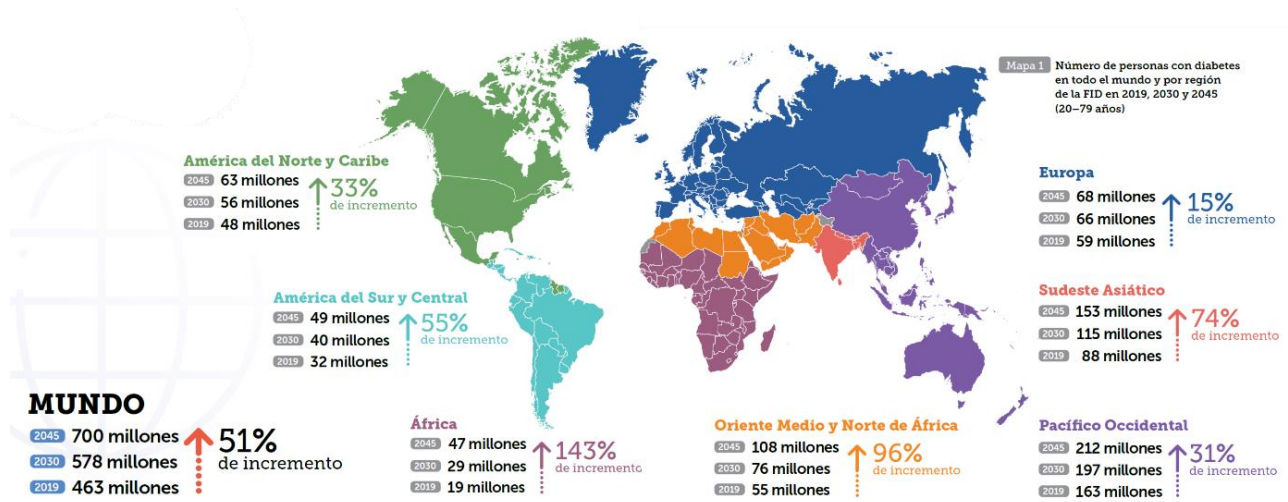


Figura 2. Número de personas con DM por región (IDF Atlas, 9 ed. 2019).

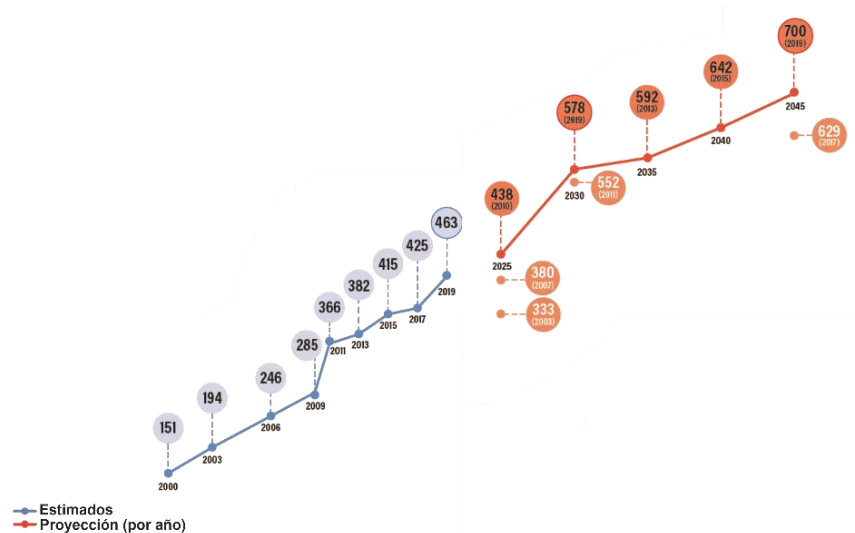
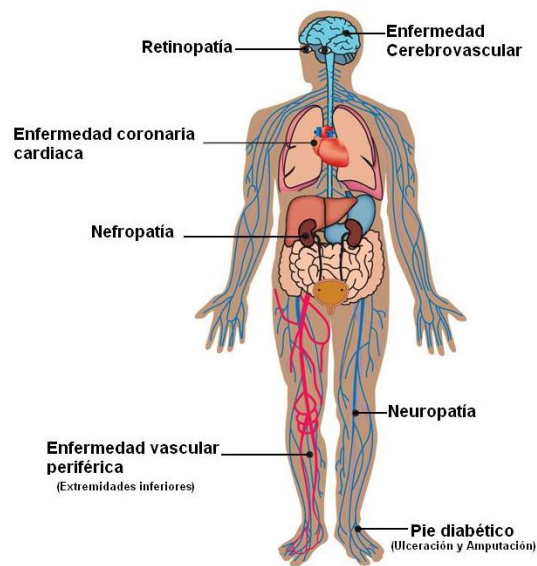


Figura 3. Proyección de personas con DM a nivel mundial (IDF Atlas, 9 ed. 2019).

## 1.2. Tratamiento de la diabetes mellitus

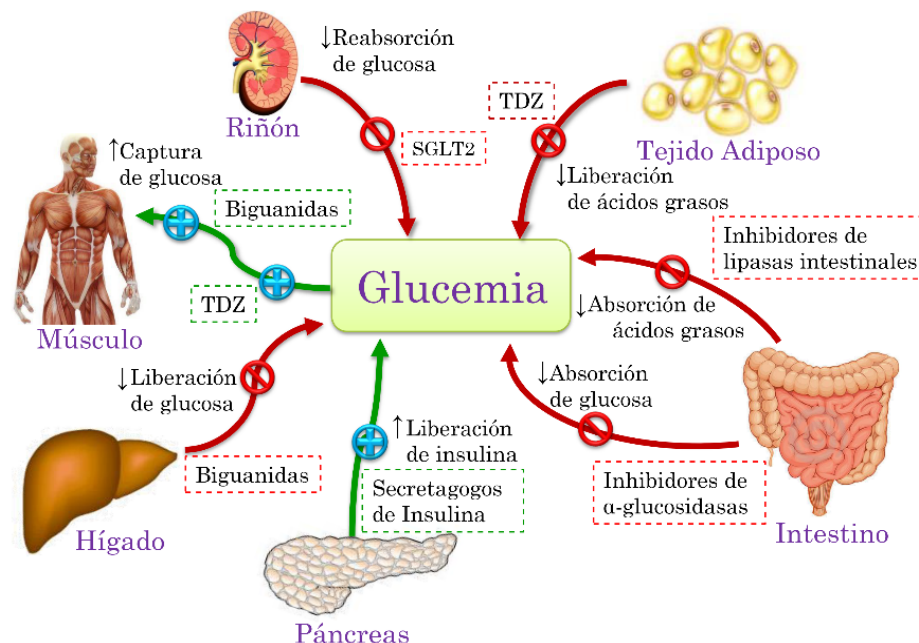
El tratamiento de la DM tiene como propósito aliviar los síntomas, prevenir las complicaciones agudas y crónicas (**Figura 4**), mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o sus complicaciones, las cuales, pueden ser de dos tipos: microvasculares o macrovasculares. Dentro de las complicaciones microvasculares se encuentran la retinopatía diabética, la nefropatía diabética y la neuropatía diabética, la cual provoca el llamado pie diabético. Las complicaciones macrovasculares involucran a las enfermedades cardio- y cerebrovasculares y las relacionadas a las extremidades inferiores (OMS, 2018; PROY-NOM-015-SSA2-2018).



**Figura 4.** Principales complicaciones de la diabetes (Modificado de IDF Atlas, 8 ed. 2017).

Los tratamientos empleados para la enfermedad están encaminados a disminuir los niveles de glucosa en sangre y mantenerlos dentro de los parámetros normales (PROY-NOM-015-SSA2-2018). El tratamiento de la DMT1 se basa en la administración manual o automatizada de insulina. En el caso de la DMT2, el control de la enfermedad contempla tres aspectos principales: una dieta saludable, actividad física regular y tratamiento farmacológico para controlar la hiperglucemia. La terapia farmacológica, se clasifica en varios grupos de acuerdo al mecanismo que ejercen los fármacos para controlar el estado de hiperglucemia (Valencia et al., 2014; Israili et al., 2011). Los más importantes se resumen a continuación y se esquematizan en la **Figura 5**:

- a. **Fármacos que aumentan los niveles de insulina en sangre.** Son agentes orales que promuevan la secreción de insulina; se llaman comúnmente secretagogos. Entre ellos se encuentran las sulfonilureas, las meglitinidas, los inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4) y los análogos de las incretinas.
- b. **Fármacos sensibilizadores de la insulina.** Esta clase de fármacos aumenta la sensibilidad a la insulina en sus órganos blanco, es decir favorecen la acción de la insulina en músculo, tejido adiposo e hígado. En este grupo se encuentran las biguanidas, las tiazolidindionas y recientemente, los inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) han surgido como un blanco novedoso potencial para el tratamiento de la DMT2.
- c. **Fármacos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas.** Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas actúan disminuyendo la absorción intestinal de carbohidratos, por tanto, abatiendo las concentraciones postprandiales de glucosa en sangre.
- d. **Fármacos inhibidores de la recaptura de glucosa.** Estos actúan inhibiendo a las proteínas cotransportadoras de sodio-glucosa que se encuentran en el túbulo proximal de las nefronas en el riñón (SGLT2), por lo que su inhibición aumenta la excreción urinaria de glucosa y por tanto disminuyen sus concentraciones plasmáticas.

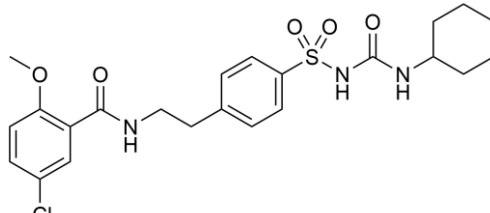
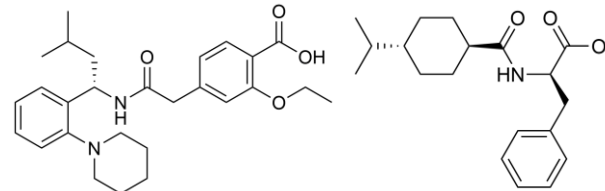
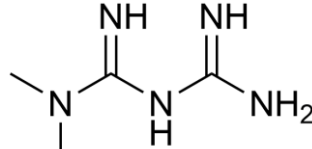


**Figura 5.** Mecanismo de acción de los fármacos más usados para el tratamiento de DMT2.

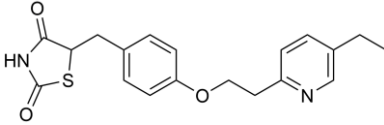
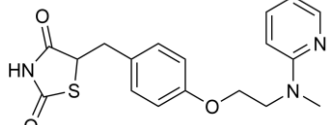
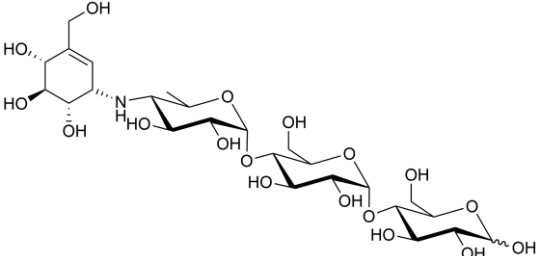
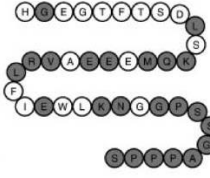
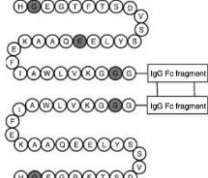
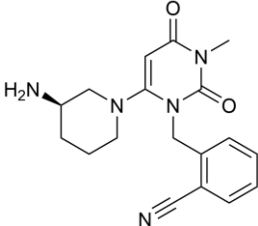
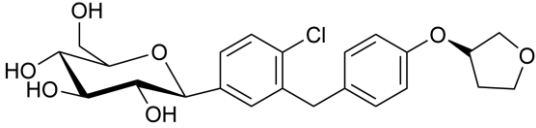
Los mecanismos y sitios de acción de los principales agentes terapéuticos usados actualmente para el tratamiento clínico de la diabetes se resumen en el **Cuadro 1**. Frecuentemente, estos fármacos son empleados en combinación con la finalidad de mejorar la eficacia de los tratamientos debido a la sinergia entre ellos; la metformina es el fármaco de administración oral de mayor importancia para el tratamiento inicial de la DMT2 (Khursheed et al., 2019).

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

**Cuadro 1.** Fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes.

Tipo de Agente Mecanismo de acción	Ejemplos
<p><b>Sulfonilureas</b> (Páncreas)</p> <p>Aumentan la secreción de insulina al unirse al receptor SUR1 de las membranas de las células <math>\beta</math>-pancreáticas, cerrando el canal de potasio sensible a ATP.</p>	 <p style="text-align: center;">glibenclamida (1)</p>
<p><b>Meglitinidas</b> (Páncreas)</p> <p>Aumentan la secreción de insulina actuando sobre canales potasio dependiente de ATP en la membrana de las células <math>\beta</math>-pancreáticas.</p>	 <p style="text-align: center;">repaglinida (2)      nateglinida (3)</p>
<p><b>Biguanidas</b> (Músculo, hígado)</p> <p>Aumentan la sensibilidad a la insulina al favorecer la translocación del transportador de glucosa GLUT-4, inhibe la gluconeogénesis y promueva la <math>\beta</math>-oxidación de ácidos grasos mediante la activación de la AMPK.</p>	 <p style="text-align: center;">metformina (4)</p>

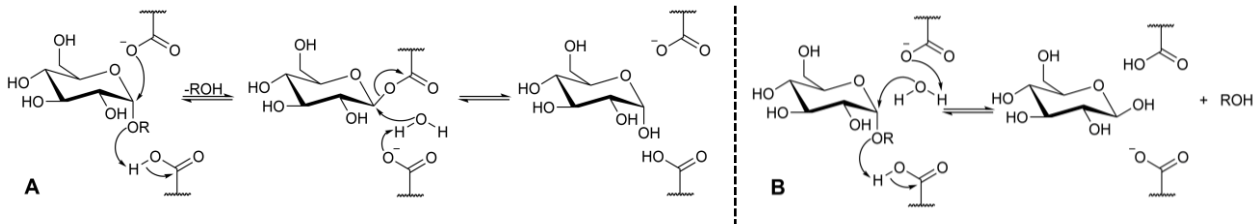
**Cuadro 1.** Fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes (*continuación*).

Tipo de Agente	Mecanismo de acción Ejemplo	
<p><b>Tiazolidindionas</b> (Músculo, tejido adiposo)</p> <p>Aumentan la sensibilidad a la insulina al activar el factor nuclear de transcripción PPAR-<math>\gamma</math>.</p>	 <p>pioglitazona (5)</p>	 <p>rosiglitazona (6)</p>
<p><b>Inhibidores de <math>\alpha</math>-glucosidasas</b> (Intestino)</p> <p>Evitan o disminuye la absorción de glucosa en el intestino delgado.</p>	 <p>acarbosa (7)</p>	
<p><b>Análogos de las incretinas</b> (Intestino y páncreas)</p> <p>Agonista GLP-1, controla la liberación de Insulina y glucagón por el páncreas en respuesta a los alimentos.</p>	 <p>exenatida (8)</p>	 <p>dulaglutida (9)</p>
<p><b>Inhibidores de DPP-4</b> (Intestino y páncreas)</p> <p>Aumenta la concentración de GIP y GLP-1, favoreciendo la síntesis de insulina y disminuyendo la producción de glucagón.</p>	 <p>alogliptina (10)</p>	
<p><b>Inhibidores de SGLT2</b> (Riñón)</p> <p>Inhiben la reabsorción de glucosa, al aumentar la excreción urinaria.</p>	 <p>empagliflozina (11)</p>	

### 1.3. Inhibidores de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas utilizados en el tratamiento de la diabetes

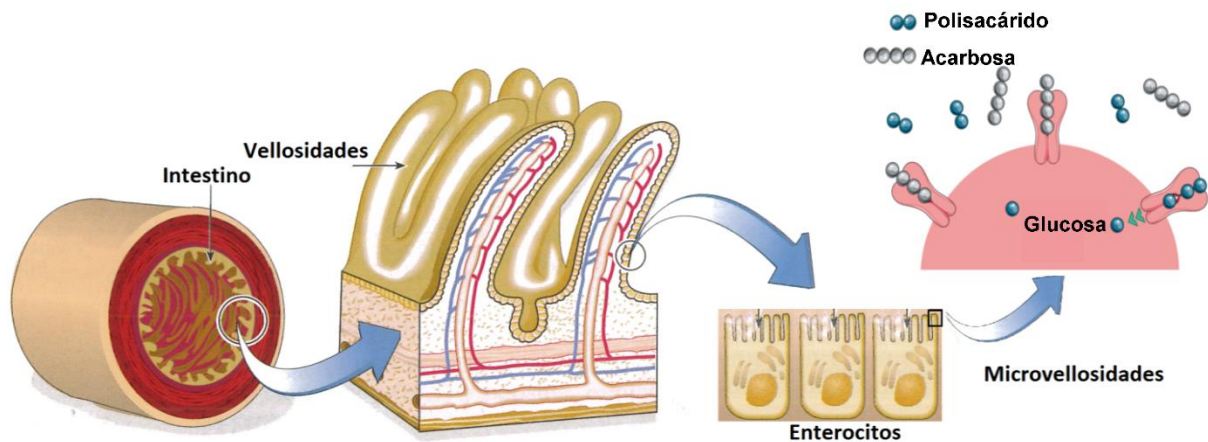
Las glucosidasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de oligosacáridos y polisacáridos a monosacáridos y sus respectivos carbohidratos. Este tipo de enzimas son capaces de hidrolizar enlaces de tipo *O*-, *N*- y *S*-glicosídicos, así como enlaces glicosídicos  $\alpha$  y  $\beta$  (Khursheed et al., 2019).

La hidrólisis del enlace glicosídico se lleva a cabo mediante la reacción entre los residuos de aspartato o glutamato, presentes en el sitio catalítico y la glucosa terminal del carbohidrato. Esta reacción puede resultar en la retención o inversión de la configuración del carbono anomérico (**Figura 6**). Las  $\alpha$ -glucosidasas pertenecen al primer grupo, debido a que el producto de reacción es  $\alpha$ -D-glucosa (Wardrop y Waidyarachchi, 2010).



**Figura 6.** Mecanismo de reacción de la hidrólisis del enlace glicosídico con retención de la configuración (**A**) y con inversión de la configuración (**B**).

Las  $\alpha$ -glucosidasas se encuentran en la luz del intestino delgado sobre la membrana de los enterocitos (**Figura 7**), lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos. Son enzimas que hidrolizan oligosacáridos que poseen  $\alpha$ -D-glucosa terminal no reductora con enlaces (1 $\rightarrow$ 4)-glicosídicos y liberan  $\alpha$ -D-glucosa, y con menor afinidad también hidrolizan polisacáridos con enlaces (1 $\rightarrow$ 6)-glicosídicos (Khursheed et al., 2019). Esto les permite no solo hidrolizar oligosacáridos sino también  $\alpha$ -glicósidos sintéticos y  $\alpha$ -glucanos como el almidón soluble y el glucógeno (Krasikov et al., 2001).



**Figura 7.** Ubicación de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.

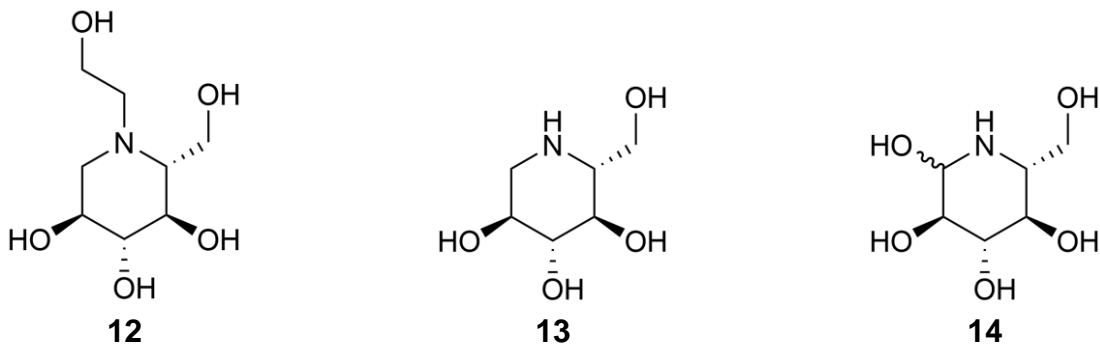
Las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas manifiestan diferencias significativas en el reconocimiento de su sustrato, característica que permite dividir las en tres grupos. Las enzimas de tipo I (familia GH13) se encuentran en bacterias, levaduras e insectos y se caracterizan por mostrar una mayor actividad hacia sustratos heterogéneos como la sacarosa y el *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-glucopiranosido (*p*-NPG) y muy poca actividad hacia los oligosacáridos de maltosa y almidón, lo que implica que estas enzimas reconocen a la estructura del  $\alpha$ -D-glucopiranosido presente en sus sustratos. Las de tipo II (familia GH31) se encuentran en organismos fúngicos e hidrolizan con mayor facilidad sustratos homogéneos y poliméricos que sustratos heterogéneos. Finalmente, las de tipo III (familia GH31) se encuentran con mayor frecuencia en plantas y mamíferos, estas muestran una elevada actividad contra sustratos homogéneos y poliméricos como la maltosa o los  $\alpha$ -glucanos, incluyendo al almidón soluble y glucógeno, y casi no muestran actividad frente a sustratos heterogéneos (Nakai, 2005).

La liberación de  $\alpha$ -D-glucosa en el intestino delgado es de vital importancia para continuar con el metabolismo de los carbohidratos. La actividad de estas enzimas intestinales es muy importante para diversos procesos bioquímicos, tales como el metabolismo lisosomal de glicoconjugados, el procesamiento de glicoproteínas, así como también la biosíntesis de glicolípidos y glicoproteínas (Moorthy et. al., 2012). En el humano, existen dos tipos de  $\alpha$ -glucosidasas a nivel intestinal, la maltasa-glucoamilasa y la sacarasa-isomaltasa (Lin et al., 2016).

Los inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas son ampliamente utilizados como tratamiento inicial de pacientes con DMT2 o con una condición prediabética, debido a que inhiben de forma competitiva y reversible a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales retrasando y, en parte, impidiendo la absorción de los carbohidratos en el intestino. En consecuencia, su acción principal consiste en disminuir la hiperglucemia posprandial (Tan et al., 2018).

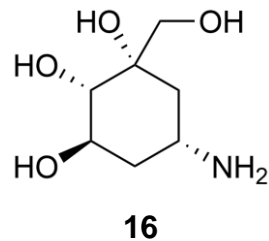
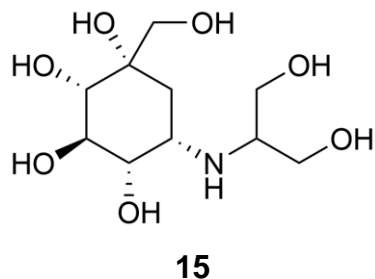
Los inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa mejor conocidos son la acarbosa (**7**), el miglitol (**12**) y la voglibosa (**13**). La acarbosa (**7**) se obtuvo inicialmente de *Actinoplanes* cepa SE 50. La administración de este fármaco reduce la glucemia posprandial e incrementa la secreción de insulina. Fue introducido comercialmente con el nombre de Precose<sup>®</sup> (Asano et al., 2003).

El miglitol (**12**) es el análogo *N*-hidroxietilado de la 1-desoxinojirimicina (**13**), la cual es un análogo de la nojirimicina (**14**) un compuesto producido por *Streptomyces roseochromogenes* cepa R-468, *S. lavendulae* cepa SF-425 y algunas especies vegetales. El miglitol entró al mercado con el nombre de Glycet<sup>®</sup> y a diferencia de la acarbosa se absorbe en mayor cantidad, lo que ofrece efectos a nivel sistémico además de los efectos a nivel del intestino delgado. El fármaco puede utilizarse solo o en combinación con sulfonilureas, biguanidas o insulina (Israili et al., 2011; Asano et al., 2003).



La voglibosa (**15**) también es un derivado de un compuesto de origen natural conocido como valiolumina (**16**). Después de demostrar su eficacia como agente oral antidiabético fue incorporado al mercado con el nombre de Basen<sup>®</sup> (Asano et al., 2003).





Este tipo de fármacos se usan en monoterapia o en combinación; sin embargo, estos fármacos son más efectivos en el tratamiento de pacientes con un diagnóstico temprano de DMT2 o que presenten prediabetes. También es útil en aquellas regiones donde la ingesta de carbohidratos es muy alta, como es el caso de México. Además, se ha observado que disminuyen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Derosa y Maffioli, 2012). Al mismo tiempo, el uso de estos inhibidores reduce entre un 0.7-0.8 % la hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Ghani, 2015; Israili, 2011), la hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, provocan la secreción posprandial de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y pueden mejorar la sensibilidad a la insulina (Ghani, 2015; Wardrop y Waidyarachchi, 2010).

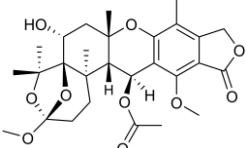
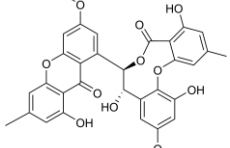
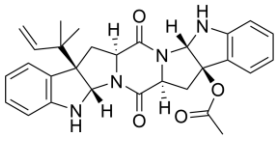
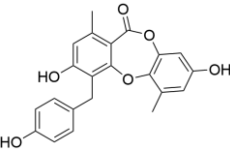
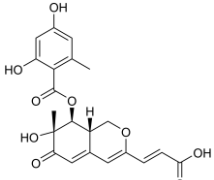
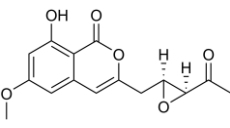
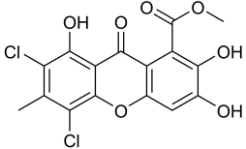
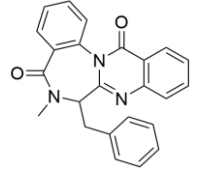
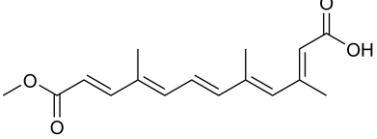
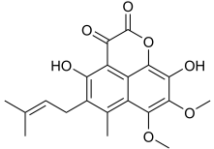
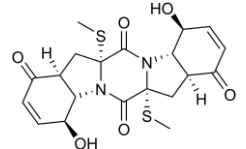
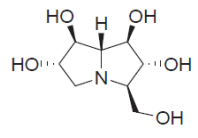
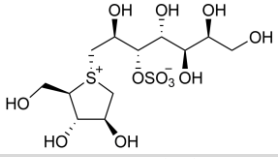
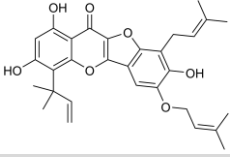
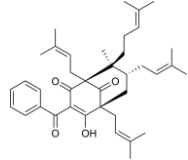
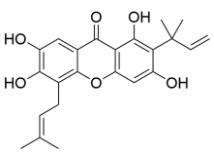
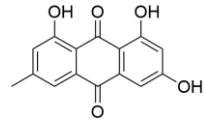
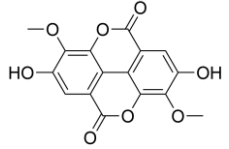
Los productos descritos anteriormente presentan efectos adversos tales como: flatulencias, meteorismo y distensión abdominal, lo que ha propiciado una búsqueda continua de nuevos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas.

### **1.3.1. Inhibidores selectos de la enzima $\alpha$ -glucosidasa obtenidos a partir de fuentes naturales**

El estudio farmacológico de plantas medicinales así como de microorganismos, ha conducido al descubrimiento de una gran variedad de moléculas activas como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas. El descubrimiento de estos compuestos ha sido de vital importancia, ya que algunos de ellos han servido como precursores para la obtención de fármacos muy efectivos usados en la terapéutica actual. Los metabolitos encontrados son de naturaleza química muy variada, entre ellos destacan flavonoides, xantonas, alcaloides, terpenoides, antraquinonas, compuestos glicosídicos, compuestos miméticos a azúcares y compuestos fenólicos, entre otros (Ghani, 2015).

En el **Cuadro 2** se muestran algunos ejemplos selectos de productos naturales descubiertos en los últimos años.

**Cuadro 2.** Ejemplos selectos de inhibidores las  $\alpha$ -glucosidasas.

	<p>astatida N  <math>Cl_{50}</math>= 0.4 mM  <i>Aspergillus terreus</i>            3.05358            (Shan et al., 2015)</p>		<p>(-)-ascoclactona A  <math>Cl_{50}</math>= 27.9 <math>\mu</math>M  <i>Ascomycota</i> sp.            (Liu et al., 2017)</p>
	<p>amauromina B  <math>Cl_{50}</math>= 0.3 mM  <i>Aspergillus terreus</i>            3.05358            (Shan et al., 2015)</p>		<p>botryorhodina H  <math>Cl_{50}</math>= 8.1 <math>\mu</math>M  <i>Trichoderma</i> sp. 307            (Zhang et al., 2017)</p>
	<p>pinazafilona B  <math>Cl_{50}</math>= 28 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium</i> sp.            HN29-3B1            (Liu et al., 2015)</p>		<p>peniisocoumarina C  <math>Cl_{50}</math>= 38.1 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium commune</i> QQF3            (Cai et al., 2018)</p>
	<p>chrysoxantona  <math>Cl_{50}</math>= 40 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium chrysogenum</i>            (Wang et al., 2018)</p>		<p>benzomalvina A  <math>Cl_{50}</math>= 383.2 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium spathulatum</i> B35            (Del Valle et al., 2016)</p>
	<p>nectriacid B  <math>Cl_{50}</math>= 42.3 <math>\mu</math>M  <i>Nectria</i> sp. HN001            (Cui et al., 2016)</p>		<p>flavifenalenona  <math>Cl_{50}</math>= 78.9 <math>\mu</math>M  <i>Aspergillus flavipes</i>            (Wang et al., 2016)</p>
	<p>exserohilona  <math>Cl_{50}</math>= 195 <math>\mu</math>M  <i>Setosphaeria rostrata</i>            (Centko et al., 2017)</p>		<p>(+)-casuarina  <math>Cl_{50}</math>= 0.7 <math>\mu</math>M*  <i>Casuarina equisetifolia</i>            (Kato et al., 2003)</p>
	<p>kotalanol  <math>Cl_{50}</math>= 0.18 <math>\mu</math>M*  <i>Salacia reticulata</i>            (Sim et al., 2010)</p>		<p>brossoflurenona B  <math>Cl_{50}</math>= 33.3 <math>\mu</math>M  <i>Broussonetia papyrifera</i>            (Ryu et al., 2010)</p>
	<p>guttiferona I  <math>Cl_{50}</math>= 13.1 <math>\mu</math>M  <i>Garcinia cowa</i>            (Raksat et al., 2020)</p>		<p>cudraxantona L  <math>Cl_{50}</math>= 7.4 <math>\mu</math>M  <i>Cudrania tricuspidata</i>            (Seo et al., 2007)</p>
	<p>emodina  <math>Cl_{50}</math>= 4.1 <math>\mu</math>M  <i>Polygonum multiflorum</i>            (Yang et al., 2014)</p>		<p>ácido 3,3'-di-O-metilelagico  <math>acidCl_{50}</math>= 6.8 <math>\mu</math>M  <i>Rubus suavissimus</i>            (Liu et al., 2019)</p>

\* $\alpha$ -glucosidasa de intestino de rata

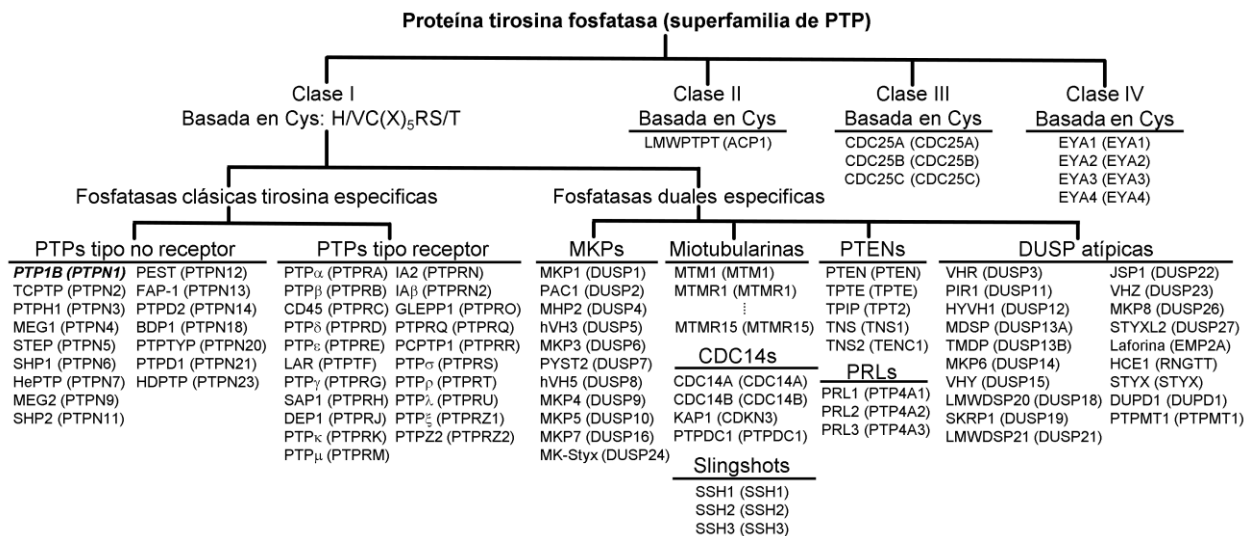
#### 1.4. Inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B)

La fosforilación y desfosforilación de proteínas son mecanismos fundamentales mediados por las proteínas tirosina cinasas (PTK) y las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), respectivamente (Tamrakar et al., 2014). Estas enzimas regulan de forma reversible y coordinada la adición o eliminación de un grupo fosfato del residuo de tirosina de una proteína, por lo que se ha establecido como un mecanismo postraduccional fundamental para casi todos los procesos celulares (Barr, 2010). Esta reacción en la que se agrega o elimina un grupo fosfato de un residuo de tirosina puede alterar la señalización, proliferación, adhesión, diferenciación y la motilidad celular (Soulsby y Bennett, 2009).

Las PTKs y PTPs, pueden regular hacia arriba o hacia abajo las vías de señalización, dependiendo de si la fosforilación activa o inhibe la función de la proteína (Hunter, 1995). Además, la desregulación de estos procesos puede tener amplias implicaciones en el desarrollo de muchas enfermedades como el cáncer, trastornos metabólicos e inflamatorios y alteraciones de la función cardíaca (Feldhammer et al., 2013). En consecuencia, las vías celulares reguladas por la fosforilación de tirosina ofrecen muchos blancos farmacológicos para el desarrollo de nuevas terapias.

Las PTPs constituyen una gran familia de enzimas con 107 miembros y se pueden clasificar en cuatro clases según su secuencia de aminoácidos y función en: clase I, II y III (basadas en cisteína) y clase IV (basada en aspartato) (Rong-jun et al., 2014) (**Figura 8**). El grupo principal son las PTP de clase I, que consta 99 miembros. Cada miembro de este grupo comparte un sitio activo conservado con la cisteína como residuo catalítico. La clase I se divide en PTPs clásicas tirosina específicas y fosfatasas duales tirosina y serina/treonina específicas (DUSP, por sus siglas en inglés), con 38 y 61 miembros, respectivamente. Las PTP clásicas específicas están compuestas por 17 PTPs citosólicas y 21 PTPs similares a receptores transmembranales, y las DUSP se dividen en MKPs (MAPK fosfatasas), miotubularinas, CDC14, slingshot, PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa), PRL (fosfatasa de regeneración hepática) y subclases de DUSP atípicas (Barr, 2010).

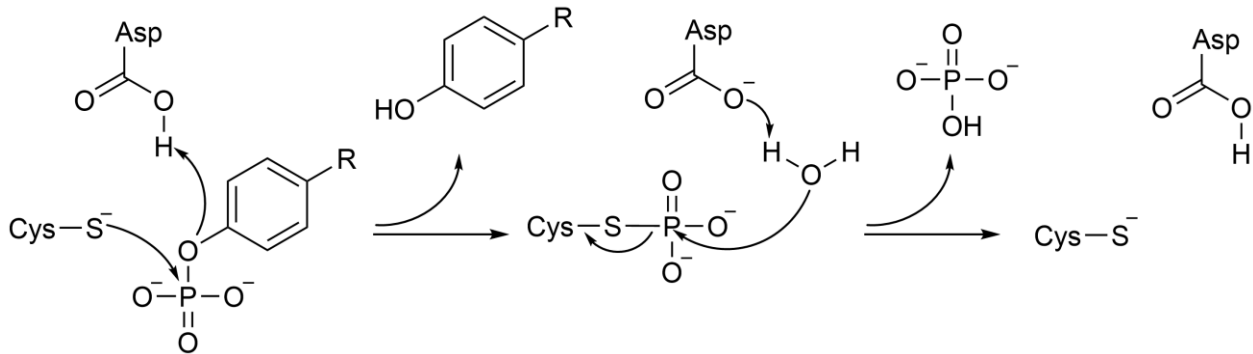
Además, en esa clase también hay un grupo de PTP atípicos que no son fosfatasas proteicas pero reconocen otros sustratos como los fosfoazúcares y fosfolípidos. La clase II posee solo un miembro, la PTP de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en ingles); mientras que la clase III se compone de tres miembros: CDC25A, CDC25B y CDC25C. Las PTP de clase II y III también poseen la cisteína catalítica en el sitio activo (Rong-jun et al., 2014). Finalmente, la clase IV tiene cuatro miembros con residuos de ácido aspártico como aminoácido catalítico, lo que contrasta con las PTP de clase I-III que poseen cisteína. La actividad de las PTP de clase IV requiere adicionalmente de la presencia de un ion metálico, lo que sugiere que tienen orígenes evolutivos únicos (Li et al., 2003).



**Figura 8.** Clasificación de las PTP humanas. El gen que codifica cada PTP está en paréntesis (Rong-jun et al., 2014).

Las PTP clásicas funcionan mediante un mecanismo catalítico de dos pasos. Las características clave del sitio activo son el asa catalítica conservada que contiene cisteína en la parte inferior del sitio activo y el asa flexible WPD (Trp-Pro-Asp). La profundidad de la cavidad del sitio activo selecciona exclusivamente sustratos que contienen fosfotirosina (pTyr), ya que los residuos de pSer y pThr no logran alcanzar la cisteína catalítica. En cambio, las DUSP, tienen una hendidura menos profunda que expone la cisteína catalítica, lo que permite hidrolizar residuos de pTyr, así como de pSer y pThr. El potencial electrostático de la cavidad es predominantemente positivo, creando una superficie que complementa el grupo fosfato entrante. Al unirse al sustrato,

el asa WPD se cierra sobre el sitio activo y en el primer paso de la reacción, la cisteína realiza un ataque nucleofílico formando un intermediario de fosfocisteína, mientras el residuo de ácido aspártico del bucle WPD restablece el hidroxilo fenólico en el residuo de tirosina. En el segundo paso, el mismo aspartato actúa como base al desprotonar una molécula de agua, lo que lleva a la hidrólisis del intermedio de fosfoenzima (**Figura 9**; Barr, 2010; Kolmodin y Åqvist, 2001).



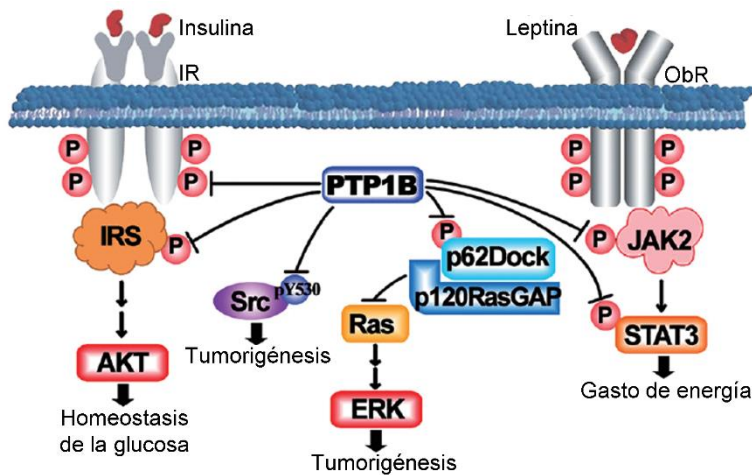
**Figura 9.** Mecanismo de reacción de las PTPs (Kolmodin y Åqvist, 2001).

Dada su importancia y número, las PTPs han sido tema de investigación durante las últimas dos décadas ya que estas representan un blanco de acción potencial de nuevos fármacos y objetivos viables para el diseño de nuevas terapias de enfermedades, autoinmunes, neurológicas, cáncer y diabetes. Estos hallazgos han fortalecido aún más la hipótesis de que las PTPs podrían ser la próxima frontera en el descubrimiento de fármacos (Rong-Jun et al., 2014; Tonks, 2013).

#### 1.4.1. Proteína tirosina fosfatasa 1B

La primera PTP intracelular que se aisló y caracterizó fue la PTP-1B (Tamrakar et al., 2014; Tonks et al., 1988). La PTP-1B (codificada por el gen *PTPN1*) consta de 435 aminoácidos; posee un dominio catalítico N-terminal, dos secuencias ricas en prolina y una región hidrofóbica C-terminal que sirve de anclaje al retículo endoplasmático. El sitio activo de la PTP-1B comparte muchos motivos de secuencia comunes con otras PTP clásicas; se compone de los residuos 214 al 221 (asa P, asa de unión a fosfato, His-Cys-Ser-Ala-Gly-Ile-Gly-Arg) (Jiang et al., 2012; Zhang et al., 2003).

Estudios bioquímicos y genéticos han indicado que la PTP-1B es un regulador negativo de las vías de señalización de insulina y leptina (**Figura 10**), importantes en la homeostasis de la glucosa (Zhang et al., 2003). La PTP-1B desfosforila directamente el receptor de insulina (RI) y los sustratos del receptor de insulina (SRI); mientras que, en la cascada de señalización de la leptina desfosforila JAK2 y STAT3 (Rong-jun et al., 2014). Y dado que la terminación de la cascada de señalización de la insulina requiere la desfosforilación del RI y sus moléculas efectoras, se planteó la hipótesis de que la desregulación de las PTP, ya sea a través de una mayor actividad o expresión, puede atenuar la señalización de la insulina, lo que resulta en resistencia a la acción de esta hormona, una de las principales causas de la DMT2 (Jiang et al., 2012).



**Figura 10.** Vías de señalización que involucran PTP-1B (Tomado de Rong-jun et al., 2014).

La PTP-1B cobró mayor relevancia cuando se descubrió que ratones *knock out* eran resistentes a la obesidad inducida por la dieta y eran hipersensibles a la insulina (Elchebly et al., 1999). El vínculo entre la PTP-1B, la diabetes y la obesidad, despertó gran interés en el desarrollo de inhibidores específicos de la PTP-1B para el tratamiento de estos padecimientos. Los estudios demostraron que la inhibición de la PTP-1B aumentaban el nivel de fosforilación del receptor de insulina (IR) y sus sustratos, promoviendo así la translocación de los transportadores de glucosa y la absorción de glucosa en las células sensibles a la insulina (Tamrakar et al., 2014).

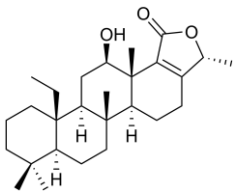
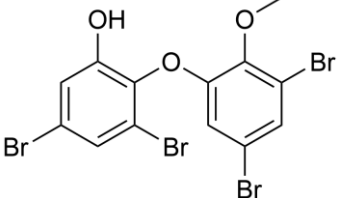
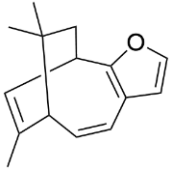
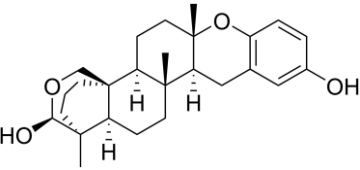
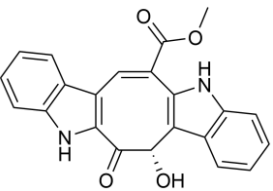
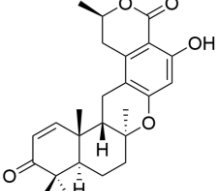
Por todo lo antes expuesto, existe un creciente interés en el desarrollo de inhibidores potentes y específicos para esta enzima. Los inhibidores de la PTP-1B podrían mejorar la resistencia a la insulina y normalizar los niveles de glucosa e insulina en plasma sin inducir hipoglucemia (Mendivil et al., 2005).

### 1.4.2. Inhibidores selectos de la PTP-1B obtenidos a partir de fuentes naturales

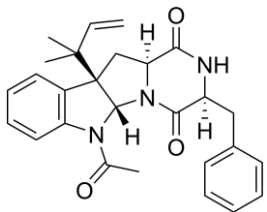
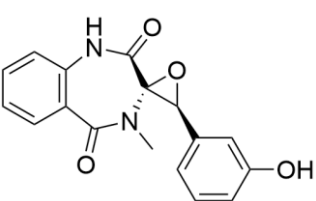
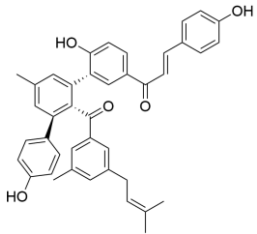
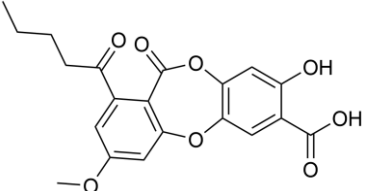
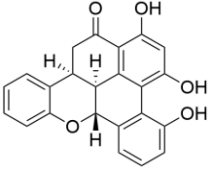
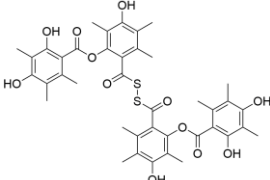
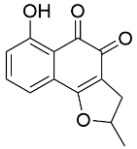
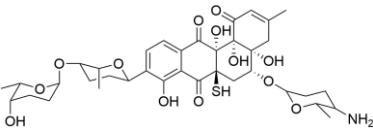
Como se mencionó anteriormente, la PTP-1B ha surgido como un blanco terapéutico novedoso para el tratamiento de la DMT2, por lo que la búsqueda de compuestos que puedan inhibir esta enzima ha cobrado interés en años recientes. Una gran variedad de compuestos de origen natural han sido identificados como inhibidores de la PTP-1B, por lo que pueden representar una nueva generación de fármacos para el tratamiento de la diabetes en un futuro próximo, ya sea directamente o derivados de la optimización estructural de productos naturales (Zhou et al., 2017).

En el **Cuadro 3** se muestran algunos ejemplos selectos de productos naturales capaces de inhibir la PTP-1B.

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de inhibidores la PTP-1B.

 <p>hyattellactona A  <math>CI_{50}</math>= 7.45 <math>\mu</math>M  <i>Hyatella</i> sp.            Esponja            (Abdjul et al., 2015)</p>	 <p>2-(3',5'-dibromo-2'-metoxifenoxi)-3,5-dibromofenol  <math>CI_{50}</math>= 0.85 <math>\mu</math>M  <i>Lamellodysidea herbacea</i>            Esponja            (Yamazaki et al., 2013)</p>
 <p>dehidroeuryspongina A  <math>CI_{50}</math>= 3.6 <math>\mu</math>M  <i>Euryspongia</i> sp.            Esponja            (Yamazaki et al., 2013)</p>	 <p>strongyloforina-15  <math>CI_{50}</math>= 11.9 <math>\mu</math>M  <i>Strongylophora strongilate</i>            Esponja            (Lee et al., 2015)</p>
 <p>racemocina C  <math>CI_{50}</math>= 5.86 <math>\mu</math>M  <i>Caulerpa racemosa</i>            Alga            (Yang et al., 2014)</p>	 <p>verruculida A  <math>CI_{50}</math>= 8.4 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium verruculosum</i>            (Yamazaki et al., 2015)</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de inhibidores la PTP-1B (*continuación*).

	<p>fructigenina A  <math>Cl_{50}</math>= 10.7 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium</i> sp.            (Sohn et al., 2013)</p>		<p>ciclophenol  <math>Cl_{50}</math>= 30.0 <math>\mu</math>M  <i>Penicillium</i> spp.            SF-5203            (Sohn et al., 2013)</p>
	<p>kuwanona V  <math>Cl_{50}</math>= 4.3 <math>\mu</math>M  <i>Morus bombycis</i>            (Hoang et al., 2009)</p>		<p>ácido lobarico  <math>Cl_{50}</math>= 0.87 <math>\mu</math>M  <i>Stereocaulon alpinum</i>            Liquen antártico            (Seo et al., 2009)</p>
	<p>ohioensina C  <math>Cl_{50}</math>= 4.3 <math>\mu</math>M  <i>Polytrichastrum alpinum</i>            Musgo antártico            (Seo et al., 2008)</p>		<p>KS-506a  <math>Cl_{50}</math>= 4.9 <math>\mu</math>M  <i>Mortierella vinacea</i>            (Oh et al., 2004)</p>
	<p>nocardiona A  <math>Cl_{50}</math>= 14 <math>\mu</math>M  <i>Nocardia</i> sp.            (Otani et al., 2000)</p>		<p>grecociclina B  <math>Cl_{50}</math>= 0.52 <math>\mu</math>M  <i>Streptomyces</i> sp.            (Paululat et al., 2010)</p>

### 1.5. Productos naturales de origen fúngico como fuente de compuestos bioactivos

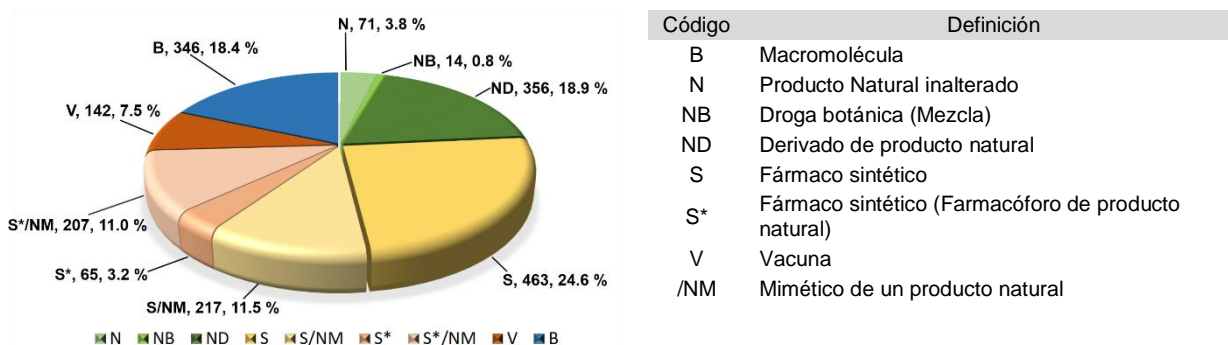
Los productos naturales, desde tiempos inmemoriales, han jugado un papel muy importante en la vida del ser humano, debido a su uso en el tratamiento de diversas patologías y a la vez como una fuente inagotable de compuestos bioactivos con estructuras novedosas interesantes, útiles para el desarrollo de nuevos tratamientos de diversas enfermedades (Osadebe et al., 2014). Actualmente, el estudio de los productos naturales como fuente de compuestos biodinámicos útiles en la terapéutica y en áreas como la industria alimenticia, la cosmética, la veterinaria y la agrícola, ha cobrado gran interés debido a la aparición de nuevas enfermedades, la resistencia a los fármacos de uso actual, y por la necesidad de fármacos que presenten menores efectos adversos (Hover et al., 2018; Strader et al., 2011; Koehn et al., 2005). Cabe destacar que del total de fármacos aprobados por la FDA entre los años 1981 y 2019 (1881), aproximadamente el 50 % son obtenidos a partir de productos naturales inalterados o



derivados de éstos; aunque la química combinatoria continúa desempeñando un papel importante en el desarrollo de fármacos, los productos naturales son una de las fuentes de inspiración más importante para la síntesis química (**Figura 11**) debido a su gran diversidad estructural (Luthra et al., 2020; Newman y Cragg, 2020; González-Medina et al., 2017).

Hasta el año 2019 se han descrito más de 500,000 productos naturales, de los cuales, aproximadamente 36,000 provienen de microorganismos, y de éstos, 15,600 son de origen fúngico (Chen et al., 2019; Bills et al., 2016).

Los hongos han sido una de las fuentes más ricas de productos naturales, ya que son capaces de producir compuestos estructuralmente diversos y con potentes actividades biológicas. Además, se ha demostrado que estos organismos poseen numerosos genes “silenciados” capaces de expresar nuevos productos naturales con esqueletos inusuales (González-Medina et al., 2017).

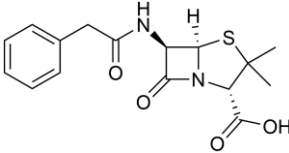
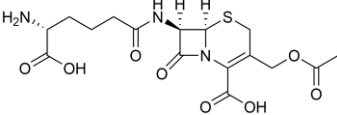
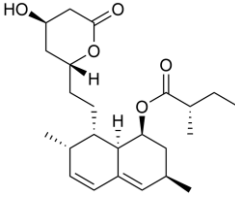
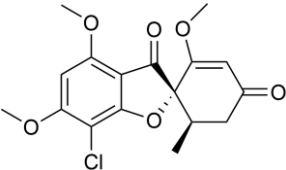
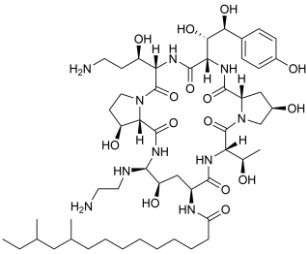
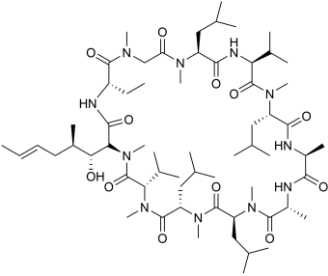
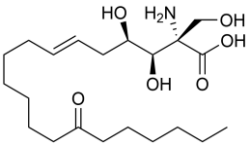
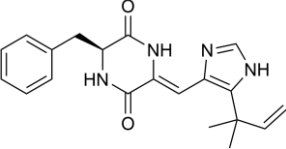


**Figura 11.** Fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019 (Newman y Cragg, 2020).

Los hongos son organismos ubicuos; se estima que en el mundo existen entre 2.2 a 3.8 millones de especies de hongos, de las cuales, menos del 10% han sido descritas taxonómicamente, y un número aún menor han sido estudiadas químicamente. Así, se estima que en México existen 200,000 especies fúngicas, de las cuales, solamente 6,500 han sido descritas en la literatura (Sarukhán et al., 2017; Aguirre-Acosta et al., 2014). Por lo tanto, la diversidad de especies y la maquinaria biosintética con la que cuentan estos organismos indican su potencial, casi ilimitado y sin explotar, como fuente de nuevas moléculas bioactivas (Hawksworth et al., 2017; Du et al., 2014).

De manera adicional, algunos productos naturales de origen fúngico son considerados agentes terapéuticos de elección o compuestos líderes en el desarrollo de terapias efectivas contra enfermedades autoinmunes, cáncer e infecciones. Algunos ejemplos son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas; los hipocolesterolémiantes, como las estatinas y sus derivados; antifúngicos como la griseofulvina y caspofungina; el inmunosupresor ciclosporina A; el inmunomodulador fingolimod obtenido por semisíntesis a partir de la miriocina; entre otros (**Cuadro 4**; Alberti et al., 2017; Gragg y Newman, 2013).

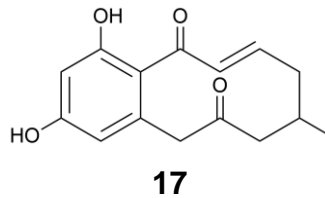
**Cuadro 4.** Ejemplos de fármacos de origen fúngico utilizados en la terapéutica.

			
penicilina G ( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	cefalosporina C ( <i>Cephalosporium acremonium</i> )	lovastatina ( <i>Aspergillus terreus</i> )	griseofulvina ( <i>Penicillium griseofulvum</i> )
			
caspofungina (semisintético)	ciclosporina A ( <i>Tolypocladium inflatum Gams</i> )	miriocina ( <i>Isaria sinclairii</i> )	halimida ( <i>Aspergillus ustus</i> )

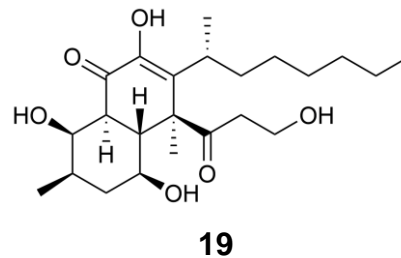
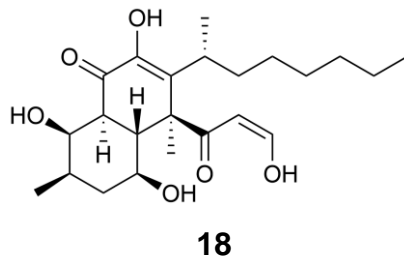
### 1.6. Antecedentes del género *Preussia*

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

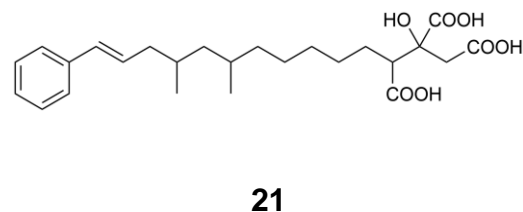
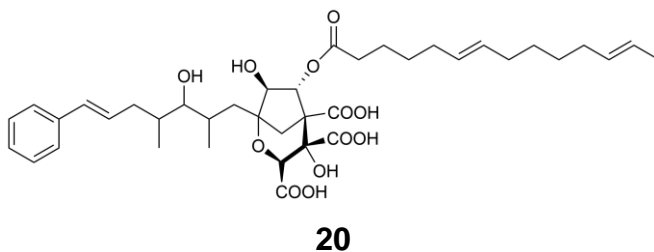
De *Preussia* sp. M5032 (FERM P-9506), un hongo aislado del excremento de oveja, se obtuvo el inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, esporostatina (**17**) (Kinoshita et al., 1997).



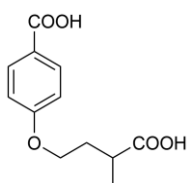
De *P. australis* (Spegazzini) Ahmed & Cain, una especie aislada del excremento de alce recolectado en el Condado de Cook, Estado de Minnesota, EUA, se aislaron los policétidos australifungina (**18**) y el australifunginol (**19**). La australifungina mostró una actividad antifúngica de amplio espectro contra patógenos en humanos. Este compuesto inhibe también la ceramida sintasa, enzima involucrada en la síntesis de esfingolípidos en plantas (Abbas et al., 1997; Mandala et al., 1994).



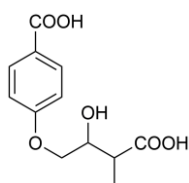
*Preussia intermedia* (Auersw.) S. I. Ahmed & Cain ex Kobayasi, especie coprófila aislada del excremento de conejo en Tucson, Arizona, EUA, biosintetiza ácido zaragócico B (**20**) y el citrato de alquilo L-731,128 (**21**). Ambos compuestos inhiben la escualeno sintasa, enzima involucrada en la síntesis de colesterol, y poseen propiedades antifúngicas (Hensens et al., 1995; Bergstrom et al., 1995).



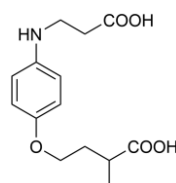
*Preussia vexans* (Auerswald) Ahmed & Cain (JS 306), otra especie coprófila aislada del excremento del puercoespín en New Brunswick, Canadá. De este, se aislaron las esporovexinas A-C (**22-24**), derivadas del ácido 4-hidroxibenzoico y 3'-O-desmetil-1-epipreusomerina C (**25**) (Soman et al., 1999). Tanto la esporovexina A como la 3'-O-desmetil-1-epipreusomerina C demostraron actividades antifúngica y antibacteriana.



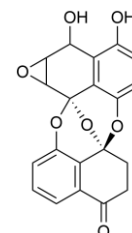
**22**



**23**

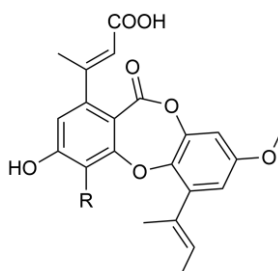


**24**



**25**

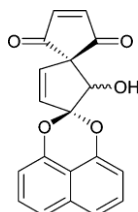
De una muestra de mangle se asiló la especie *P. aurantiaca* de la cual se obtuvieron dos depsidonas, las aurantiacinas A (**26**) y B (**27**), las cuales presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Poch y Gloer, 1991).



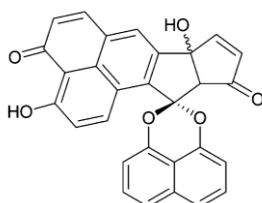
**26:** R=CH<sub>2</sub>OH

**27:** R=CHO

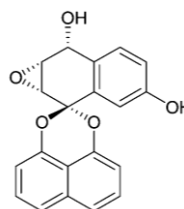
De *Preussia* sp., endófito de *Aquilaria sinensis*, se obtuvieron tres análogos de espirobinaftalenos, las espiropreusionas A (**28**) y B (**29**) y la espiropreusomerina A (**30**). Los compuestos **28** y **29**, presentaron actividad citotóxica frente a la línea celular A2780 y BEL-7404 con valores de Cl<sub>50</sub> de 2.4 y 3.0 μM, respectivamente. Mientras que **30** mostró actividad inhibitoria débil, frente a *S. aureus* (CMCC B26003) con una MIC de 25 μM (Chen et al., 2009).



**28**

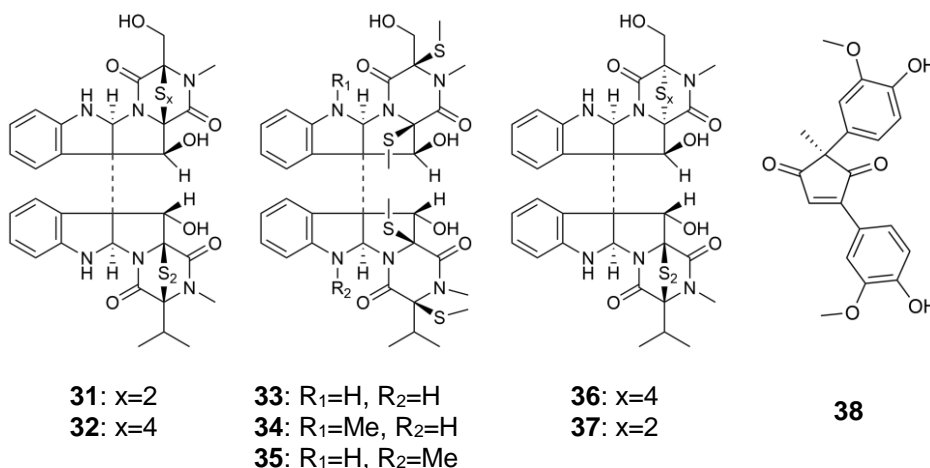


**29**

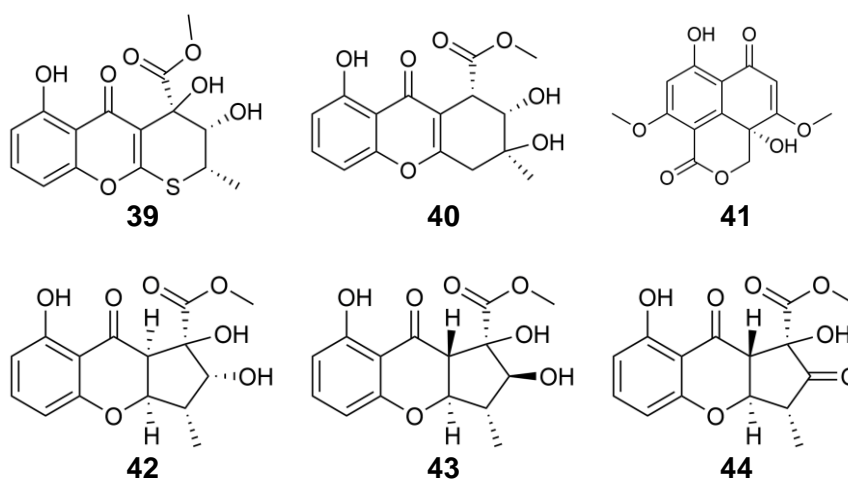


**30**

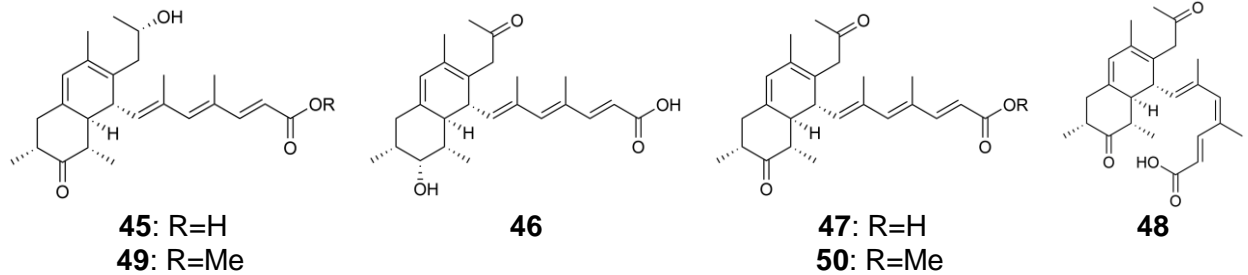
De *Preussia typharum*, se aislaron un grupo de epipolítiodicetopiperazinas, las preussiadinas A (**31**) y B (**32**), las preussiadinas A<sub>1-3</sub> (**33-35**) y las leptocinas A (**36**) y C (**37**) con actividad citotóxica frente al panel de líneas celulares NCI-60. El compuesto **31** presentó la mejor actividad inhibitoria frente a la línea celular HT29 (adenocarcinoma colorrectal) con una CI<sub>50</sub> de 5.6 nM (Du et al., 2014). De esta especie también se obtuvo una 2,5-diarilciclopentenona, la preussidona (**38**; Du et al., 2012).



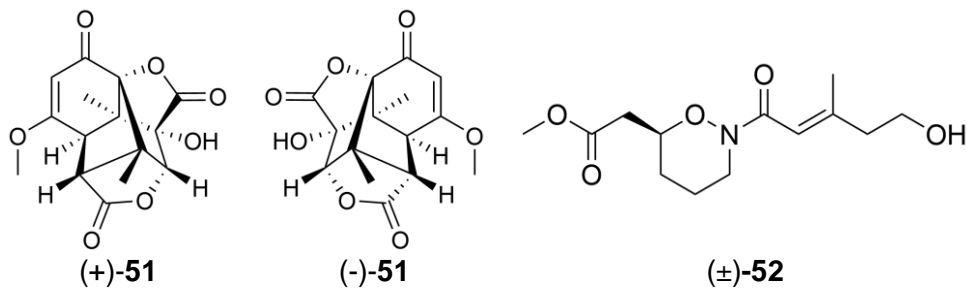
Del hongo endoliquénico *P. africana* se aisló una tiopiranocromenona, la preusocromona A (**39**) y las preusocromonas B-F (**40-44**). Siendo la preusocromona A y C, las que mostraron actividad citotóxica frente a la línea celular A549 de adenocarcinoma alveolar con una CI<sub>50</sub> de 8.3 y 5.7 μM, respectivamente (Zhang et al., 2012).



Del hongo endófito *P. similis* se aislaron seis policétidos llamados preussolidas A-F (**45-50**), las cuales mostraron actividad antiproliferativa frente a células de osteosarcoma (U2OS), siendo los compuestos **45** y **47** los más activos con una  $CI_{50}$  de 7.0 y 6.8  $\mu$ M, respectivamente (Noumeur et al., 2017).

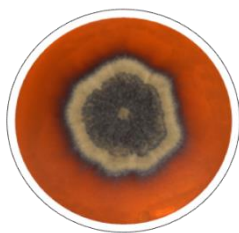


A partir de la especie *P. isomera* se aislaron un par de sesquiterpenoides llamados ( $\pm$ )-preusiolactona A (**51**), los cuales presentan un arreglo tricíclico sin precedentes de tipo triciclo[4.4.0<sup>1,6</sup>.0<sup>2,8</sup>]decano. Adicionalmente, la ( $\pm$ )-preusiolactona presentó actividad frente a *Micrococcus luteus* con una MIC de 10.2  $\mu$ M (Xu et al., 2019). Recientemente, se aisló un alcaloide novedoso con un arreglo inusual, un anillo de tipo tetrahydro-2H-1,2-oxazina, llamado ( $\pm$ )-preisomida (**52**); este compuesto se evaluó como antibacteriano con muy poca actividad (Chen et al., 2020).



### 1.7. Antecedentes de las especie *Preussia minimoides*

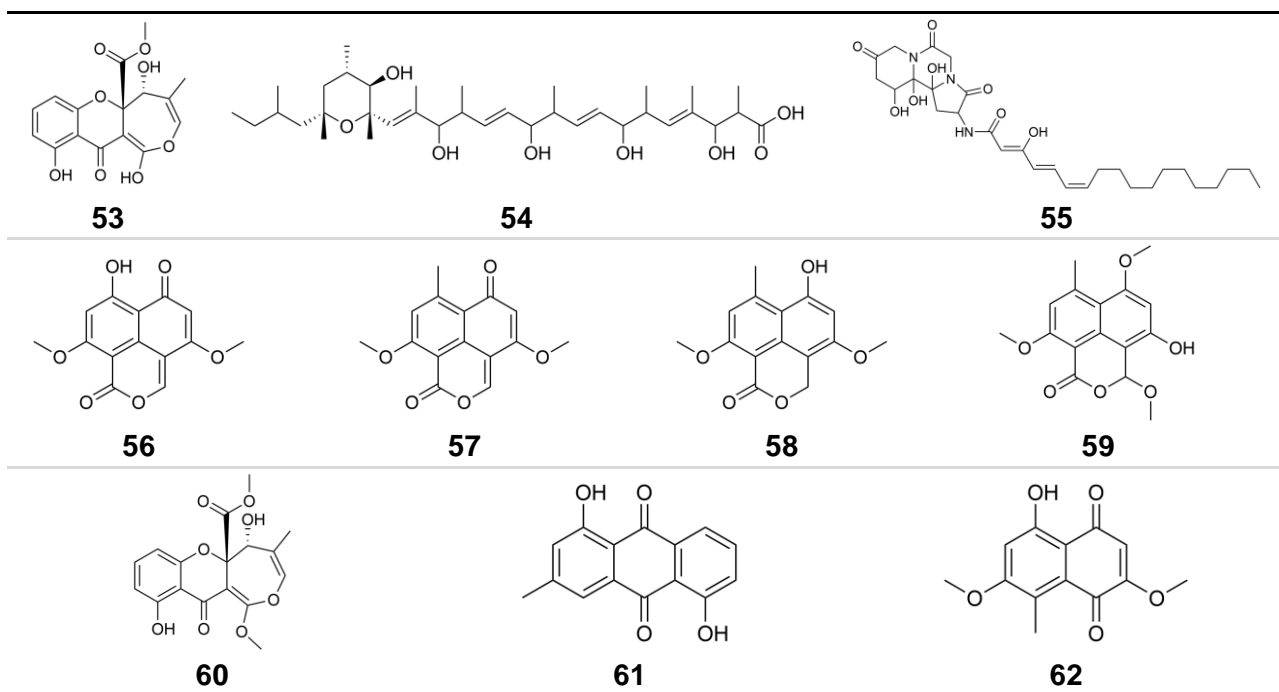
*Preussia minimoides* S. I. Ahmed & Cain (Sinónimo: *Sporormiella minimoides*), es un hongo saprófito ampliamente distribuido; se ha aislado del excremento de jirafa en la región de Namutoni, Namibia; de los tejidos de *Pinus tabuliformis*, un pino nativo del Norte de China; y de los basidiomas de *Trametes hirsutum*, recolectado de una rama de madera en un bosque subalpino seco en Hawaii (Yu y Liang-Dong, 2004; Bugni et al., 2003; Clapp-Shapiro et al., 1998).



**Figura 12.** *Preussia minimoides*

La especie *P. minimoides* ha sido objeto de estudios químicos previos, estos análisis condujeron a la caracterización de varios policétidos incluyendo el brocaenol A (**53**) (Bugni et al., 2002), la esporminarina A (**54**), (Mudur et al., 2006) y el depsipéptido **55** (Clapp-Shapiro et al., 1998). Estos tres últimos productos son antifúngicos, mientras que el brocaenol A es un agente citotóxico (Mudur et al., 2006). Más recientemente, se reportó la obtención de la corimbiferona (**56**), la corimbiferona C (**57**), la corimbiferan lactona D (**58**), la corimbiferan lactona E (**59**), el brocaenol B (**60**), la ziganeina (**61**) y la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**62**) de una cepa endófito de las hojas de la planta medicinal *Hintonia latiflora* (Leyte-Lugo et al., 2013). Las estructuras de los metabolitos obtenidos de la especie se indican en el **Cuadro 5**.

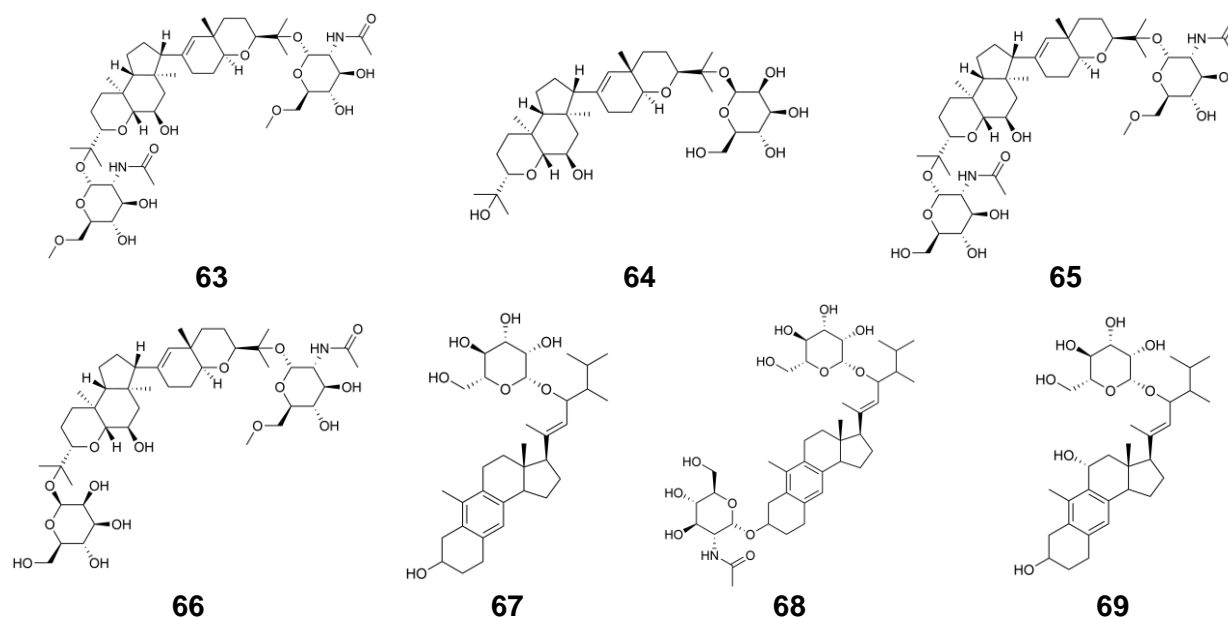
**Cuadro 5.** Metabolitos reportados para la especie *S. minimoides*.



## 1.8. Antecedentes del género *Malbranchea*

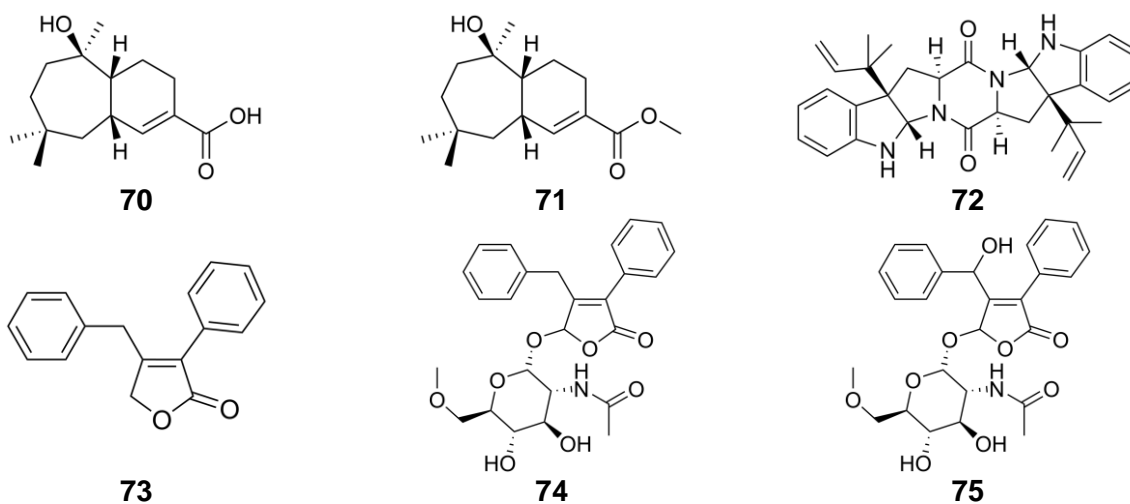
El género *Malbranchea* comprende 18 especies distribuidas alrededor del mundo; estas pueden ser mesófilas, termotolerantes o termofílicas, estas se clasificaron según sus características morfológicas en: *M. albolutea*, *M. arcuata*, *M. aurantiaca*, *M. chrysosporioidea*, *M. circinata*, *M. dendritica*, *M. flava*, *M. flavorosea*, *M. flocciformis*, *M. fulva*, *M. gypsea*, *M. sulfurea*, *M. pulchella*, *M. graminicola*, *M. filamentosa*, *M. multicolor*, *M. cinnamomea* y *M. sclerotica*. Este género es una fuente importante de enzimas y metabolitos secundarios, los cuales pertenecen a diferentes categorías estructurales, incluyendo esteroides modificados, triterpenoides, sesquiterpenoides, compuestos de tipo C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>C<sub>2</sub>, alcaloides indólicos, policétidos, indol-monoterpenoides, entre otros (Wakana et al., 2008).

De la especie *M. filamentosa* se aislaron los malbranqueósidos A-D (**63-66**); estos compuestos pertenecen a la familia de los triterpenoides aminoglicosilados, siendo los primeros metabolitos de origen fúngico con esta característica estructural. Estos productos presentaron actividad relajante sobre el músculo liso vascular (Wakana, 2008; Wakana et al., 2007). Posteriormente, se obtuvieron tres antrasteroides, los malsterósidos A-C (**67-69**). Los compuestos **67** y **69** presentaron actividad citostática frente a las líneas celulares Hela y A549 de carcinoma de pulmón (Wakana et al., 2014).

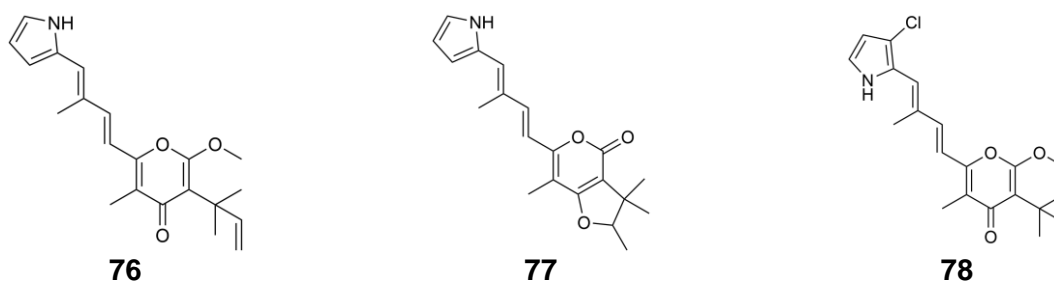


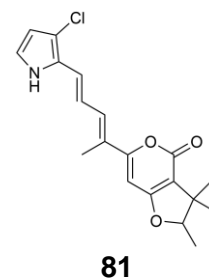
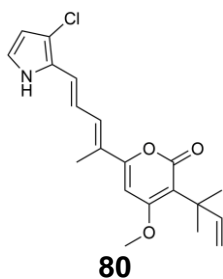
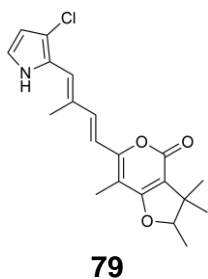


Adicionalmente, también se aislaron los malfilanoles A (**70**) y B (**71**), los cuales mostraron efecto antifúngico contra *Cryptococcus neoformans* y actividad citotóxica frente a la línea celular HUVEC (Wakana et al., 2009); la amauromina (**72**), un alcaloide indólico, aislado por primera vez a partir del hongo *Amauroascus* sp. que actúa como vasodilatador bloqueador de canales de calcio (Wakana et al., 2008; Takase et al., 1985); el gymnoascólida A (**73**) con propiedades vasodilatadoras y antifúngicas (Clark et al., 2005; Hosoe et al., 2005) y los malfilamentósidos A (**74**) y B (**75**) (Wakana et al., 2008).

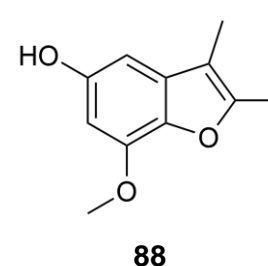
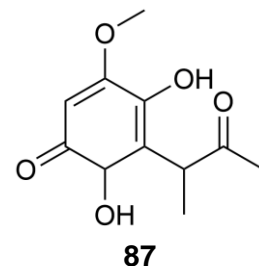
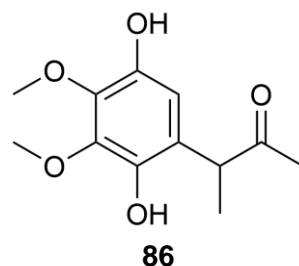
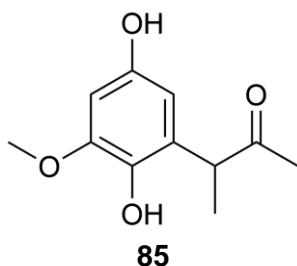
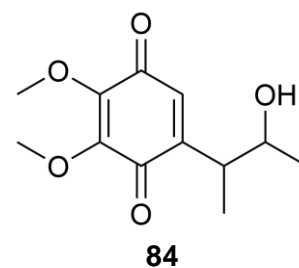
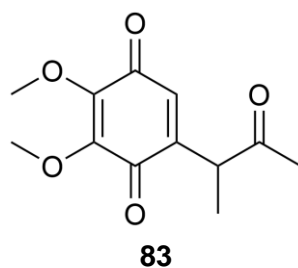
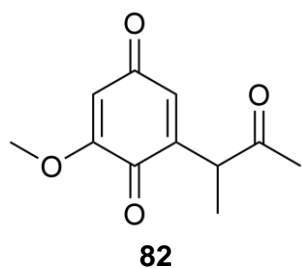


De la especie termófila *M. sulfurea* se aislaron los malbranpirroles A-F (**76-81**), agentes citotóxicos contra las líneas celulares PANC-1 (carcinoma epiteloides de páncreas), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria) (Yang et al., 2009). De esta especie, también se han aislado enzimas termoestables con posible uso industrial, entre ellas una endoproteasa alcalina tipo serín proteasa (Abu-Shady et al., 2001), una  $\alpha$ -glucosidasa (Gupta y Gautam, 1993), fitasas (El-Gyndy et al., 2009), la termomicolina, una termomicolasa no específica (Juntunen et al., 2015) y una hidrolasa capaz de degradar poliésteres alifáticos (Nishioka et al., 1996).



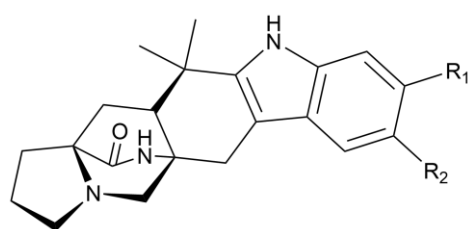


De *M. cinnamomea*, se han aislado metabolitos de tipo benzoquinona e hidroquinona (**82-87**). De estas, la malbrancina (**82**) presentó actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas y citotóxica contra las líneas celulares P388 (linfoma de monocitos) y KB (carcinoma/papiloma) (Schlegel et al., 2003; Chiung et al., 1993); en tanto que la 7-metoximalbrancina (**83**) inhibió la transcripción del retrovirus HTLV-1 causante del linfoma de Hodking (Graefe et al., 2004). Adicionalmente, se aisló el 7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (**88**), el cual mostró actividad antioxidante al presentar actividad inhibitoria sobre las enzimas xantina oxidasa y peroxidasa (Schlegel et al., 2003).

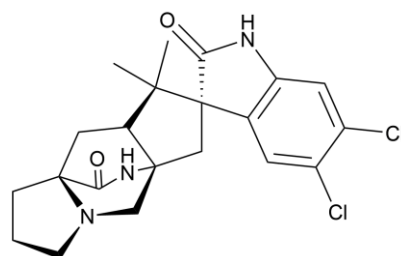


Esta especie considerada un fuente importante de enzimas termoestables, como lo son la leucina aminopeptidasa (Lin et al., 2020), las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO, por sus siglas en inglés) (Agrawal et al., 2019 Huttner et al., 2019), xilanasas (Basotra et al., 2018; Fan et al., 2013), lipasas (Geetha, 2018), cutinasas (Duan et al., 2017), glicosil hidrolasas lignocelulíticas (celulasas, hemicelulasas, liasas y esterases) (Mahajan et al; 2016) y una  $\alpha$ -glucosidasa (Yan et al., 2015).

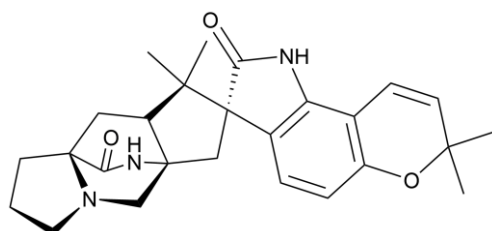
De la especie terrestre *M. aurantiaca* y de la especie marina *M. graminicola* se aislaron alcaloides de tipo indol-monoterpenoide con un núcleo novedoso de tipo bicyclo [2.2.2] diazooctano con una monocetopiperazina en el bicyclo; la configuración en el puente del bicyclo es de tipo *syn*. Estos productos incluyen a la malbranqueamida (**89**), la premalbranqueamida (**90**), las malbranqueamidas B-D (**91**, **93**, **95**) y las isomalbranqueamidas B-D (**92**, **94**, **96**). Adicionalmente, De *M. graminicola* se obtuvieron también la (-)-espiromalbramida (**97**), la (-)-notoamida B (**98**) y la (-)-paraherquamida B (**99**) (Fraley et al., 2020; Fraley et al., 2017; Figueroa et al., 2011; Watts et al., 2011; Ding et al., 2008; Figueroa et al., 2008; Martínez-Luis et al. 2006; Martínez-Luis et al.; 2005).



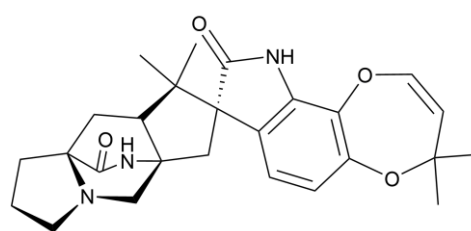
**89:** R<sub>1</sub>=Cl R<sub>2</sub>=Cl    **90:** R<sub>1</sub>=H R<sub>2</sub>=H  
**91:** R<sub>1</sub>=Cl R<sub>2</sub>=H    **92:** R<sub>1</sub>=H R<sub>2</sub>=Cl  
**93:** R<sub>1</sub>=Br R<sub>2</sub>=H    **94:** R<sub>1</sub>=H R<sub>2</sub>=Br  
**95:** R<sub>1</sub>=Cl R<sub>2</sub>=Br    **96:** R<sub>1</sub>=Br R<sub>2</sub>=Cl



**97**



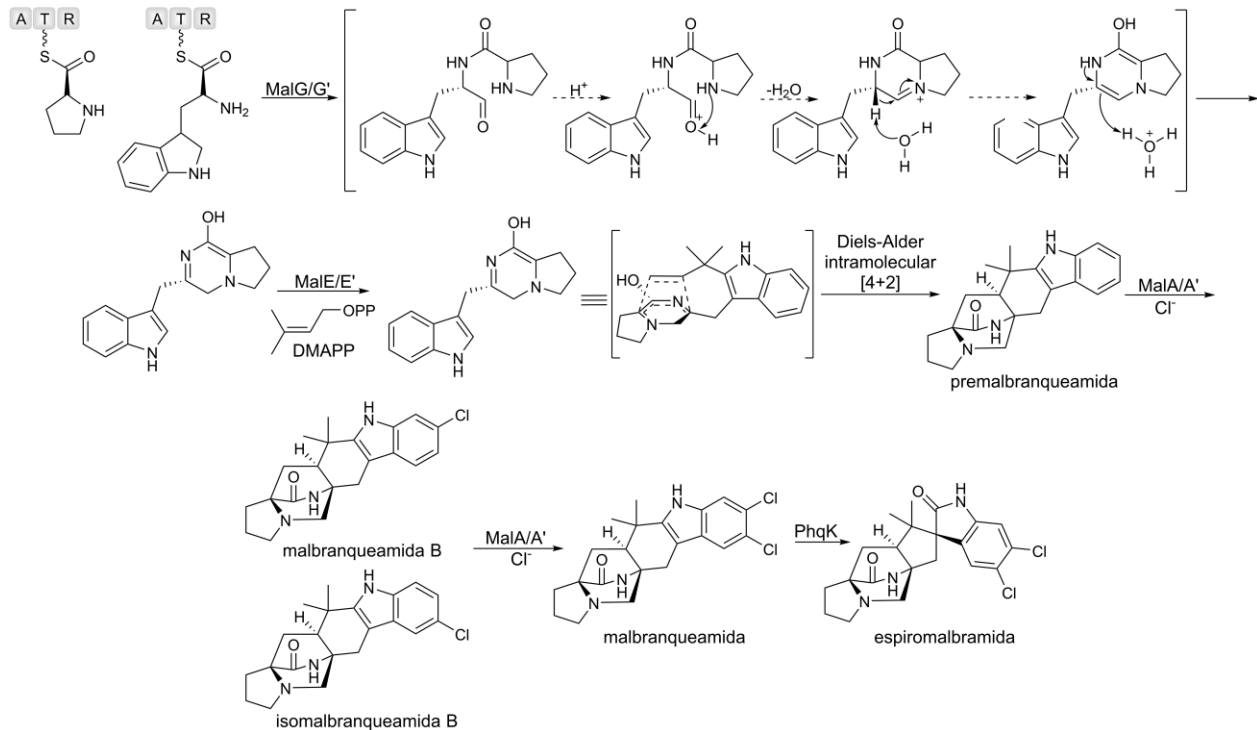
**98**



**99**

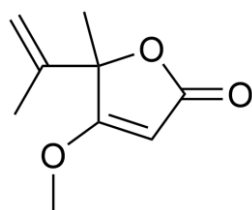
La malbranqueamida (**89**) se identificó como un potente inhibidor de la calmodulina (utilizando el biosensor *hCaM M124C-mBBr*), presentando una  $CI_{50}$  de 3.04  $\mu$ M (González-Andrade et al., 2009). Los compuestos **89-92** presentaron actividad vasorelajante de la musculatura lisa utilizando un modelo de aorta de rata, siendo el compuesto **89** el más activo con una  $CI_{50}$  de 2.7  $\mu$ M (Madariaga-Mazón et al., 2015). La malbranqueamida también mostró efecto fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas *Amaranthus hypochondriacus* con una  $CI_{50}$  de 0.37  $\mu$ M (Martínez-Luis et al., 2006).

Recientemente, se determinó la ruta biosintética de este tipo de compuestos, así como los genes responsables de su biosíntesis (Fraley et al., 2017) (**Figura 13**).

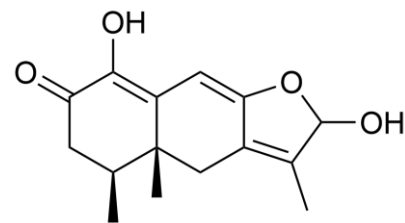


**Figura 13.** Ruta biosintética de la malbrancheamida y la espiomalbramida (Fraley et al., 2017).

Adicionalmente, se aisló de *M. aurantiaca*, el ácido penicílico (**100**) y un derivado el eremofilano (**101**), los cuales presentaron actividad fitotóxica al inhibir el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* con una  $CI_{50}$  de 3.86 y 6.57  $\mu$ M, respectivamente. Al igual que otras especies, es una fuente de enzimas de interés como halogenasas dependientes de flavina (Sherman et al., 2020), queratinasas (Kumaret al., 2015) e indol preniltransferasas (Steffan et al., 2009; Ding et al., 2008).

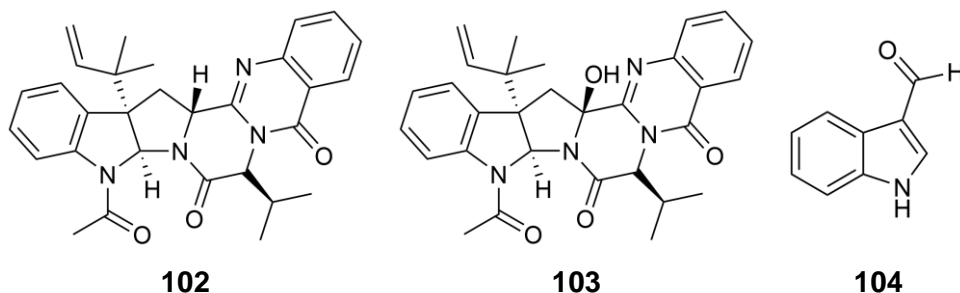


**100**



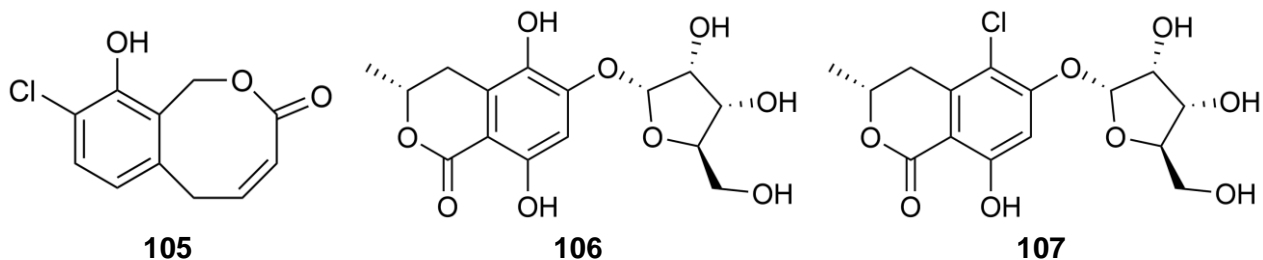
**101**

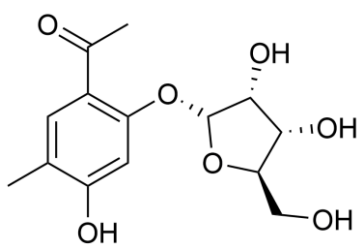
De la especie *M. albolutea* se aislaron dos ardeminas que no se habían reportado previamente en el género *Malbranchea*, la 5-*N*-acetil-8- $\beta$ -isopropilardemina (**102**) y la 5-*N*-acetil-15 $\beta$ - $\beta$ -hidroxi-8- $\beta$ -isopropilardemina (**103**); adicionalmente, se aisló el 1-*H*-indol-3-carboxialdehído (Díaz, 2018).



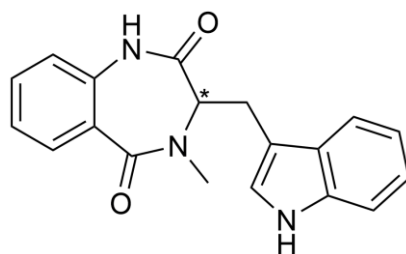
A partir de la especie *M. flavorosea* se obtuvo el 8-cloroxilarinol A (**105**), el flavorroseósido (**106**), el flavorroseósido B (**107**), la 4-hidroxi-2-*O*- $\alpha$ -ribofuranosil-5-metilacetofenona (**108**), la (S)-3,4-dihidro-3-((1*H*-indol-3-il)metil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**109**); así como el xilarinol A (**110**) y B (**111**), la masarigenina B (**112**) y C (**113**), clavatol (**114**), rosigenina (**115**), masarilactona B (**116**) y el riboxilarinol B (**117**) (Verastegui-Omaña et al., 2017; Rebollar-Ramos et al., 2018).

Los compuestos **110**, **111** y **113** presentaron actividad inhibitoria frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* con una  $CI_{50}$  de 1.07, 2.25 y 1.25 mM, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó el efecto antihiper glucémico del compuesto **113** mediante un ensayo *in vivo* de tolerancia oral a la sacarosa en ratones normo- e hiper glucémicos, mostrando un efecto comparable al de la acarbosa, utilizada como control positivo (Verastegui-Omaña et al., 2017). El compuesto **109** fue activo frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de *Ruminococcus obeum* y de *S. cerevisiae* con una  $CI_{50}$  de 1.33 mM y de 0.19 mM, respectivamente (Rebollar-Ramos et al., 2018).

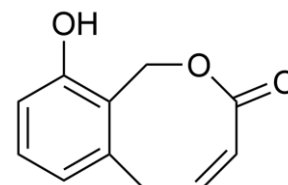




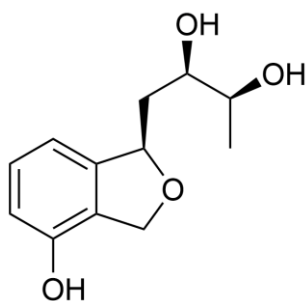
108



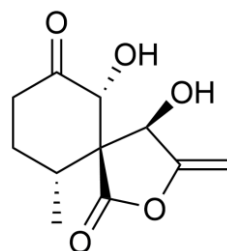
109



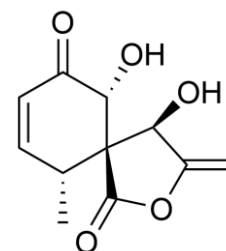
110



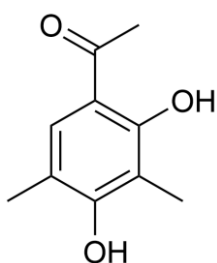
111



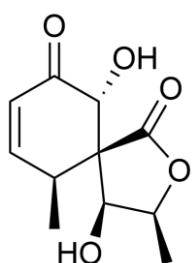
112



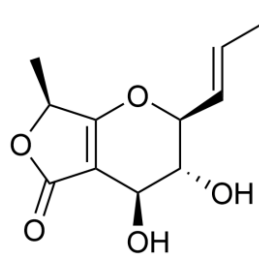
113



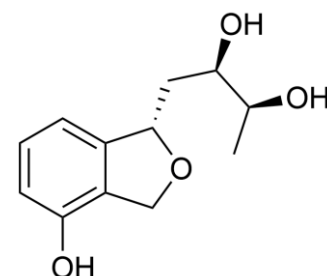
114



115



116



117

De la especie termófila *M. pulchella* (sinónimos: *M. bolognesii-chiurcoi* Vuill. y *M. kambayashii* Kambay), se han aislado principalmente enzimas termoestables de tipo  $\beta$ -glucosidasa (Oliveria et al., 2020), xilanas (Ribeiro et al., 2014), trehalasa (Pereira et al., 2011), termomicolinasa (Gaucher y Stevenson, 2004), lipoamida deshidrogenasa (McKay y Stevenson, 1979), con aplicaciones potenciales en biotecnología. De igual manera, se reportó el aislamiento de los ciclopéptidos malbranchina A y B, los cuales presentaron actividad antimicrobiana (Bai y Rao, 1966); de *M. gypsea*, solo se ha reportado el aislamiento de queratinasas (Kumar y Kushwaha, 2014; Singh, 1999; Youssef et al., 1992); de *M. flocciformis*, *M. dendritica* y *M. multicolor*, se aislaron xiloglucanasas (Wu et al., 2001); de *M. flava*, se aislaron hemicelulasas (Sharma et al., 2016), queratinasas (Kumar y Kushwaha, 2014) y xilanasas termoestables (Sharma et al., 2010); de *M. fulva* y *M. arcuata*, solo se cuenta con el reporte de actividad queratinolítica (Deshmukh, 2002; Marchisio et al., 1994).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento en la incidencia a nivel mundial de casos de DMT2 y que esta enfermedad representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel internacional, existe una creciente necesidad de obtener nuevas entidades químicas que sirvan como prototipo estructural para el desarrollo de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de esta patología. El desarrollo de nuevos fármacos más eficaces que puedan inhibir la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y/o la PTP-1B ha cobrado gran interés. Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas retardan la absorción de glucosa previniendo altos niveles de glucemia posprandial y, con ello, diversas complicaciones. Desde la introducción de la acarbosa y el miglitol no se han encontrado compuestos más eficaces, de allí la necesidad de continuar con la búsqueda. La enzima PTP-1B ha cobrado gran interés como blanco de acción para el desarrollo de fármacos útiles para tratar la diabetes y obesidad, y el reto es encontrar agentes selectivos, ya que los tratamientos de la diabetes son crónicos, y que no induzcan hipoglucemia severa. En este escenario, los ascomicetos representan una fuente novedosa de agentes útiles para tratar numerosos trastornos, incluyendo los metabólicos. El mejor ejemplo fue el desarrollo de la lovastatina a partir de *Aspergillus terreus*.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo se generó como parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y de la PTP-1B con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo demostraron que los hongos endófitos aislados de las plantas medicinales, así como aquellos del género *Malbranchea* son fuente de entidades químicas bioactivas novedosas y constituyen un punto de partida para el descubrimiento de nuevos inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y de la PTP-1B.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

Consideraciones de tipo quimiotaxonómico permiten proponer que las especies *Malbranchea circinata* y *Preussia minimoides* biosintetizan metabolitos secundarios con efecto inhibitorio sobre las enzimas PTP-1B y/o  $\alpha$ -glucosidasas de utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos.

#### 3.2. Objetivo

El objetivo principal consiste en descubrir nuevos inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y PTP-1B de utilidad para el desarrollo de fármacos innovadores y/o herramientas de investigación a partir de los hongos *Preussia minimoides* y *Malbranchea circinata*.

#### 3.3. Objetivos Particulares

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

- Cultivar en pequeña y mediana escala las especies fúngicas y preparar su extractos orgánicos con el fin de realizar una evaluación preliminar de su efecto inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y PTP-1B.
- Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos y proceder al aislamiento y purificación de los metabolitos activos a partir de las fracciones activas.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. El cumplimiento de este objetivo conducirá a la caracterización de sustancias que representen prototipos estructurales innovadores para el desarrollo de agentes inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y PTP-1B.



- Evaluar el efecto inhibitorio de los principios activos puros con las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y PTP-1B, mediante un ensayo *in vitro*.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular para establecer el sitio probable de unión de los compuestos evaluados con las enzimas de interés, con la finalidad de complementar los resultados obtenidos del ensayo *in vitro*.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Material fúngico

#### 4.1.1. *Preussia minimoides*

El hongo endófito *Preussia minimoides* (Sporormiaceae) fue aislado a partir de las hojas de la especie medicinal *Hintonia latiflora*, las cuales fueron recolectadas por el Dr. Sol Cristians en el municipio de Huetamo (18° 31.709' N, 101° 4.692' O; 221 msnm), estado de Michoacán, México, en el año 2010 (Leyte-Lugo et al., 2013).

La clasificación taxonómica de la especie fúngica fue establecida mediante el análisis de las características morfológicas (macro y microscópicas) por la Dra. María del Carmen González (Instituto de Biología, UNAM) y el Dr. Anthony E. Glenn (Toxicology and Mycotoxin Research Unit, USDA-ARS, Georgia, EUA). Un cultivo de referencia (voucher: 26355) se mantiene en la colección fúngica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, UNAM. Posteriormente, se llevó a cabo la identificación mediante el análisis genético del espaciador de transcripción interno del ARNrribosomal (ITS) y de la subunidad 28S ribosomal. Los datos de la secuenciación fueron depositados en el GenBank con los números de acceso KF557658 y KF557659 para la región ITS y 28S, respectivamente. Adicionalmente, se realizó el análisis comparativo por homología de las secuencias obtenidas con aquellas reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), lo cual, junto con el análisis morfológico reafirma la identidad de la cepa aislada como *P. minimoides*.

#### 4.1.2. *Malbranchea circinata*

La especie fúngica *Malbranchea circinata* Sigler y Carmichael (ATCC 34526) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). Para colocar el hongo en un contexto filogenético y dado que la cepa original se depositó hace más de 40 años en el ATCC (Sigler y Carmichael, 1976), se realizó la secuenciación de la cepa ATCC 34526 para la región ITS (ITS1, 5.8S e ITS2), así como de la subunidad 28S, utilizando combinaciones de los primers ITS1F e ITS440 (Gardes et al., 1991; White et al., 1990) y LROR y LR642 (Rehner y Samuels, 1995; Vilgalys y Hester, 1990) utilizando métodos descritos previamente por Raja y colaboradores en

2017. Los datos obtenidos de la secuenciación fueron depositados en el GenBank con los números de acceso: ITS: MN627784, MN627785; LSU: MN627782, MN627783. El análisis comparativo por homología de las secuencias obtenidas y las presentes en el GenBank fueron idénticas, por lo que confirmaron la identidad de la cepa como *M. circinata*. Esta caracterización la realizó el Dr. Huzefa Raja, investigador del Departamento de Bioquímica y Química de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, EUA.

## **4.2. Procedimientos generales**

### **4.2.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas**

De manera general, la caracterización estructural de los metabolitos secundarios aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Fisher-Johns. Los espectros en el infrarrojo (IR) se obtuvieron por la técnica de reflectancia (FTIR-ATR) en un espectrómetro Perkin-Elmer modelo 400 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) o en un espectrómetro Bruker Tensor 27 FT-IR (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). Los análisis de rotación óptica (RO) se realizaron en un polarímetro digital Perkin Elmer modelo 343 a 25°C utilizando como disolvente CHCl<sub>3</sub> o MeOH en la longitud de onda de la línea D-sodio ( $\lambda$  589 nm). Los espectros de ultravioleta (UV) y de dicroísmo circular electrónico (DCE) fueron registrados en un polarímetro Shimadzu modelo U160 (Shimadzu Corp., Kioto, Japón) y JASCO modelo J720 (JASCO International Corporation Ltd., Tokio, Japón) respectivamente, utilizando como disolventes CHCl<sub>3</sub> o MeOH. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bidimensionales se registraron en los equipos Bruker Avance III a 400 MHz (<sup>1</sup>H) o 100 MHz (<sup>13</sup>C) (Billerica, MA, EUA), Varian Inova-500 a 500 MHz (<sup>1</sup>H) o 125 MHz (<sup>13</sup>C) (Palo Alto, CA, USA) y Bruker AVANCE III HD equipado con una criosonda TCI CryoProbe 700 H-C a 700 MHz (<sup>1</sup>H) o 175 MHz (<sup>13</sup>C), utilizando CDCl<sub>3</sub> o CD<sub>3</sub>OD como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) fueron obtenidos en los espectrómetros Thermo LTQ Orbitrap XL (Waltham, MA, EUA) o JEOL AccuTOF-DART JMS-T100LC (JEOL Ltd., Tokio, Japón) en modo positivo. Los análisis por espectrometría de masas de baja

resolución se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia Waters Acquity UPLC H-Class® con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) acoplado a un detector de masas SQD2 mediante la técnica ionización por electro spray (UPLC-EM-ESI) en los modos positivo (ESI<sup>+</sup>) y negativo (ESI<sup>-</sup>). Las muestras se analizaron por inyección directa o mediante un sistema UPLC utilizando una columna fase reversa Acquity® BEH C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), utilizando como fase móvil una mezcla binaria de CH<sub>3</sub>CN (**A**) y agua (**B**; 0.1% ácido fórmico) en un gradiente de elución lineal: 0 min 15% **A**; 8 min 100% **A**; 10 min 100% **A**; 10.5 min 15% **A**; flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 μL; condiciones de análisis: voltaje capilar: 2.0 kV; voltaje cono: 30 V; temperatura de solvatación: 400°C; gas de solvatación: nitrógeno (N<sub>2</sub>) 650 L/h; gas cono: 10 L/h; PDA: 200-400 nm con una resolución de 4 nm. El control del equipo, adquisición y procesamiento de datos se realizaron utilizando el programa Empower 2.0 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA).

#### **4.2.2. Análisis cromatográficos**

El fraccionamiento y purificación de los extractos orgánicos y los metabolitos obtenidos se realizó empleando técnicas cromatográficas convencionales. Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron utilizando placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas de gel de sílice de 0.25 mm de grosor (gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, 10-12 μm; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y empleando diferentes sistemas de elución. La CCF tipo preparativo se realizó en placas de vidrio de distintas dimensiones de 1 mm de espesor recubiertas con gel de sílice y empleando diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (λ 254 y 356 nm) y como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> al 10 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calentando. Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron empleando gel de sílice como fase estacionaria (gel de sílice 60, malla 70-230 ASTM, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) o Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). La cromatografía tipo flash fue llevada a cabo en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen System (Teledyne Technologies, Inc., Lincoln, NE, USA) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA 200-400 nm), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y una bomba binaria.

Se utilizaron columnas RediSep Rf Gold Silica-gel fase normal (Teledyne) de distintos tamaños y como fase móvil, mezclas de hexano,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH en orden creciente de polaridad. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (CLAE-FR) de tipo analítica y preparativa se realizó en un cromatógrafo marca Waters®, equipado con una bomba cuaternaria modelo 2535, un detector de arreglo de fotodiodos modelo 2998 (PDA), un detector de dispersión de luz evaporativo modelo 2424 (ELSD), un inyector automático modelo 2727 y un módulo colector de fracciones. El control del equipo, la adquisición y procesamiento de datos se realizó utilizando el programa Empower® versión 3.0 (Waters, Milford, MA, EUA). Los análisis se realizaron en columnas fase reversa analíticas y/o preparativas Phenomenex® Gemini  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ , 250 × 4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ , 250 × 21.24 mm) o Phenomenex® Kinetex  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ , 250 × 4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ , 250 × 21.24 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Como sistema de elución se utilizaron mezclas de MeCN y agua (0.1% ácido fórmico) utilizando métodos combinados de elución entre sistemas de gradiente y/o isocráticos. Condiciones de análisis: flujo: 1 mL/min y 21.24 mL/min para el sistema analítico y preparativo, respectivamente; longitud de onda de detección: 190-400 nm. Las condiciones de análisis del detector ELSD fueron las siguientes: ganancia: 100; presión de gas: 40 psi; nebulizador en modo de calentamiento: 50 °C; temperatura del tubo: 70 °C. Los disolventes grado reactivo (hexano,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH) y grado CLAE (MeCN y agua) fueron adquiridos de J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA).

#### **4.3. Preparación de los cultivos y obtención de los extracto orgánicos**

Las especies objeto de estudio fueron sembradas en cajas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA; Difco® Fischer Scientific, Hampton, NH, EUA) para su conservación. La preparación de los inóculos se llevó a cabo a partir de un cultivo axénico de cada especie en medio PDA, el cual se dejó crecer por 10 días. Al término de este periodo, se inocularon seis matraces Erlenmeyer con 50 mL de caldo papa dextrosa (PDB; Difco® Fischer Scientific, Hampton, NH, EUA) previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121 °C con 1  $\text{cm}^3$  de agar que contenía al microorganismo y se mantuvieron en agitación a 100 rpm durante 10 días, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas, con la finalidad de

incrementar la biomasa. Transcurridos los 10 días, cada uno de los inóculos fue transferido a seis matraces Fernbach que contenían como medio de cultivo un sustrato sólido de arroz (200 g de arroz en 400 mL de agua) previamente esterilizado como se describió anteriormente y se dejaron crecer en condiciones estáticas, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, durante 45 días o 41 días para la especie *P. minimoides* y *M. circinata*, respectivamente.

La preparación de los extractos orgánicos se realizó mediante un proceso de maceración exhaustiva utilizando 700 mL de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (8:2) o CHCl<sub>3</sub>-MeOH (8:2) como disolventes de extracción para la especie *P. minimoides* y *M. circinata*, respectivamente; posteriormente se fragmentó manualmente el contenido de cada matraz y se colocaron en agitación a 100 rpm durante 3 h. Al cabo del proceso de extracción, se filtró al vacío el contenido de cada matraz y se sometió a un proceso de reparto adicionando 200 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CHCl<sub>3</sub>, según sea el caso y el volumen necesario de agua para obtener un volumen final de 2 L. La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos. Enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta última se sometió a un proceso de extracción con CHCl<sub>3</sub> (3 × 100 mL). Las fases orgánicas se concentraron a presión reducida. Posteriormente, los extractos fueron reconstituidos con 180 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se sometieron a un proceso de reparto con hexano (3 × 180 mL); las fracciones de hexano se descartaron, mientras que las fracciones de MeCN-MeOH se concentraron a presión reducida hasta sequedad.

#### **4.4. Estudio químico de la especie *Preussia minimoides***

##### **4.4.1. Fraccionamiento del extracto orgánico.**

La fracción de MeCN-MeOH (5.4 g), obtenida de la fermentación a mediana escala del hongo *P. minimoides*, se sometió a un fraccionamiento mediante una CCA, empleando una columna empacada con gel de sílice utilizando un gradiente de elución entre hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH con incrementos graduales de polaridad. Este proceso generó un conjunto de nueve fracciones primarias (F1-F9), las cuales fueron reunidas con base en su similitud cromatográfica.

#### 4.4.2. Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en *P. minimoides*

La fracción F6 se sometió a una cromatografía por exclusión utilizando Sephadex LH-20 y como fase móvil una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (8:2). De este fraccionamiento se obtuvieron seis fracciones (F<sub>6</sub>I-F<sub>6</sub>VI); de las cuales, la fracción F<sub>6</sub>IV (71.5 mg) fue purificada utilizando cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE-FR) utilizando una columna Gemini C<sub>18</sub> (250 × 21.24 mm, 5 μm, Phenomenex) y como fase móvil MeCN (**A**) y H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1 % ácido fórmico) con un gradiente de 30 % a 50 % de **A** en 30 min a un flujo de 21.24 mL/min, lo que permitió el aislamiento de la minimoidona A (**118**; 5.6 mg, *t<sub>R</sub>* = 6.3 min) como agujas amarillas.

La fracción F4 (154.8 mg) se desgrasa mediante lavados con hexano (4 × 20 mL); el sólido desgrasado (107.3 mg) se purificó utilizando una columna Gemini C<sub>18</sub> (250 × 21.24 mm, 5 μm, Phenomenex) y como gradiente de elución MeCN (**A**) y H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1 % ácido fórmico) de 60 % a 10 % de **A** en 15 min a un flujo de 21.24 mL/min, de la cual se aislaron la minimoidona B (**119**; 11.6 mg, *t<sub>R</sub>* = 7.1 min) como un sólido anaranjado y la corimbiferona (**56**; 20.3 mg, *t<sub>R</sub>* = 5.4 min) como un sólido amarillo.

La fracción F9 se sometió a una CCA en fase normal usando gel de sílice y como fase móvil una mezcla de hexano-AcOEt-MeOH, en orden creciente de polaridad. De este fraccionamiento se obtuvieron siete fracciones ((F<sub>9</sub>I-F<sub>9</sub>VII)). Posteriormente, la fracción F<sub>9</sub>IV (48.8 mg) fue purificada empleando una columna Gemini C<sub>18</sub> (250 × 21.24 mm, 5 μm, Phenomenex) y un gradiente de elución de MeCN (**A**) y H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1 % ácido fórmico) de 70 % a 50 % de **A** en 30 min a un flujo de 21.24 mL/min, de la cual se aisló la preusocromona C (**41**; 3.2 mg, *t<sub>R</sub>* = 6.5 min) como un sólido amarillo.

La fracción F2 (68.2 mg) se desgrasa mediante lavados con hexano (3 × 10 mL); el sólido resultante se sometió a una cromatografía en Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (8:2), resultando en cinco fracciones (F<sub>2</sub>I-F<sub>2</sub>V). De la fracción F<sub>2</sub>IV precipitó espontáneamente 16.3 mg de la 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**63**) como un sólido anaranjado.

### 4.4.3 Obtención de mayor cantidad de minimoidionas A (114) y B (115) mediante la adición de sulfato de dietilo (DES) al medio de cultivo para inducir la producción de metabolitos secundarios

#### 4.4.3.1 Preparación de la Suspensión Inicial de Esporas (SIE)

Se colocaron tres cubos de 0.5 x 0.5 x 0.5 cm de agar PDA obtenidos de un cultivo de *P. minimoides* en un tubo de centrifuga (Falcon) con 10 mL de agua estéril y se agitó durante 1 minuto para preparar una suspensión inicial de esporas.

#### 4.4.3.2 Tratamiento la suspensión de esporas de *P. minimoides* con DES

Las suspensiones de esporas tratadas con base en las diferentes condiciones señaladas en el **Cuadro 6**, se mantuvieron a 4 °C y se muestrearon a los días 1, 2, 7, 10, 15 y 30 tomando 40 µL de cada tubo para inocular dos cajas Petri con medio papa-dextrosa para cada uno de los tubos. Las cajas inoculadas se incubaron durante 5-7 días para observar el crecimiento de colonias.

**Cuadro 6.** Tratamiento de las esporas con sulfato de dietilo (DES) y dimetilsulfóxido (DMSO).

Grupo	%DMSO	%DES	Grupo	%DMSO	%DES
I		0.05%	IV		0.05%
II	5%	0.1%	V	10%	0.1%
III		0.25%	VI		0.25%

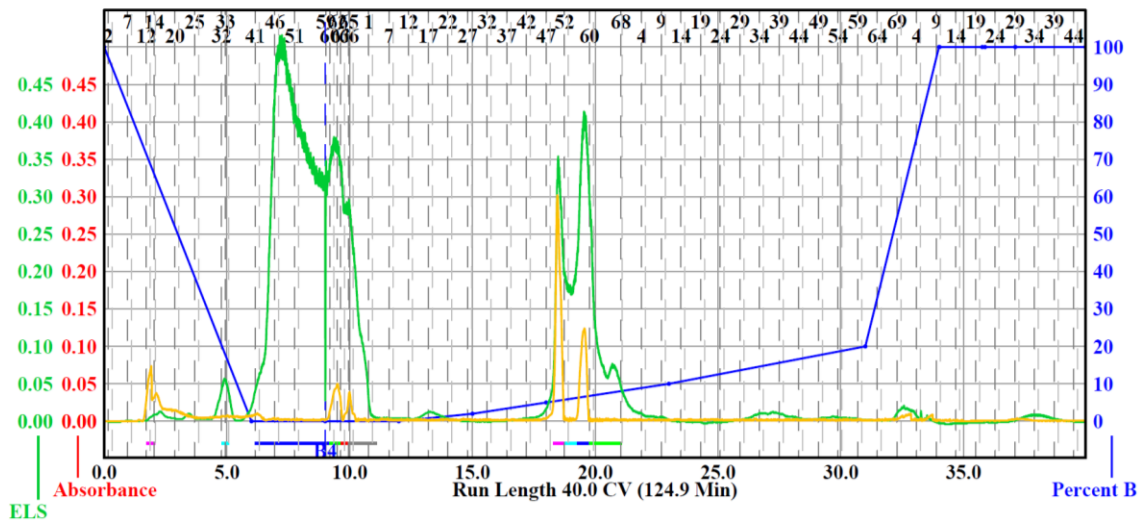
Las cepas de los grupos tratados con DES y DMSO a las diferentes concentraciones se obtuvieron mediante la selección de colonias con diferentes características morfológicas. Se lograron diferenciar 48 colonias distintas las cuales se sembraron en cajas de Petri con PDA. De cada una de estas cajas se inoculó 1 cm<sup>3</sup> de agar de en 15 mL de medio PDB en un tubo Falcon, los cuales se mantuvieron en agitación a 100 rpm, durante 7 días, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon matraces Erlenmeyer con medio semisólido de arroz (15 g de arroz con 30 mL de agua) para cada una de las colonias aisladas. Estos medios se fermentaron durante 45 días a temperatura ambiente, en condiciones estáticas con ciclos de luz y oscuridad de 12/12 horas.



Para obtener el extracto orgánico de cada matraz, se sometieron a un proceso de maceración con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) como disolvente de extracción y se mantuvieron en agitación durante 8 horas. Al término del proceso de extracción se filtraron los medios de cultivo utilizando un embudo Büchner, los extractos orgánicos crudos se sometieron a un proceso de reparto agregando 60 mL de  $\text{CHCl}_3$  y 60 mL de agua, las fases orgánicas se concentraron al vacío. Los extractos crudos se solubilizaron en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se sometieron a un proceso de reparto con hexano para desgrasar los extractos.

Estos extractos se analizaron primeramente por cromatografía en capa fina, para observar si existe alguna diferencia entre las cepas tratadas con DES y la cepa de referencia (Li, et al., 2016). Las cepas 4, 7 y 9 poseían diferencias con los demás extractos, por lo que se decidió cultivarlas a mediana escala. Para la fermentación se utilizaron 400 g de arroz en dos matraces Fernbach (200 g de arroz en 400 mL de agua), para cada una de las cepas de interés, todos en condiciones estáticas, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, durante 45 días. Se obtuvo el extracto orgánico mediante un proceso de maceración exhaustiva, utilizando una mezcla  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) como disolvente de extracción. Al término del proceso de extracción, el extracto crudo se filtró y concentró al vacío.

Los extractos se solubilizaron en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se sometieron a un proceso de reparto con hexano para desgrasarlos. Los extractos desgrasados mostraron similitud cromatográfica y se decidió juntarlos (2.9 g); posteriormente, se fraccionó mediante cromatografía flash en fase normal (**Figura 14**). Las 16 fracciones obtenidas se analizaron por CLAE-FR utilizando una columna Gemini  $\text{C}_{18}$  (250 × 21.24 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex) y se logró identificar, mediante el tiempo de retención, los máximos de absorción observados en el UV y la técnica de coelución, a la minimoidiona A (**118**), la minimoidiona B (**119**) y la corimbiferona (**56**).



**Figura 14.** Cromatograma obtenido del fraccionamiento secundario de la fracción MeCN-MeOH de *P. minimoides* M479ME.

**Cuadro 7.** Condiciones de análisis por cromatografía fase normal tipo flash de la fracción MeCN-MeOH de *P. minimoides* M479ME

Fracción (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes de columna	Tiempo (min)
2.6	80	20.0	40	40.0	124.9

#### 4.5. Estudio químico de la especie *Malbranchea circinata*

##### 4.5.1. Fraccionamiento del extracto orgánico

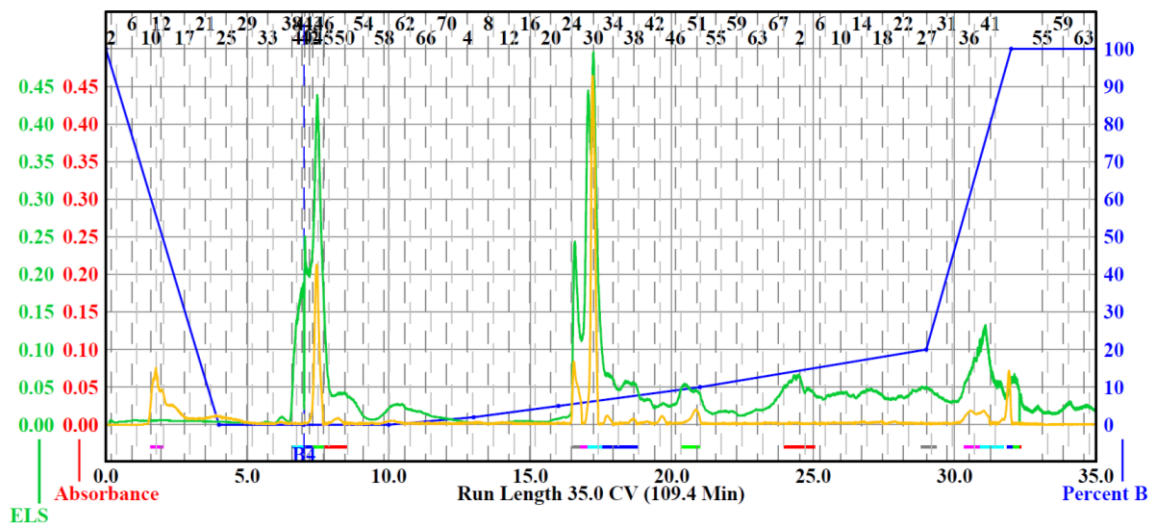
El extracto desgrasado de *M. circinata* (2.86 g) fue reconstituido en una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH y adsorbida en la cantidad mínima posible de celita y fue fraccionada utilizando una cromatografía tipo flash en fase normal utilizando diferentes mezclas de hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH en orden creciente de polaridad. Las fracciones fueron colectadas cada 23.0 mL y reunidas en 14 fracciones (F1-F14) de acuerdo a los perfiles de UV y ELSD. Las condiciones del fraccionamiento se resumen en los **Cuadros 8** y **9**, así como la **Figura 15**.

**Cuadro 8.** Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de la fracción MeCN-MeOH de *M. circinata*.

Extracto (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes de columna	Tiempo (min)
2.7	70	23.0	40.0	35	109.4

**Cuadro 9.** Fraccionamiento primario de la fracción MeCN-MeOH de *M. circinata*.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-40	F1	121.4
41-46	F2	248.6
47-53	F3	159.1
54-57	F4	32.3
58-70	F5	104.0
71-93	F6	86.9
94-98	F7	265.7
99-101	F8	215.7
102-105	F9	72.3
106-115	F10	40.3
116-124	F11	74.7
<b>125-172</b>	F12	492.8
<b>173-182</b>	F13	379.3
<b>183-206</b>	F14	200.1
<b>Total recuperado</b>		2493.2
<b>% Recuperado</b>		92.3 %



**Figura 15.** Cromatograma del fraccionamiento primario tipo flash de la fracción MeCN-MeOH de *M. circinata*.

#### 4.5.2. Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en *M. circinata*

La fracción F1 (121.4 mg) se sometió a un fraccionamiento por CCA utilizando un gradiente de elución de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75:25→0:100) obteniendo ocho fracciones (F1<sub>I</sub>-F1<sub>VIII</sub>). De la fracción F1<sub>II</sub> se obtuvieron 13.9 mg de compuesto 4-isoprenilravenelina (**126**) y de la fracción F1<sub>V</sub> se obtuvieron 11.8 mg de la mezcla de arugosina N (**129**) y su epímero, 1,6,10-trihidroxi-8-metil-2-(3-metil-2-butenil)-dibenzo[*b,e*]oxepin-11(6*H*)-ona (**130**).

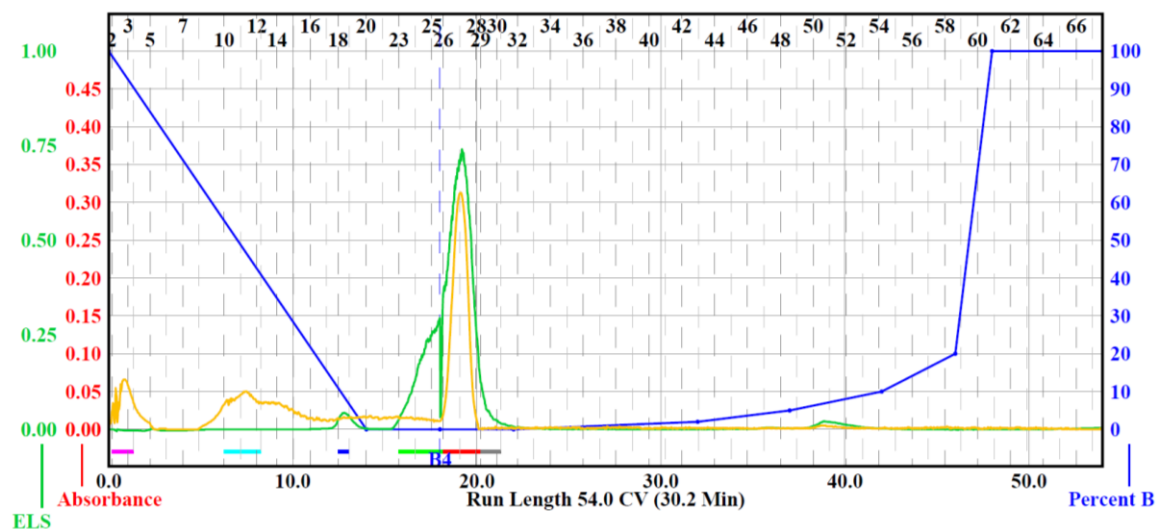
Para el fraccionamiento de F2 (248.6 mg), primero se llevó a cabo una cromatografía tipo flash (**Cuadro 10** y **11**; **Figura 16**) de la cual se obtuvieron siete fracciones. La fracción F2<sub>IV</sub> (146.6 mg) fue posteriormente purificada mediante CLAE-FR utilizando como fase móvil MeCN (**A**)-H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1 % ácido fórmico) en un gradiente de 65 % a 100 % de **A** en 15 min, con un flujo de 21.24 mL/min; de la cual se obtuvo 15.7 mg de amauromina (**72**; *t<sub>R</sub>* = 8.2 min).

**Cuadro 10.** Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de la fracción F2 de *M. circinata*.

Fracción (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes de columna	Tiempo (min)
220.0	12	15.0	30	54.0	30.2

**Cuadro 11.** Fraccionamiento primario de la fracción F2 de *M. circinata*.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-6	F2 <sub>I</sub>	5.3
7-21	F2 <sub>II</sub>	12.5
22-25	F2 <sub>III</sub>	21.8
26-32	F2 <sub>IV</sub>	146.6
33-49	F2 <sub>V</sub>	6.4
50-53	F2 <sub>VI</sub>	3.1
54-68	F2 <sub>VII</sub>	14.5
<b>Total recuperado</b>		210.2
<b>% Recuperado</b>		95.5 %



**Figura 16.** Cromatograma del fraccionamiento secundario tipo flash de la fracción F2 de *M. circinata*.

Para la fracción F3 (159.1 mg) se realizó una CCA utilizando un gradiente de elución de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (40:60→0:100; 100:0→85:15), de la cual se obtuvieron seis fracciones (F3<sub>I</sub>– F3<sub>VI</sub>). La fracción F3<sub>III</sub> se obtuvieron 23.7 mg del compuesto 3-(2',3',5'-O-triacetil- $\alpha$ -D-ribofuranosil)emodina (**124**).

La fracción F5 (86.9 mg) fue purificada mediante CCA utilizando como fase móvil hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (30:70→0:100; 100:0→70:30) de la cual se obtuvieron cuatro fracciones (F5<sub>I</sub>– F5<sub>IV</sub>). De la fracción secundaria F5<sub>II</sub> se obtuvieron 3.7 mg del compuesto 3-(2',3'-O-diacetil- $\alpha$ -D-ribofuranosil)emodina (**123**).

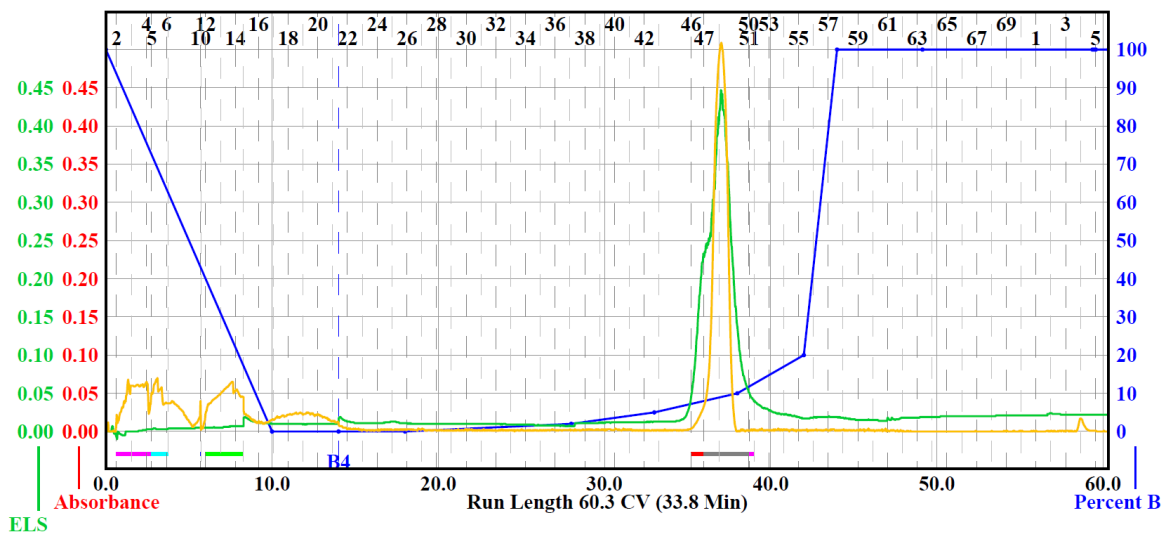
Para reducir la complejidad de la fracción F7 (264.7 mg) se realizó una cromatografía tipo flash (**Cuadro 12 y 13; Figura 17**) utilizando como fase móvil hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH, en orden creciente de polaridad; de este fraccionamiento se obtuvieron tres fracciones secundarias (F7<sub>I</sub>-F7<sub>III</sub>). La fracción F7<sub>II</sub> (179.4 mg) fue purificada mediante CLAE-FR utilizando un gradiente de MeCN (**A**)-H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1% ácido fórmico) 75 % a 100 % de **A** en 15 min, a un flujo de 21.24 mL/min. De esta fracción se obtuvieron 15.9 mg de malbranqueamida (**89**;  $t_R$  = 5.3 min) y 2.0 mg del compuesto **121** ( $t_R$  = 6.5 min).

**Cuadro 12.** Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de la fracción F5 de *M. circinata*.

Fracción (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes de columna	Tiempo (min)
264.7	12	15.0	30	60.3	33.8

**Cuadro 13.** Fraccionamiento primario de la fracción F5 de *M. circinata*.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-44	F2 <sub>I</sub>	25.7
45-52	F2 <sub>II</sub>	179.4
53-77	F2 <sub>III</sub>	41.5
<b>Total recuperado</b>		246.6
<b>% Recuperado</b>		93.1 %



**Figura 17.** Cromatograma del fraccionamiento secundario tipo flash de la fracción F7 de *M. circinata*.

La fracción F8 (215.7 mg) fue sometida a una CCA con un gradiente 20:80→0:100; 100:0→70:30, utilizando hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH como disolventes de elución. De este fraccionamiento se obtuvieron 10 fracciones (F8<sub>I</sub>-F8<sub>X</sub>). La fracción secundaria F8<sub>VI</sub> (51.7 mg) fue posteriormente fraccionada mediante CCA utilizando Sephadex LH-20 y como fase móvil una mezcla de acetona-MeOH (3:7); de este fraccionamiento de obtuvieron seis fracciones (F8<sub>VI-A</sub>-F8<sub>VI-F</sub>). La fracción F8<sub>VI-A</sub> (17.2 mg) se sometió a un

fraccionamiento mediante CCF de tipo preparativa utilizando como mezcla de elución  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt-AcOH (50:50:0.1). De este proceso se obtuvieron dos fracciones: F8<sub>VI-A- $\alpha$</sub>  (1.7 mg) y F8<sub>VI-A- $\beta$</sub>  (2.1 mg); estas fracciones se purificaron mediante una CCA utilizando Sephadex LH-20 y como fase móvil una mezcla de acetona-MeOH (1:1), de las cuales se obtuvieron 0.5 mg del compuesto **128** y 1.6 mg del compuesto **131**, respectivamente. Posteriormente, las fracciones F8<sub>VI-C</sub> (7.1 mg) y F8<sub>VI-E</sub> (5.9 mg) fueron purificadas vía CCF de tipo preparativa utilizando una mezcla de elución compuesta por  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (98:2) y  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-ácido fórmico (97:3:0.1), respectivamente. De estas fracciones se obtuvieron 0.8 mg del compuesto **127** y 1.6 mg del compuesto **125**, respectivamente.

Finalmente, la fracción F9 (72.3 mg) fue purificada mediante CLAE-FR utilizando una mezcla de MeCN (**A**)-H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1% ácido fórmico) con un gradiente de elución de 70 % a 100 % de **A** en 12 min, a un flujo de 21.24 mL/min. De la fracción F9, se obtuvieron 1.2 mg del compuesto **120** ( $t_R = 5.2$  min) y 3.4 mg del compuesto **122** ( $t_R = 6.8$  min).

#### **4.6. Hidrolisis ácida del compuesto 122**

Dos mg del compuesto **122** en 1 mL de agua desionizada y se trataron con 1 mL de HCl (1 M) en condiciones de reflujo durante 1 h. Pasadas las 3 h, la mezcla de reacción se trató con 2 mL de agua y se realizó un reparto con AcOEt (2 x 4 mL). La fase acuosa se concentró a presión reducida a sequedad, El sólido,  $\alpha$ -D-ribofuranosido ( $[\alpha]_{20}^D = -10$ ; c 0.09, H<sub>2</sub>O), se identificó con una muestra de referencia utilizando CCF y el valor de rotación óptica.

#### **4.7. Ensayos biológicos**

##### **4.7.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae***

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos, fracciones y compuestos puros se utilizó la  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* ( $\alpha$ GHY; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA); esta enzima se utilizó a una concentración de 0.4 U/mL en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 100 mM, pH 7).

Las muestras a evaluar se disolvieron en MeOH o en solución amortiguadora de fosfatos a concentraciones de 10000 µg/mL para extractos y/o fracciones y 30 mM para compuestos puros. Como control positivo, se utilizó acarbosa (30 mM) disuelta en solución amortiguadora de fosfatos. Como sustrato se utilizó *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-glucopiránosido (*p*-NPG) disuelto en solución amortiguadora de fosfatos a una concentración de 5 mM. Todas las evaluaciones se realizaron en placas de Elisa de 96 pozos. Las absorbancias se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro BioRad® modelo iMark (Hercules, CA, EUA) a una longitud de onda de 415 nm utilizando el software Microplate Manager® 6 (versión 6.3, BioRad®, Hercules, CA, EUA). Las muestras se evaluaron por triplicado utilizando alícuotas de 0-10 µL de los inhibidores de prueba (extractos, fracciones o compuestos), 20 µL de la solución de enzima y el volumen necesario de solución amortiguadora para obtener un volumen de 90 µL; posteriormente se incubaron durante 10 min a 37 °C. Una vez transcurridos los 10 min se adicionó a cada pozo 10 µL de sustrato (*p*-NPG) e inmediatamente después se registraron las absorbancias a tiempo cero ( $T_i$ ) y se incubó por segunda vez a 37 °C durante 20 min. Al concluir el periodo de incubación se registró la absorbancia al tiempo final ( $T_f$ ). La actividad de los compuestos se determinó como porcentaje de inhibición al comparar los valores de absorbancia de las muestras con el blanco (PBS), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \alpha GHY = \left( 1 - \frac{A_{415c}}{A_{415b}} \right) \times 100$$

Donde  $\% \alpha GHY$  es el porcentaje de inhibición,  $A_{415c}$  es el valor absorbancia (corregida) de los extractos, fracciones o compuestos evaluados ( $A_{415-Tf} - A_{415-Ti}$ ), y  $A_{415b}$  es la absorbancia del blanco ( $A_{415-Tf \text{ blanco}} - A_{415-Ti \text{ blanco}}$ ). El valor de la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

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

Donde  $A_{100}$  es el porcentaje máximo de inhibición,  $I$  es la concentración del inhibidor,  $CI_{50}$  es la concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50 % y  $s$  es el grado de cooperatividad. El cálculo se llevó a cabo en el software OriginPro® 8 (Versión 8.0724, Northampton, MA, EUA).



## **4.7.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B**

### **4.7.2.1. Expresión y purificación de la enzima hPTP-1B**

La enzima recombinante hPTP-1B fue expresada a partir del gen PTPN1 (proteína tirosina fosfatasa no-receptor tipo 1 de *Homo sapiens*, gene ID: 5770). El gen fue optimizado para la sobreexpresión en *E. coli* y fue subclonado en el vector pET28 para obtener el sistema pET28-PTPN1 de GenScript (Piscataway, NJ, EUA). El sistema de sobreexpresión fue transformado en células de *E. coli* BL21 (DE3) con resistencia a kanamicina y se indujo la expresión con 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 8 h. Posteriormente, se purificó la enzima utilizando cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en una columna HisTrap<sup>®</sup> Excel (GE Health Care, Chicago, IL, EUA), obteniendo aproximadamente 90 mg de enzima por litro con una pureza del 98 % (Puius et al., 1997). Esta actividad la realizó el Dr. Martín González Andrade de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### **4.7.2.2. Ensayo de inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B**

Los extractos, fracciones y compuestos puros se disolvieron en MeOH, DMSO o en una solución amortiguadora de Tris (Tris, 20 mM, pH 6.7). Como control positivo se utilizó ácido ursólico disuelto en una mezcla de DMSO y Tris (1:1) a una concentración de 1 mM. Se utilizó *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP; 5 mM) disuelto en Tris como sustrato. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos y se realizaron por triplicado. Las lecturas se llevaron a cabo a 415 nm en un espectrofotómetro BioRad<sup>®</sup> modelo iMark utilizando el software Microplate Manager<sup>®</sup> 6. Se colocaron en los pozos de cada placa alícuotas de 0-10  $\mu$ L de los inhibidores potenciales, 20  $\mu$ L de la solución de trabajo de la enzima en Tris (22 nM) y el volumen necesario de solución amortiguadora para obtener un volumen de 90  $\mu$ L y se incubó durante 5 min a 25 °C. Posteriormente se agregaron 10  $\mu$ L de *p*-NPP por pozo, acto seguido, se procedió a medir la absorbancia al tiempo cero ( $T_i$ ) y se incubó por 15 min a 25 °C. Trascurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a tiempo final ( $t_f$ ).

La actividad de los compuestos se determinó como porcentaje de inhibición al comparar los valores de absorbancia de las muestras con el blanco (Tris), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%PTP1B = \left(1 - \frac{A_{415c}}{A_{415b}}\right) \times 100$$

Donde  $\%PTP1B$  es el porcentaje de inhibición,  $A_{415c}$  es el valor absorbancia (corregida) de los extractos, fracciones o compuestos evaluados ( $A_{415-Tf} - A_{415-Ti}$ ), y  $A_{415b}$  es la absorbancia del blanco ( $A_{415-Tf \text{ blanco}} - A_{415-Ti \text{ blanco}}$ ). El valor de la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

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

Donde  $A_{100}$  es el porcentaje máximo de inhibición,  $I$  es la concentración del inhibidor,  $CI_{50}$  es la concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50 % y  $s$  es el grado de cooperatividad. El cálculo se llevó a cabo en el software OriginPro® 8 (Versión 8.0724, Northampton, MA, EUA).

#### **4.8. Prueba de tolerancia oral a la sacarosa para la malbranqueamida**

Ratones de la cepa ICR de 3-4 semanas de edad (25-30 g), fueron adquiridos Envigo-UNAM. Los ratones se albergaron en una habitación apropiada con ciclos de luz-oscuridad de 12 /12, en condiciones de temperatura y humedad controladas con acceso libre a la dieta estándar de roedores de laboratorio (Teklad 2018S, Envigo) y agua *ad libitum* hasta el comienzo de cada experimento. Los ratones fueron tratados de acuerdo a la Guía Internacional de Ética para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se siguieron las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El comité de estudios animales de la Facultad de Química aprobó el protocolo experimental utilizado (FQ/CICUAL/292/18).

Después de cuatro horas de ayuno, los ratones fueron divididos en cuatro grupos (I-IV) de seis animales cada uno. Los animales del grupo I fueron administrados con el vehículo (solución salina con 0.05% de tween 80) y el grupo II con el control positivo de acarbosa (5 mg/kg). Los grupos III y IV fueron tratados oralmente con malbranqueamida a las dosis de 3.1 y 10 mg/kg, respectivamente. 30 minutos después, se le administró una carga oral de sacarosa (3 g/kg) a cada animal. Los niveles de glucemia fueron determinados a los 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de la sacarosa. El porcentaje de variación de glucemia fue determinado de acuerdo a los niveles basales, según la ecuación:

$$\% \text{ variación de glucemia} = \left[ \frac{(G_t - G_i)}{G_i} \right] \times 100$$

Donde  $G_i$  es la glucemia basal y  $G_t$  son los diferentes valores de glucemia después de la administración del tratamiento (Verastegui et al., 2017, Lozano-González et al., 2019).

#### 4.9. Cálculos computacionales

Las estructuras de las moléculas que presentaron mayor actividad biológica (**72**, **89** y **120-122** frente a la  $\alpha$ GHY; **72**, **89**, **120**, **126** y **127** frente a la PTP-1B) fueron construidas y minimizadas utilizando el programa Spartan'10 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, EUA). La búsqueda conformacional se llevó a cabo utilizando un protocolo Monte Carlo con el campo de fuerza molecular de Merck (MMFF94, por sus siglas en inglés Merck Molecular Force Field 94). Las estructuras de mínima energía obtenidas se revisaron cuidadosamente para eliminar a los duplicados (Morris et al., 2009). Posteriormente, utilizando la interfaz GaussView 5.0 y el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA), los confórmeros obtenidos se optimizaron geoméricamente empleando el nivel de teoría M06-2X/6-31+G(d,p). El cálculo de los desplazamientos químicos se llevó a cabo utilizando el método GIAO (Gauge-Independent Atomic Orbital) y el modelo de solvatación IEFPCM (Polarizable Continuum Model Integral Equation Formalism Variant), utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés Density Functional Theory) con el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p) (Willoughby et al., 2014).

Para el cálculo del dichroísmo circular electrónico (DCE), se utilizó un método DFT tiempo-dependiente (TD-DFT) utilizando B3LYP/6-31+G(d) como nivel de teoría y CPCM (Conductor-Like Continuum Solvent Model) como modelo de solvatación.

Todos los cálculos se llevaron a cabo en el clúster de supercómputo Miztli de la UNAM, ubicada en la Dirección de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) y pertenece al Laboratorio Nacional de Cómputo de Alto Desempeño (LANCAD). Está conformado por 332 nodos de cómputo HP Proliant SL230 y SL250, cuenta con 8440 núcleos de procesamiento Intel, 16 tarjetas NVIDIA, una memoria total de 47 TB, un sistema de almacenamiento masivo de 750 TB y sistema operativo LINUX RedHat con rendimiento teórico de 232 TFlop/s.

#### **4.10. Estudios de acoplamiento molecular**

Las estructuras de mínima energía de los compuestos para los estudios de acoplamiento molecular (docking) fueron preparadas utilizando el programa AutoDock Tools package v1.5.4 (ADT, <http://mglttools.scripps.edu/>) (Morris et al., 2009).

Para los metabolitos se agregaron cargas de Gasteiger, se determinaron los tipos de átomos, el número de enlaces de giro libre y se eliminaron los hidrógenos no polares. Las estructuras de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* y la PTP-1B humana fueron obtenidas del "Protein Data Bank" con los códigos 3A4A y 1SUG, respectivamente. Adicionalmente, se utilizaron las estructuras de las  $\alpha$ -glucosidasas humanas con los códigos 3LPP, 2QMJ y 3TOP. Para los receptores se mantuvo rígida la proteína, se agregaron los hidrógenos polares y las cargas de Kollman, se eliminaron las moléculas de agua y los parámetros de solvatación fueron los predeterminados. Los estudios de acoplamiento molecular se llevaron a cabo utilizando AutoDock v1.1.2.15. Primero se realizó un estudio de acoplamiento ciego para establecer el sitio probable de interacción de los metabolitos con las enzimas de estudio. El espacio de búsqueda para este estudio preliminar, se definió con un tamaño de caja de  $110 \times 110 \times 110 \text{ \AA}$  en las dimensiones x, y y z, centrada en la macromolécula y con un espaciado de cuadrícula de  $0.375 \text{ \AA}$ .

El estudio se llevó a cabo utilizando los parámetros preestablecidos en el programa, aumentando el número de corridas y utilizando un algoritmo genético Lamarckiano.

Posteriormente, se realizó un afinamiento al utilizar un tamaño de caja menor ( $50 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ ) y un espaciado de cuadrícula de  $0.375 \text{ \AA}$ ), centrada en la posición de menor energía del ligando, obtenida del estudio de acoplamiento molecular ciego realizado previamente.

El análisis de las conformaciones obtenidas de la simulación de acoplamiento molecular se llevó a cabo en el programa AutoDock Tools. Se validaron los resultados obtenidos mediante el cálculo del RMSD (*Root Mean Square Deviation*, por sus siglas en inglés) entre las moléculas cocrystalizadas en el sitio catalítico de las  $\alpha$ -glucosidasas y la PTP-1B, respectivamente, con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular para dichas moléculas. Un valor  $< 2 \text{ \AA}$  indica que nuestro modelo propuesto es acertado.

Se analizaron las interacciones de los complejos ligando-macromolécula de menor energía. Las representaciones en 2D y 3D de los sitios predichos de unión, se llevaron a cabo utilizando los programas Maestro (Schrödinger, New York, NY, EUA) y PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System v1.7.4, Schrödinger, New York, NY, USA) (Seeliger et al., 2010).

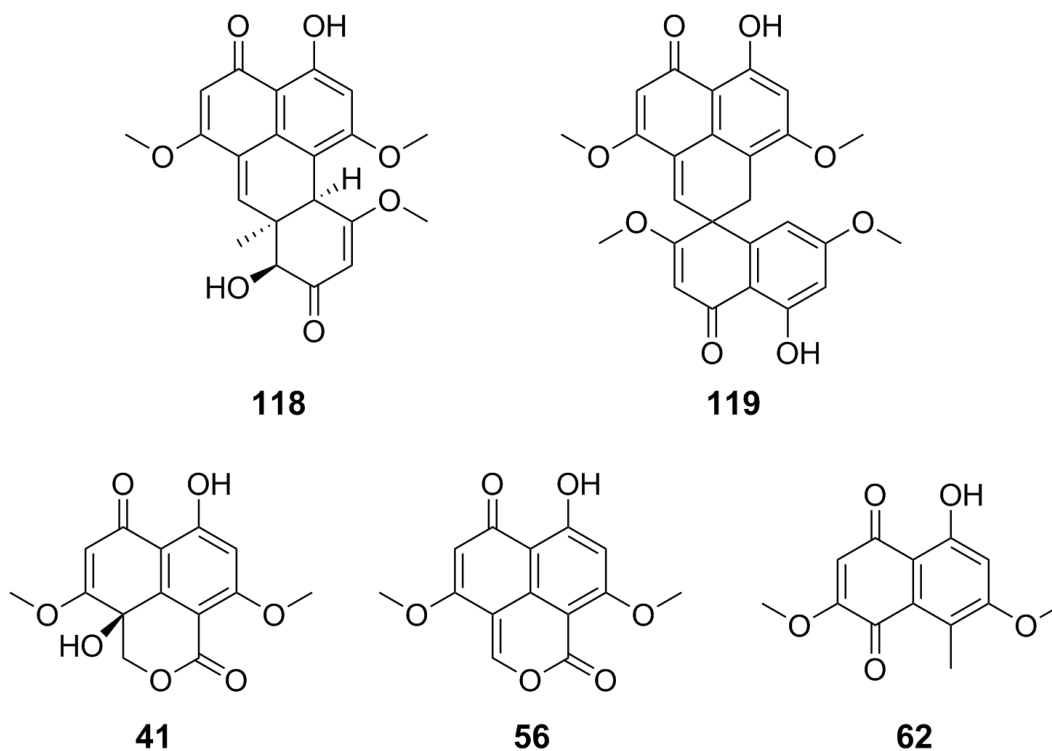
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de metabolitos novedosos inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y PTP-1B a partir de fuentes naturales. En este caso las especies seleccionadas fueron los ascomicetos *Preussia minimoides* y *Malbranchea circinata*. En la primera parte de esta sección se abordará lo concerniente al estudio de *P. minimoides* y en la segunda parte se discutirán los resultados sobre el estudio de la especie *M. circinata*.

### 5.1. Estudio químico de la especie *Preussia minimoides*

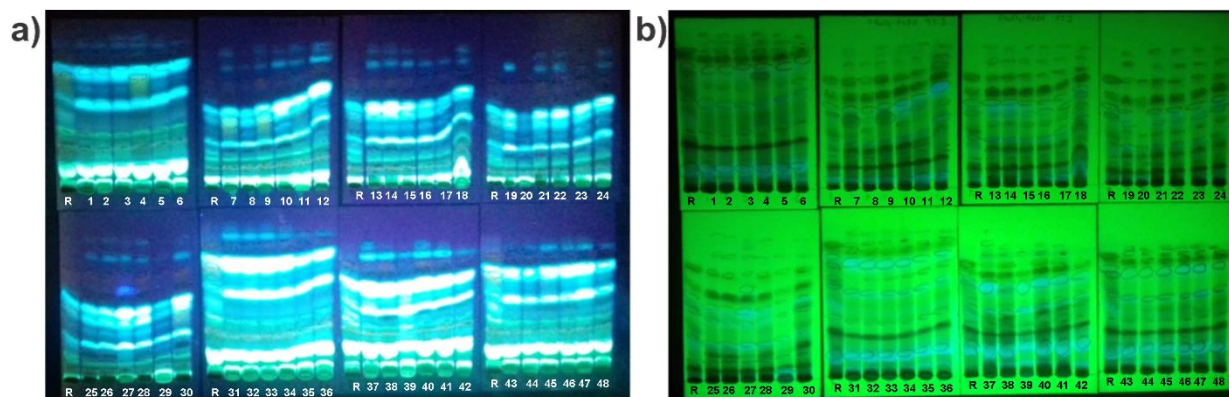
La fracción MeCN-MeOH, producto del proceso de desgrase del extracto orgánico de la especie *P. minimoides*, inhibió la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con una  $CI_{50} = 38.0 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$ . Este resultado sugirió la presencia de metabolitos inhibidores de dicha enzima en esta fracción; su fraccionamiento exhaustivo permitió aislar una benzo[de]antracendiona y una espiro[naftalenfenalen]diona, las cuales se designaron con los nombres triviales de minimoidionas A y B (**118** y **119**), respectivamente. Adicionalmente, se aislaron los compuestos conocidos como preusocromona C (**41**), corimbiferona (**56**) y 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**62**). Las estructuras de estos compuestos se indican en la **Figura 18**. La caracterización estructural del producto **119** que se aisló en primer lugar se describió con anterioridad (Rangel-Grimaldo, 2017).

Recientemente, se han desarrollado varias estrategias para activar la expresión de genes silenciados y así, aumentar la diversidad de metabolitos producidos por un organismo (Li, et al., 2016; Fang et al., 2014). Así, con el propósito de obtener cepas activadas de la especie *P. minimoides* mediante la exposición de las esporas al DES, se realizaron una serie de experimentos que permitieron obtener 48 colonias morfológicamente distintas a la cepa original, las cuales se sembraron en cajas de Petri con PDA. Cada una de estas se cultivó en medio sólido y posteriormente se elaboraron los extractos desgrasados utilizando el procedimiento experimental antes descrito para la cepa original.



**Figura 18.** Estructuras de los compuestos aislados de *P. minimoides*.

Los extractos resultantes se analizaron por cromatografía en capa fina, para observar si existía alguna diferencia entre las cepas tratadas con DES y la cepa de referencia (**Figura 19**). Al analizar las placas de CCF, se observó que los extractos obtenidos de las cepas 4, 7 y 9 poseían diferencias con los demás extractos, por lo que se decidió cultivar en mediana escala esas cepas siguiendo el procedimiento de cultivo y obtención del extracto orgánico descrito para la cepa original.



**Figura 19.** Placas de CCF para los extractos obtenidos de las cepas tratadas con DES observadas a 254 nm (**a**), 364 nm (**b**).

Los tres extractos resultantes mostraron un gran similitud cromatográfica, por lo que se combinaron y se designaron con la clave M479ME; su fraccionamiento posterior vía cromatografía flash generó 16 fracciones, mismas que se analizaron por CLAE-FR; mediante la técnica de coelución y el análisis de los máximos de absorción observados al UV, se detectaron la minimoidiona A (**118**), la minimoidiona B (**119**) y la corimbiferona (**56**). Estos productos se separaron de las fracciones donde fueron detectados. Cabe resaltar que la cantidad de minimoidiona B (**119**) obtenida aumentó 3 veces (**Cuadro 14**), lo cual permitió su evaluación enzimática. De manera adicional, se observaron picos en los cromatogramas de las diversas fracciones que no corresponden a ninguno de los metabolitos previamente reportados por lo queda como perspectiva su aislamiento.

**Cuadro 14.** Minimoidiona B obtenida de la cepa original y las tratadas con DES.

Cepa	Fracción MeCN-MeOH (g)	mg de <b>115</b> obtenidos	Rendimiento
Original	5.4	11.6	0.22 %
M479ME	2.9	15.7	0.65 %

Se evaluó la actividad inhibitoria de las 16 fracciones obtenidas frente a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (**Tabla 1**), encontrándose actividad significativa en las fracciones donde se detectó la minimoidiona B (**119**) (F4–F6). Otras fracciones obtenidas del fraccionamiento anterior (F2, F3, F8–F10 y F12), en las cuales se observaron metabolitos que no han sido aislados previamente, también mostraron actividad inhibitoria significativa en las evaluaciones (< 40 ppm).

La información obtenida de las evaluaciones con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura, así como el análisis por CLAE-FR facilitará la purificación de las moléculas responsables de la actividad.



**Tabla 1.** Actividad inhibitoria de la fracción MeCN-MeOH y fracciones de *P. minimoides* M479ME.

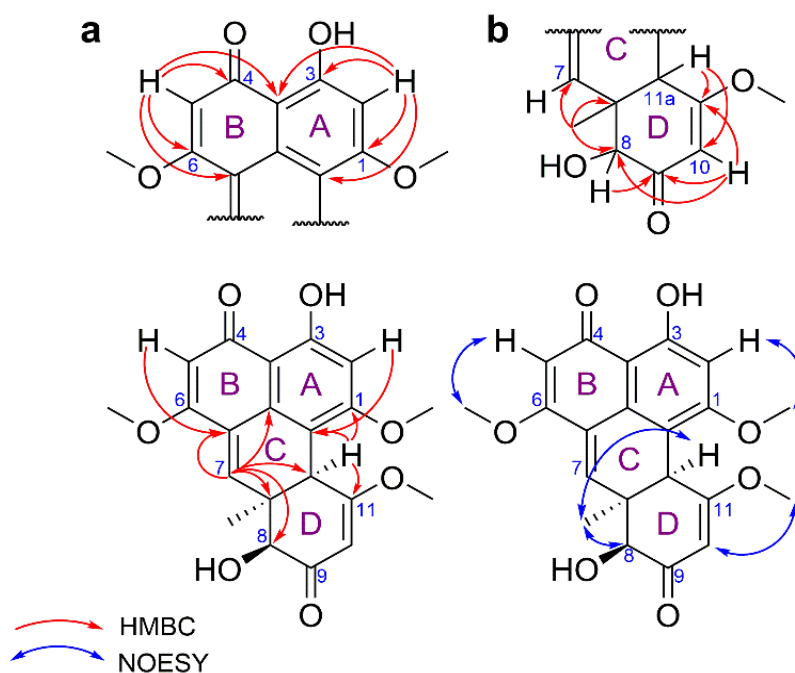
Fracción Flash	Fracción	Masa (mg)	$\alpha$ -glucosidasa <i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
			% inhibición							
			1000 <sup>a</sup> ppm	200 <sup>a</sup> ppm	500 <sup>b</sup> ppm	100 <sup>b</sup> ppm	200 <sup>c</sup> ppm	40 <sup>c</sup> ppm	40 <sup>d</sup> ppm	8 <sup>d</sup> ppm
Exto M479ME		305.5	84.3	88.8						
1-28	F1	7.4	78.7	53.5						
29-33	F2	24.7	80.5*	90.9			95.8	78.4		
34-58	F3	1217.4	66.9*	92.0			92.8	89.9		
59-62	F4	226.1	54.1*	89.0			91.5	90.7		
63-67	F5	154.9	56.2*	82.9			78.9	77.4		
68-74	F6	44.3	83.1	85.6			91.7	86.0		
75-81	F7	9.9	61.4	20.3						
82-92	F8	39.5	77.6*	91.3			94.3	84.5		
93-112	F9	22.6	121.7*	94.6			79.3*	86.9	88.6	32.2
113-122	F10	140.0	69.8*	86.2			96.3	73.6		
123-130	F11	259.1	76.5	56.3						
131-134	F12	55.0	88.6*	91.1			84.5	61.6		
135-145	F13	62.9	60.4	48.7						
146-185	F14	93.2			61.2	33.8				
186-200	F15	29.5	41.4	14.1						
201-Fin	F16	208.0	39.9	16.6						

Stock<sup>a</sup>, dilución 1:2<sup>b</sup>, dilución 1:5<sup>c</sup> y dilución 1:25<sup>d</sup>.

### 5.1.1. Caracterización estructural de la minimoidiona A (118)

La minimoidiona A (**118**) se aisló bajo la forma de cristales amarillos. Su fórmula molecular se estableció como C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> mediante el análisis de los datos de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y de espectrometría de masas de alta resolución por ionización por electrospray (HRESIMS por sus siglas en inglés). En el espectro de masas el ion pseudomolecular [(M+H)<sup>+</sup>] se observó en una relación masa/carga (*m/z*) de 385.1270; la fórmula molecular establecida permite un índice de deficiencia de hidrogeno (IDH) de 12. El análisis del espectro RMN <sup>13</sup>C (**Figura 24**) indicó la presencia de 21 átomos de carbono de los cuales, tres corresponden a grupos metoxilo, uno a un metilo, seis a metinos (cuatro de ellos en la región aromática-vinílica y dos de tipo alifático) y once a carbonos no protonados (dos cetonas  $\alpha,\beta$  insaturadas en  $\delta_c$  190.4 y 196.6, ocho aromáticos u olefínicos y uno alifático); también se detectó en el espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 23**) la presencia en la molécula de dos grupos hidroxilos, uno de ellos quelatado, y las

señales de los protones de los carbonos protonados evidenciados en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Tabla 2**). Mediante el análisis de los espectros bidimensionales se propusieron dos subestructuras parciales para el compuesto **118** (*a* y *b*; **Figura 20**). Los anillos A y B de la subestructura *a* fueron asignados considerando las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre H-2 y C-1/C-3/C-3a, y entre H-5 y C-3a/C-4/C-6/C-6a; de manera adicional, el protón del grupo hidroxilo fenólico quelatado en  $\delta_{\text{H}}$  13.21 correlacionó con el carbonilo de la cetona conjugada en  $\delta_{\text{C}}$  190.4 (C-4). Por otro lado, las correlaciones observadas en el espectro NOESY entre H-2 y 1-OCH<sub>3</sub> y entre H-5 y 6-OCH<sub>3</sub> confirmaron la disposición de los sustituyentes en los anillos A y B. Las correlaciones HMBC observadas entre H-10 y C-8/C-9/C-11/C-11a, H-8 y C-7/C-7a/C-9/7a-CH<sub>3</sub> y H-11 y C-10/C-11/C-11b permitieron proponer la subestructura *b* (anillo D, **Figura 20**). Con base en el índice de deficiencia de hidrógeno calculado, estas dos estructuras parciales tienen que estar unidas para formar un anillo adicional (anillo C). Las correlaciones HMBC observadas entre H-11a ( $\delta_{\text{H}}$  4.28) y C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  163.4; anillo A)/ C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  100.4; anillo D)/ C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  175.1; anillo D)/C-11b ( $\delta_{\text{C}}$  108.9; anillo A), y entre H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  6.98; anillo C) y C-6a/C-7a/C-8/C-11a (**Figura 20**), confirmaron el arreglo tetracíclico propuesto para el compuesto **118**.



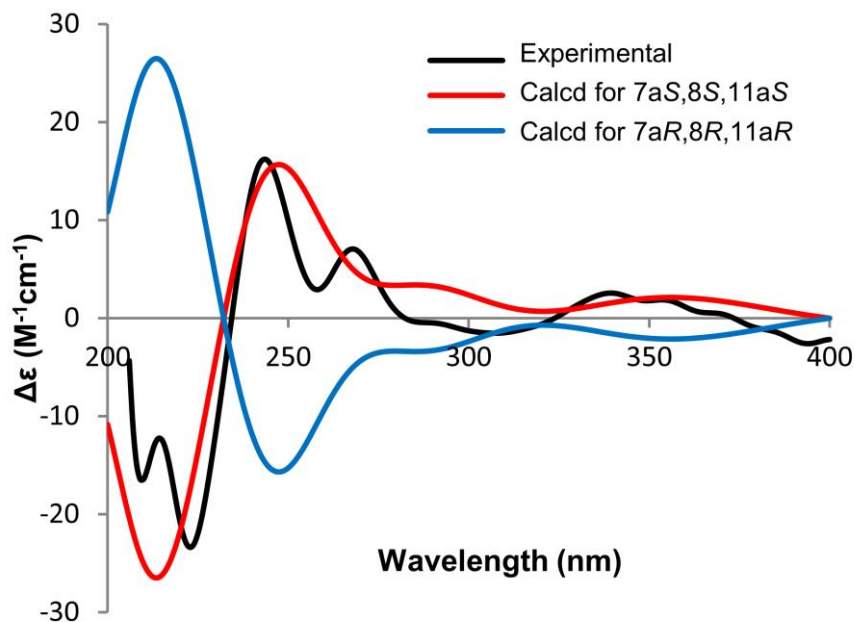
**Figura 20.** Estructuras parciales *a* y *b*; correlaciones selectas de HMBC y NOESY de la minimoidiona A (**118**).

**Tabla 2.** Datos de RMN del compuesto **118**  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) en  $\text{CDCl}_3$ .

posición	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ (J en Hz)	HMBC	NOESY
1	163.4 C			
2	99.2 CH	6.49, s	1, 3, 3a, 11b	1-OCH <sub>3</sub>
3	163.1 C			
3a	106.8 C			
3a <sup>1</sup>	130.5 C			
4	190.4 C			
5	101.4 CH	5.65, s	3a, 4, 6, 6a	6-OCH <sub>3</sub>
6	165.1 C			
6a	125.9 C			
7	138.4 CH	6.98, d (1.5)	3a <sup>1</sup> , 6, 7a, 8, 11a	
7a	44.1 C			
8	76.6 CH	4.25, s	7, 7a, 7a-CH <sub>3</sub> , 9	7a-CH <sub>3</sub>
9	196.6 C			
10	100.4 CH	5.50, d (2.0)	8, 9, 11, 11a	11-OCH <sub>3</sub>
11	175.1 C			
11a	41.4 CH	4.28, t (2.0)	1, 10, 11, 11b	7a-CH <sub>3</sub>
11b	108.9 C			
1-OCH <sub>3</sub>	55.9 CH <sub>3</sub>	3.90, s	1	
6-OCH <sub>3</sub>	55.8 CH <sub>3</sub>	3.80, s	6	
11-OCH <sub>3</sub>	56.8 CH <sub>3</sub>	3.53, s	11	
7a-CH <sub>3</sub>	20.9 CH <sub>3</sub>	1.28, s	7, 7a, 8, 11a	8, 11a
3-OH		13.21, s	2, 3, 3a	
8-OH		5.30, s		

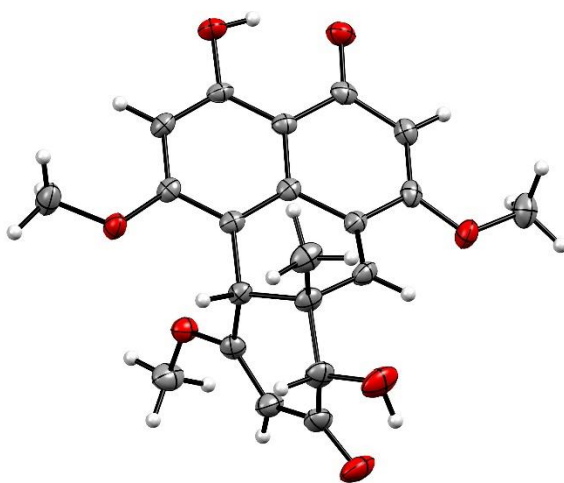
Las interacciones observadas en el espectro de NOESY (**Figura 25**) entre 7a-CH<sub>3</sub>, H-8 y H-11a indicaron que estos protones se encontraban en el mismo plano y por lo tanto poseían la misma orientación relativa, reduciendo las posibles conformaciones a solo dos (7a*S*,8*S*,11a*S* o 7a*R*,8*R*,11a*R*). La configuración absoluta de los centros estereogénicos se dedujo mediante comparación de los espectros de dicroísmo circular electrónico (DCE) experimental y teórico para los dos posibles enantiómeros, los cuales fueron calculados utilizando teoría de funcionales de la densidad tiempo-dependiente (TD-DFT).

El espectro calculado para el enantiómero 7a*S*,8*S*,11a*S* mostró mayor similitud con los datos experimentales (**Figura 21**).



**Figura 21.** Comparación del espectro DCE experimental de la minimoidiona A (negro) con los calculados utilizando B3LYP/6-31+G(d) para los enantiómeros 7a*S*,8*S*,11a*S* (rojo) y 7a*R*,8*R*,11a*R* (azul).

Posteriormente, mediante el análisis por difracción de rayos X del compuesto **118** se confirmó la estructura propuesta y la configuración de los centros estereogénicos presentes en la molécula (**Figura 22**).



**Figura 22.** Representación ORTEP de la estructura del compuesto **118** determinada cristalográficamente.

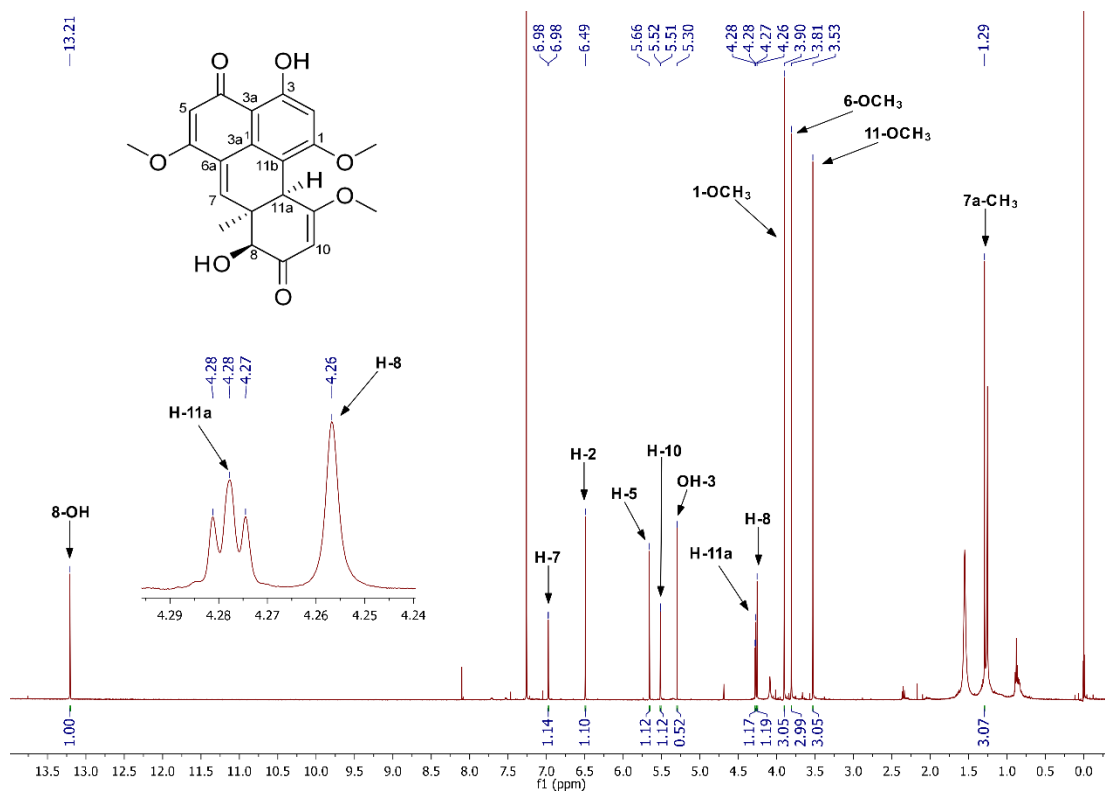


Figura 23. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 118.

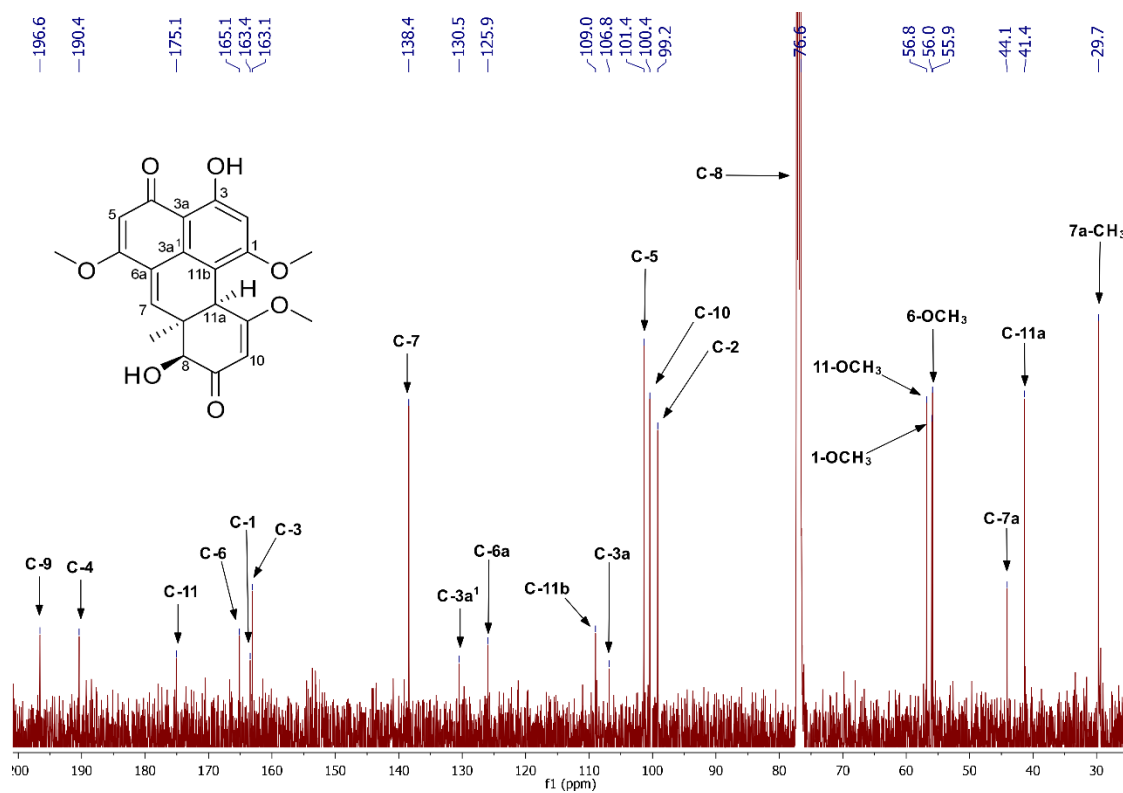
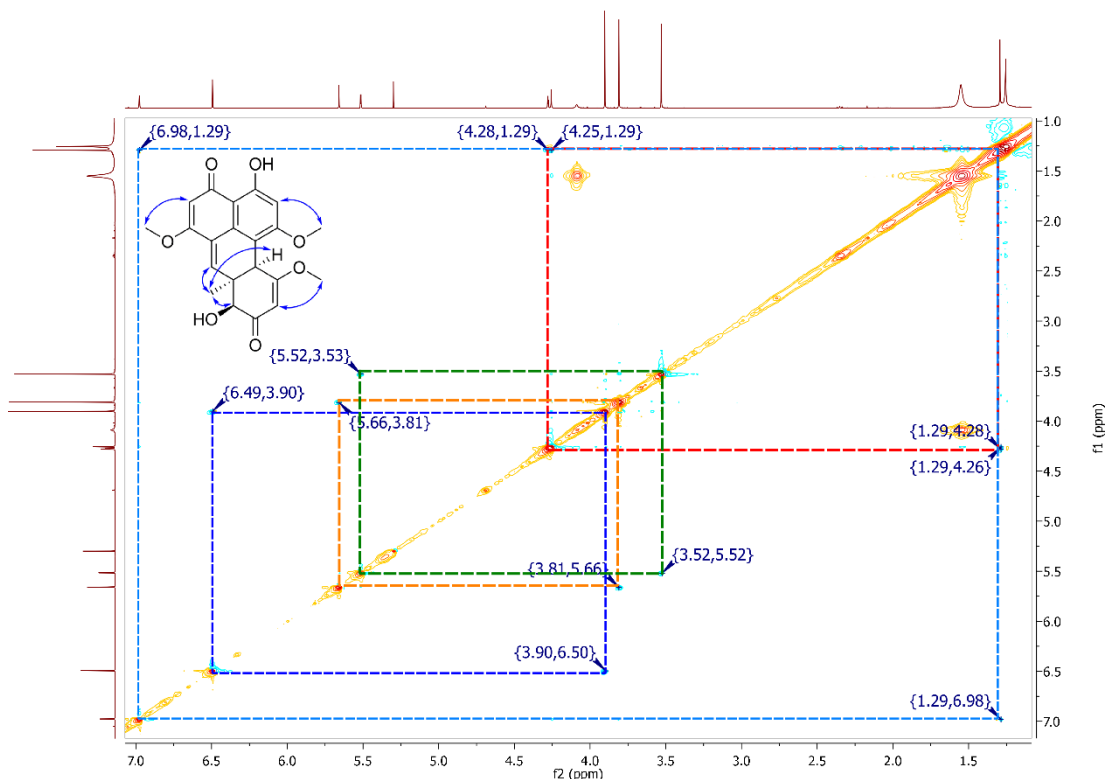


Figura 24. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 118.



**Figura 25.** Espectro NOESY del compuesto **118** mostrando las principales interacciones.

## 5.2. Ensayos biológicos

### 5.2.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura

Se determinó el efecto de la fracción de MeCN-MeOH y de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico. Este método se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-glucopiránosido (*p*-NPG).

Los compuestos **118**, **119**, **41** y **56** fueron evaluados y los resultados se compararon con los obtenidos para la acarbosa (**7**), la cual se usó como control positivo. En la **Tabla 3** se muestran los valores de  $CI_{50}$  calculados.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

Compuesto	Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Minimoidiona A ( <b>118</b> )	95.2 $\pm$ 0.8
Minimoidiona B ( <b>119</b> )	2.9 $\pm$ 0.5
Preusocromona C ( <b>41</b> )	66.5 $\pm$ 0.9
Corimbiferona ( <b>56</b> )	155.5 $\pm$ 4.3
Acarbosa ( <b>7</b> )	585.8 $\pm$ 0.1

Todos los compuestos evaluados mostraron actividad significativa como inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, siendo el compuesto **119** el que presentó mayor actividad con una Cl<sub>50</sub> de 2.9  $\pm$  0.5  $\mu$ M, en comparación con la acarbosa (**7**) que mostró una Cl<sub>50</sub> de 585.1  $\pm$  0.1  $\mu$ M. El efecto inhibitorio de los compuestos sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa es novedoso y sugiere el potencial efecto antihiper glucémico de estos productos.

### 5.2.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la PTP-1B humana

Se determinó el efecto inhibitorio de la fracción MeCN-MeOH y de la minimoidiona B (**119**) sobre la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) mediante un ensayo enzimático, el cual se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP).

La fracción MeCN-MeOH y el compuesto **119** inhibieron esta enzima significativamente al presentar una Cl<sub>50</sub> de 23.7  $\pm$  1.9  $\mu$ g/mL y de 17.1  $\pm$  1.0  $\mu$ M, respectivamente. Los resultados obtenidos se compararon con los observados para el ácido ursólico (Cl<sub>50</sub> 27.8  $\pm$  0.1  $\mu$ M), el cual se usó como control positivo (Ramírez-Espinosa et al., 2011; **Tabla 4**). El compuesto **118** no se evaluó debido a que no se contaba con la cantidad suficiente para realizar la evaluación.

La actividad mostrada por la fracción MeCN-MeOH sugiere la presencia compuestos con posible efecto inhibitorio sobre la PTP-1B humana; por lo que la especie fúngica *P. minimoides* representa una fuente de compuestos bioactivos de interés frente a esta enzima.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima PTP-1B humana.

Compuesto	CI <sub>50</sub> (μM)
Fracción MeCN-MeOH	23.7 ± 1.9
Minimoidiona B ( <b>119</b> )	17.1 ± 1.0
Ácido ursólico	27.8 ± 0.1

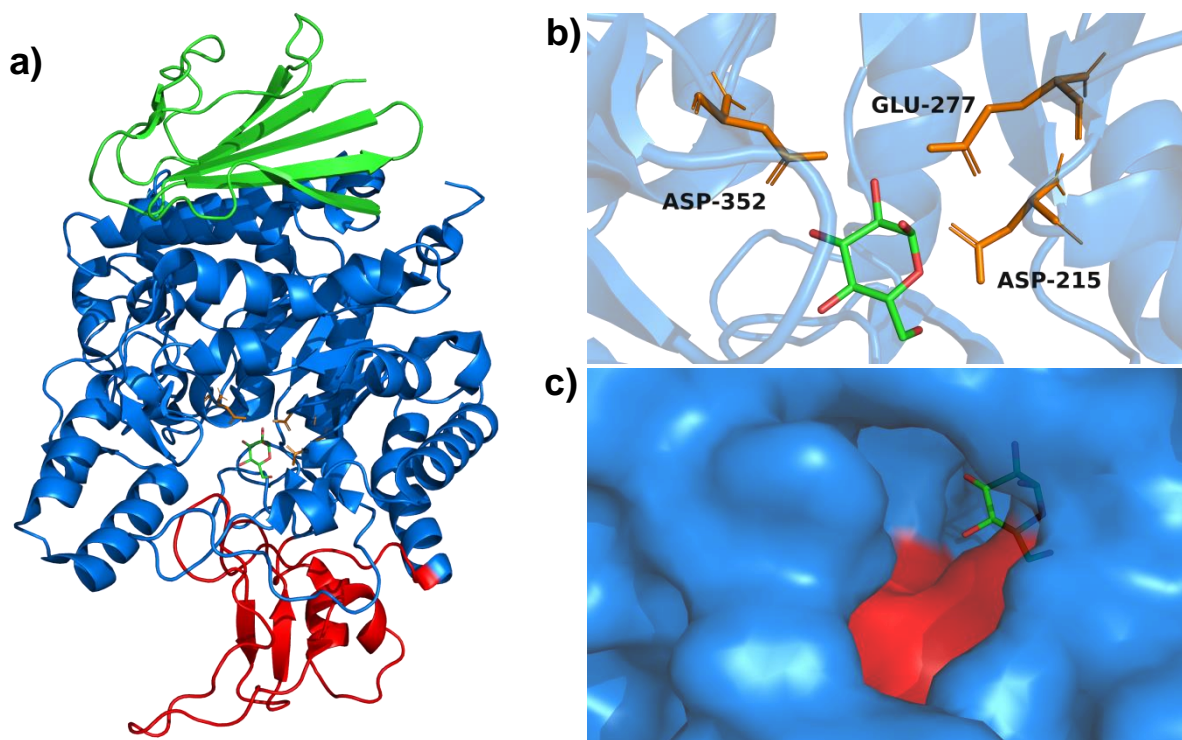
### 5.3. Estudios de Acoplamiento Molecular

#### 5.3.1. Enzima α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Para determinar el posible modo de unión de las minimoidionas A y B (**118** y **119**), se realizaron estudios de acoplamiento molecular, empleando la estructura obtenida por rayos X de la enzima α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB 3A4A) ya que esta fue la enzima utilizada en los ensayos de actividad biológica. La α-glucosidasa de *S. cerevisiae*, presenta actividad de tipo maltasa-isomaltasa y consta de tres dominios llamados A, B y C. El dominio A es el dominio catalítico y está conformado por los residuos 1–113 y 90–512, los cuales, se encuentran formando una estructura de tipo barril (β/α)<sub>8</sub>; este dominio también contiene a los residuos catalíticos Asp215, Glu277 y Asp352. El dominio B está conformado por los residuos 114–189, los cuales forman una estructura rica en asas, una hélice α y una hoja β antiparalela; finalmente, el dominio C por los residuos 513–589, formando cinco hojas β antiparalelas (**Figura 26**). El sitio catalítico se encuentra entre los dominios A y B formando una estructura similar a una hendidura. Otros residuos de importancia son la Tyr158, His280 y el asa 310–315, los cuales se encuentran a la entrada del sitio catalítico y ayudan en la estabilización y reconocimiento de los sustratos (Yamamoto et al., 2010).

Las estructuras de los compuestos **118** y **119-RS** se optimizaron geoméricamente utilizando el programa Spartan'10; posteriormente, se encontraron los posibles sitios de interacción de acuerdo a diferentes factores energéticos, empleando el programa AutoDock Tools. El protocolo utilizado en los estudios de acoplamiento molecular se validó al modelar el modo de unión de la glucosa en el sitio catalítico (RMSD = 0.93 Å).





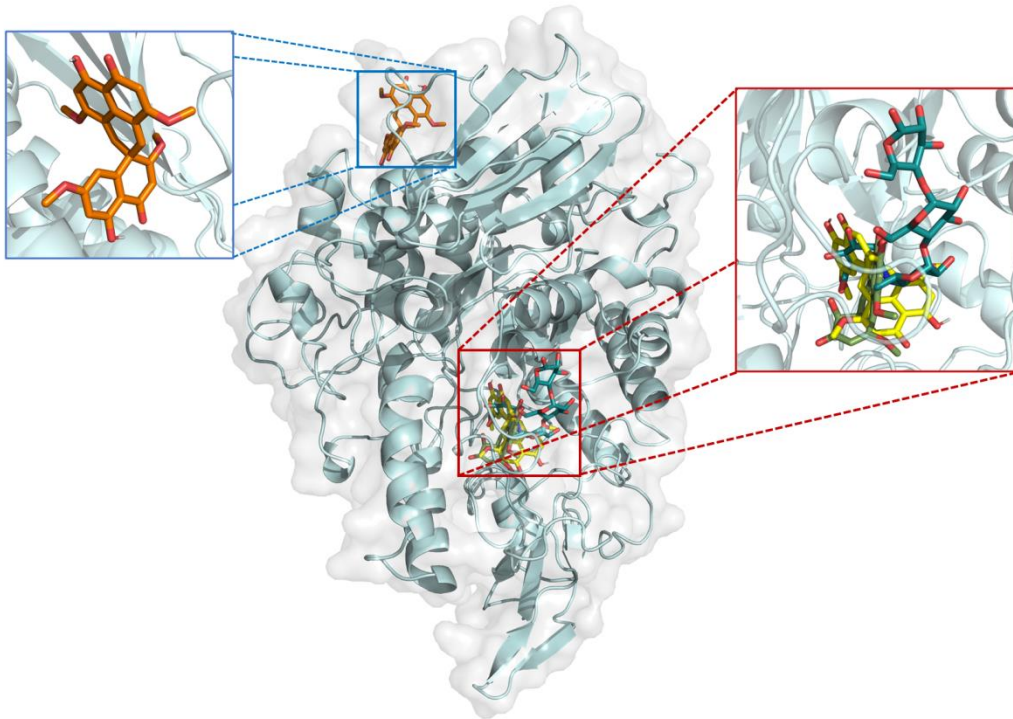
**Figura 26.** a) Vista general de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* (PDB 3A4A), dominio A (azul), dominio B (rojo) y dominio C (verde). b) Vista de los residuos catalíticos en anaranjado y la glucosa en verde. c) Cavidad del sitio catalítico formada por el dominio A (azul) y B (rojo), al fondo en verde se observa la glucosa.

Adicionalmente, se modeló el modo de unión del control positivo, la acarbosa (**Figuras 27–29**). El análisis de la minimoidiona A (**118**) y de los isómeros **R** y **S** de la minimoidiona B (**119**), se realizó utilizando el protocolo validado para los estudios de acoplamiento con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (**Figura 27**). El análisis predijo que el compuesto **119-R** se une en un sitio diferente al catalítico ( $\Delta G = -7.7$  kcal/mol). Las principales interacciones consistieron en un enlace de hidrógeno con Asn493, de tipo pi-cación con Lys568 y diversas interacciones hidrofóbicas y polares (**Figuras 34 y 35**). Por otro lado, los resultados obtenidos para la minimoidiona A (**118**; **Figuras 29 y 30**) y el isómero **S** de la minimoidiona B (**119**; **Figuras 31 y 32**), mostraron que se unen al sitio catalítico de la  $\alpha$ -glucosidasa con energías de unión de -8.5 y -10.4 kcal/mol, respectivamente (**Tabla 5**). El análisis del modo de unión de los compuestos **118** y **119-S** mostró que sus principales interacciones se dan con los residuos Tyr158, His280 y con algunos residuos del asa 310-315, residuos implicados en la entrada de los sustratos al sitio catalítico.

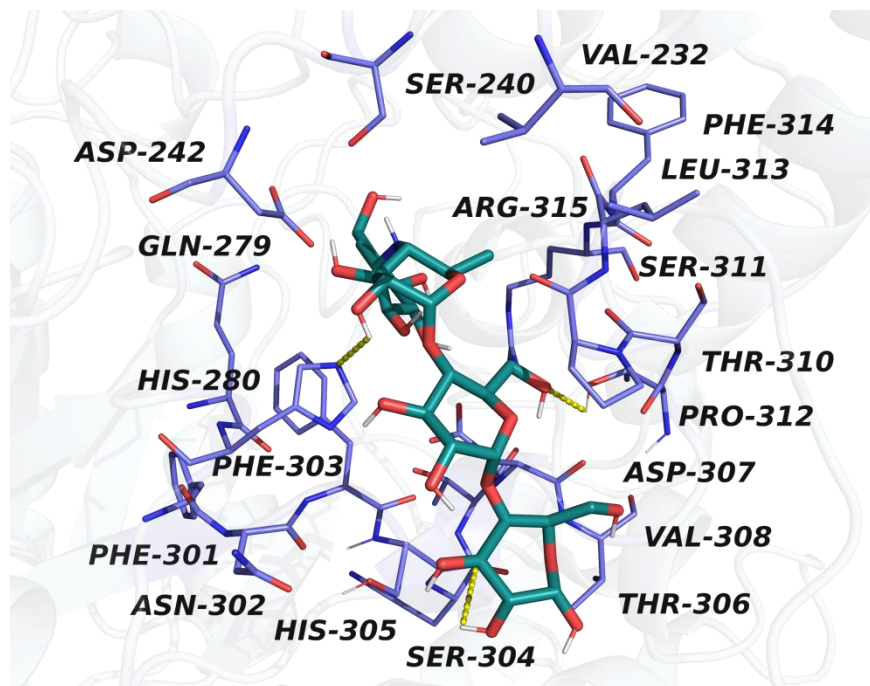
Adicionalmente, el compuesto **119-S**, mostró interacciones con el residuo catalítico Asp352 y el residuo arg442, el cual interviene en la estabilización de los sustratos de la enzima. Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado experimentalmente en las evaluaciones con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura.

**Tabla 5.** Principales interacciones entre los metabolitos aislados y la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura.

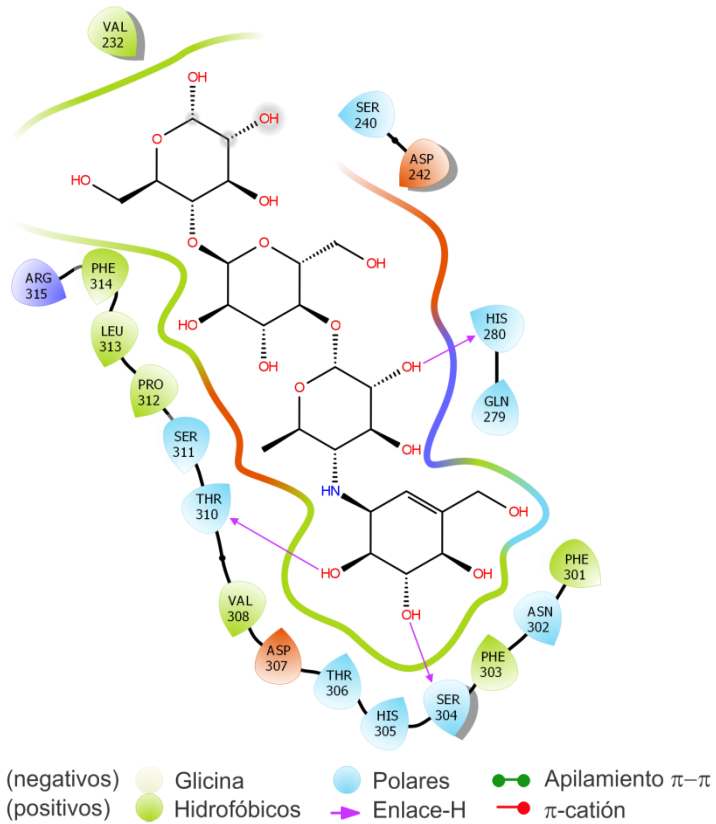
Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación
minimoidiona A (118)	-8.5	Lys156, Asp242, Gln279, His280, Asp307, Arg315, Glu411, Asn415	Tyr158, Phe159, Phe303, Pro312, Leu313, Phe314, Tyr316,	His280, Asn415	
minimoidiona B Isómero-S (119)	-10.4	Ser240, Asp242, Gln279, His280, Thr306, Asp307, Thr310, Arg315, Asp352, Gln353, Glu411, Asn415, Arg442	Tyr158, Phe159, Phe178, Phe303, Phe314, Tyr316,	Ser240, His280, Asp352	
minimoidiona B Isómero-R (119)	-7.7	Lys373, Asn489, Ser490, Asn493, Glu497, Asn565, Lys568, Lys569	Pro488, Phe494, Phe563, Gly564, Tyr566, Pro567,	Lys373	Lys568
Acarbosa (7)	-9.9	Ser240, Asp242, Gln279, His280, Asn302, Ser304, His305, Thr306, Asp307, Thr310, Ser311, Arg315	Val232, Phe301, Phe303, Val308, Pro312, Leu313, Phe314	His280, Ser304, Thr310	



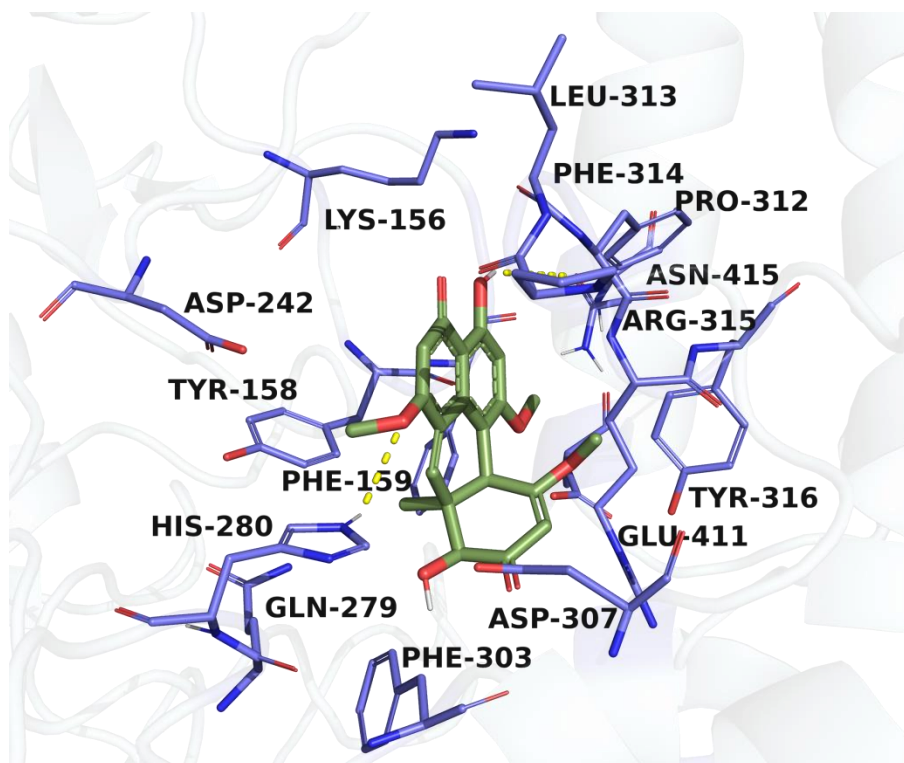
**Figura 27.** Posibles sitios de unión para la acarbosa (verde azulado), minimoidona A (verde), minimoidona B isómero-S (amarillo) en el sitio catalítico (recuadro rojo) y el isómero-R (anaranjado) en un sitio alosterico (recuadro azul) con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (cian, PDB 3A4A).



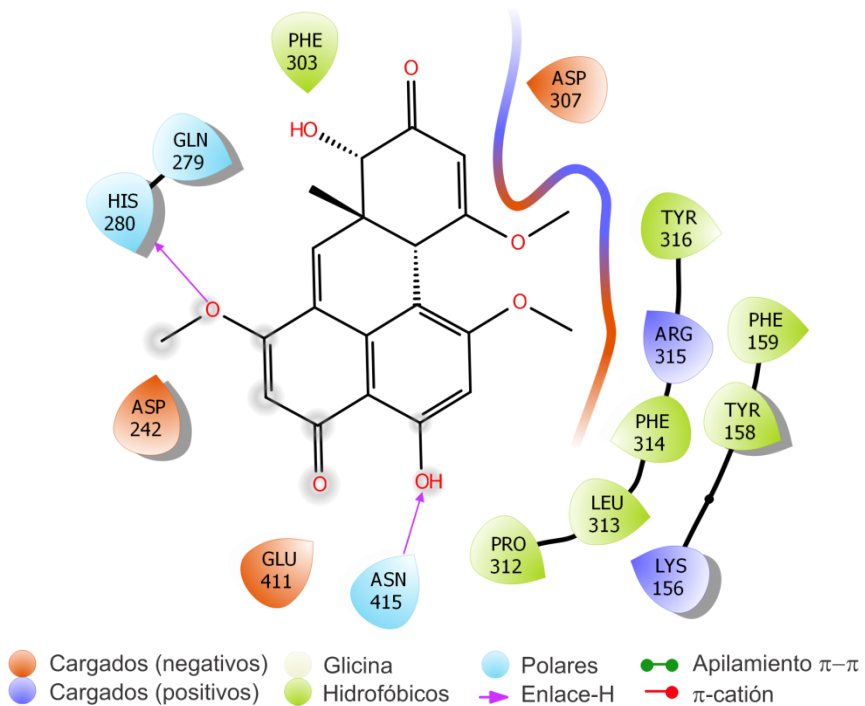
**Figura 28.** Representación en 3D del modo de unión de la acarbosa con la  $\alpha$ GHY.



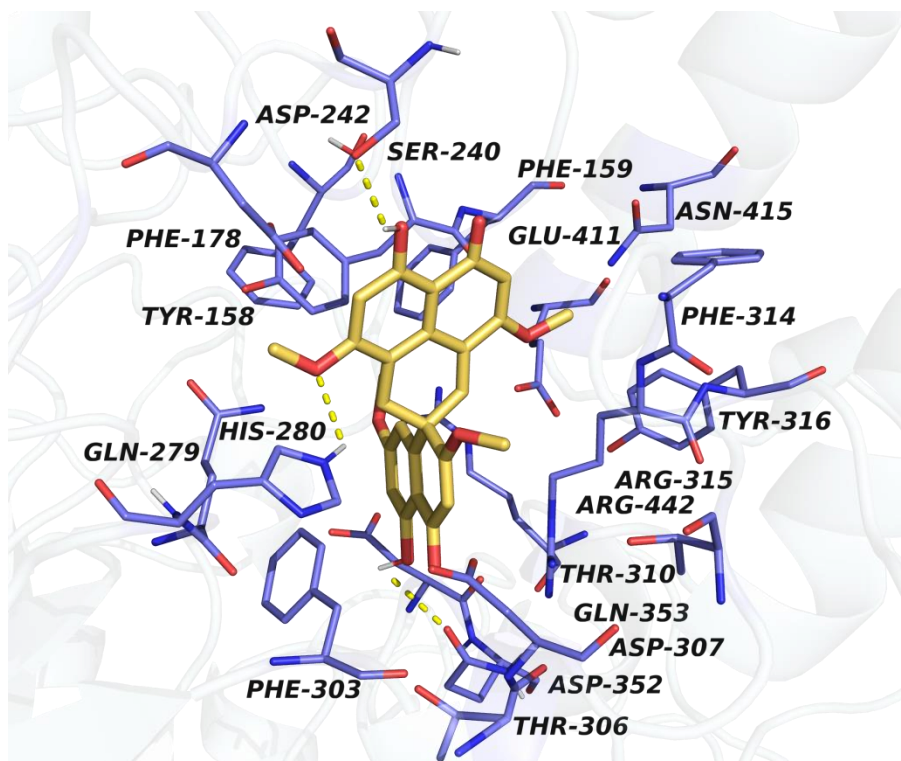
**Figura 29.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con la  $\alpha$ GHY.



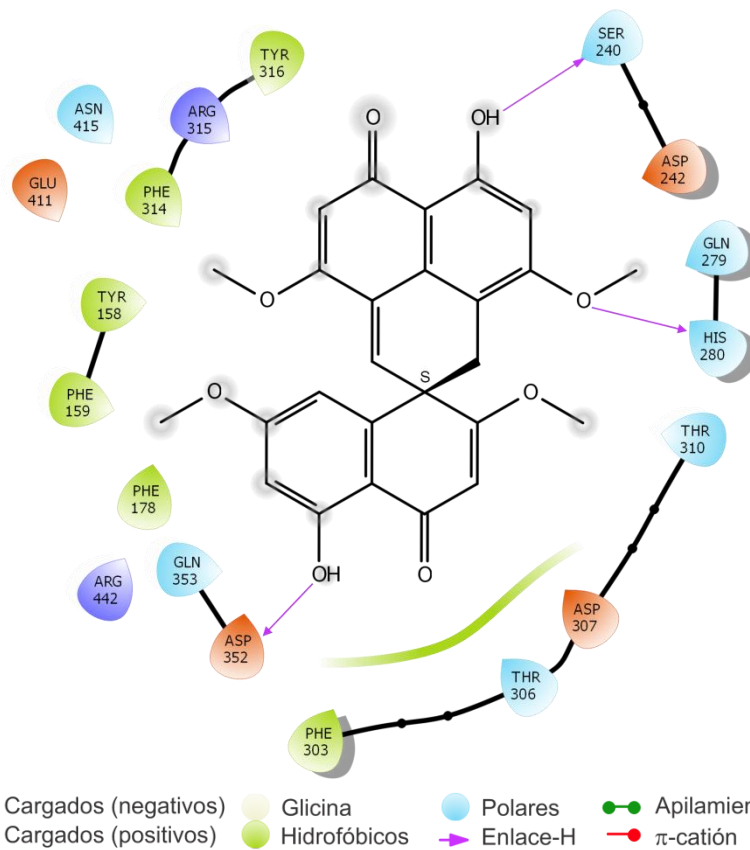
**Figura 30.** Representación en 3D del modo de unión de la minimoidona A con la  $\alpha$ GHY.



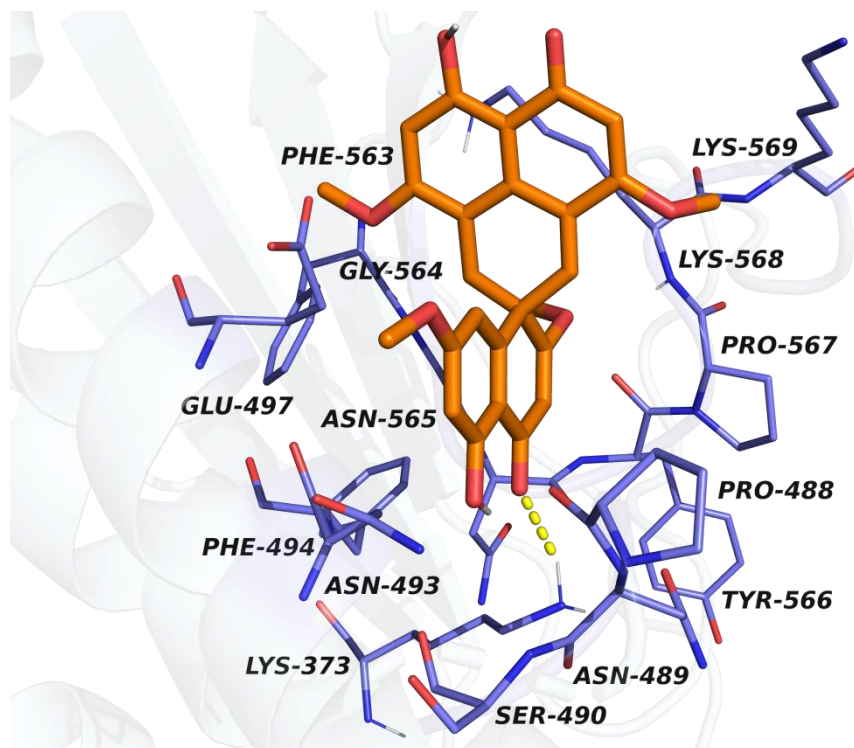
**Figura 31.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidiona A con la  $\alpha$ GHY.



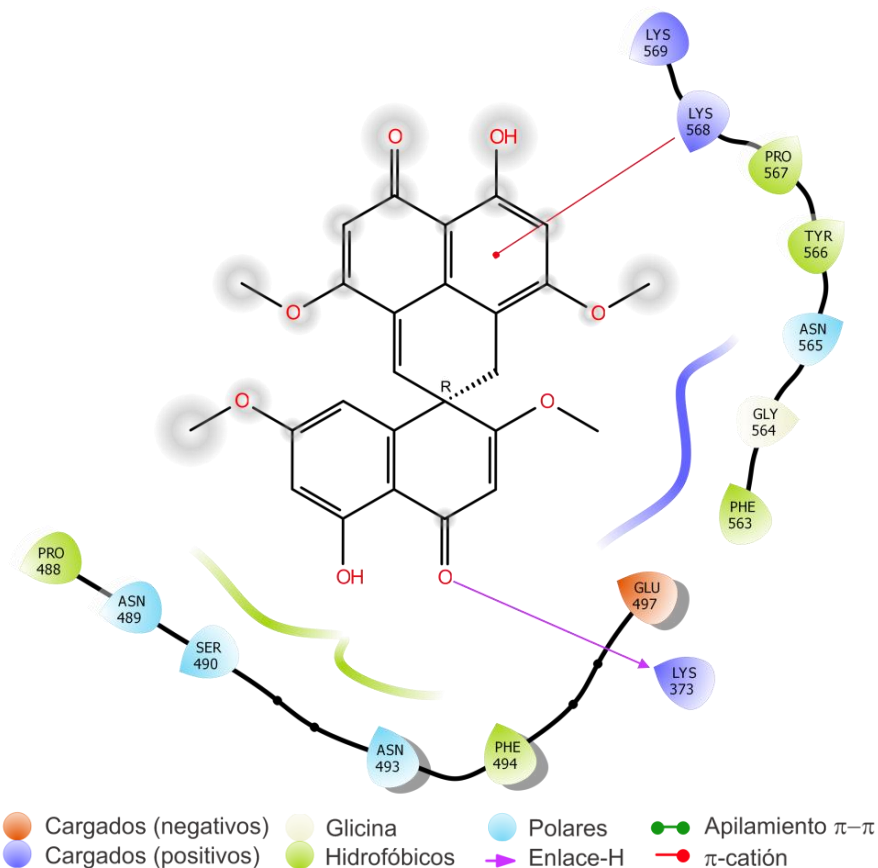
**Figura 32.** Representación en 3D del modo de unión de la minimoidiona B, isómero-S con la  $\alpha$ GHY.



**Figura 33.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidona B, isómero-S con la  $\alpha$ GHY.



**Figura 34.** Representación en 3D del modo de unión de la minimoidona B, isómero-R con la  $\alpha$ GHY.



**Figura 35.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidona B, isómero-*R* con la  $\alpha$ GHY.

### 5.3.2. Enzimas $\alpha$ -glucosidasas de humano

Para complementar lo observado experimentalmente y los cálculos de acoplamiento molecular con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron cálculos de acoplamiento molecular utilizando las estructuras obtenidas por rayos X de del dominio *N*-terminal de la sacarasa-isolmatasa humana (*nt*-SI: código PDB 3LPP) y los dominios *N*- y *C*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (*nt*-MGAM: PDB 2QMJ y *ct*-MGAM: PDB 3TOP, respectivamente), para determinar el posible sitio de unión de los compuestos **118** y **119-S**, ya que estos compuestos presentaron un esqueleto novedoso y actividad inhibitoria significativa frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura. Las enzimas correspondientes a los códigos 3LPP, 2QMJ y 3TOP se describen a detalle en el **Anexo 3**.

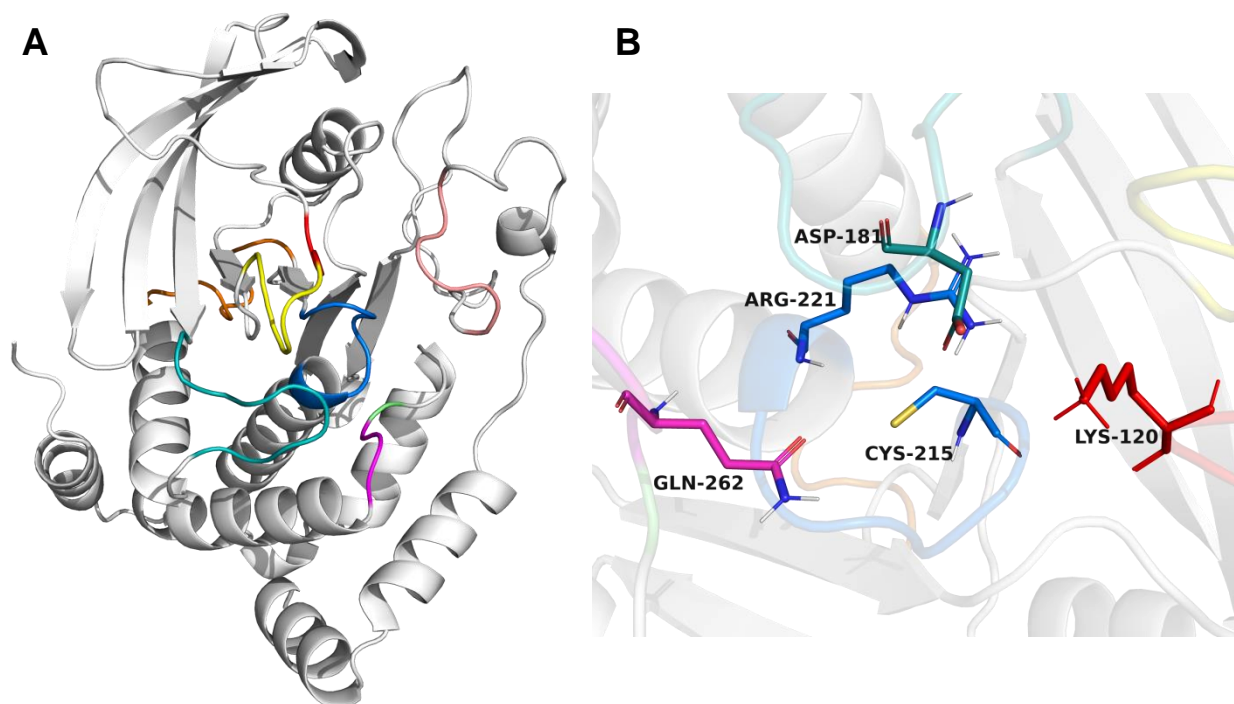
Los resultados obtenidos para los compuestos **118** y **119-S**, indicaron que se unen en el sitio de unión de la acarbosa, los cuales corresponden a los sitios catalíticos de los dominios *nt*-MGAM (**Figuras B4–B6; Tabla B1**) y *ct*-MGAM (**Figuras B7–B9; Tabla B2**), respectivamente. En el caso del dominio *nt*-MGAM los compuestos **118** y **119-S** presentaron una energía de unión de -7.2 y -7.9 kcal/mol, respectivamente; en comparación, la acarbosa mostró una energía de unión de -7.4 kcal/mol. Los compuestos **118** y **119-S** mostraron una energía de unión de -7.0 y -8.8 kcal/mol, respectivamente, en el dominio *ct*-MGAM; mientras que para la acarbosa fue de -7.8 kcal/mol. De igual manera, **118** y **119-S** se unieron al sitio catalítico del dominio *nt*-SI con una energía de unión de -6.6 y -7.7 kcal/mol, respectivamente (**Figuras B7–B9; Tabla B3**), el cual corresponde también al sitio de unión del kotanolol (-6.1 kcal/mol), compuesto utilizado como inhibidor de esta enzima. En general, el compuesto **119-S** presentó mayor afinidad que la acarbosa y el kotanolol en sus respectivos sitios de unión. Los resultados obtenidos indican que las minimoidionas A y B (**118** y **119-S**) podrían mostrar actividad inhibitoria frente a las  $\alpha$ -glucosidasas humanas, por lo que podrían representar nuevos inhibidores de dichas enzimas.

### 5.3.3. Enzima PTP-1B de *Homo sapiens*

Para determinar el posible modo de unión de la minimoidiona B (**119-S**) se realizaron estudios de acoplamiento molecular empleando la estructura obtenida por rayos X de la enzima PTP-1B humana (código PDB 1SUG). Para esta enzima se han descrito varias regiones de interés (**Figura 36**); de entre ellas se encuentran las pertenecientes al sitio catalítico (sitio A), el cual está formado por el asa de reconocimiento de fosfotirosina o asa pTyr (residuos 46–49), el asa Lys120 (residuos 119–121), el asa WPD (residuos 179–187), el asa de unión a fosfato o asa P (residuos 215–221) y el asa Q (residuos 261–263). Los residuos catalíticos comprenden a la Cys215, la cual actúa como nucleófilo; la Asp181, indispensable en la formación del complejo de fosfoenzima y el residuo Gln262, el cual interviene en la liberación del fosfato inorgánico. Otros residuos importantes son la Arg221 y Lys120, los cuales estabilizan al sustrato en el sitio catalítico (Shrestha et al., 2019; Pedersen et al., 2004).



Adicionalmente, se ha descrito un segundo sitio de unión (sitio B), adyacente al sitio catalítico. Este sitio está formado por los residuos Tyr46, Asp48, Val49, Ile219, Met258, Arg24, Arg254 y Glu262, siendo los últimos tres los de mayor relevancia (Ramírez-Espinosa et al., 2011; Puius et al., 1997).



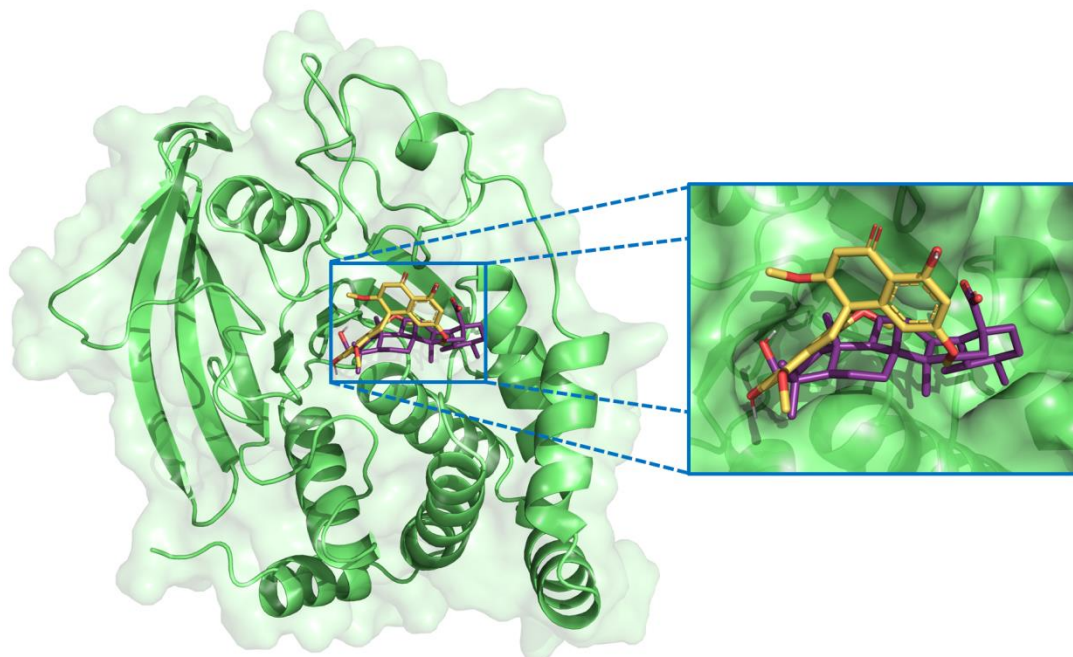
**Figura 36.** A) Asa pTyr (residuos 43–49; rosa), asa R (residuos 113–118; amarillo), asa Lys120 (residuos 119–120; rojo), asa WPD (residuos 177–185; cian), asa S (residuos 201–209; anaranjado), asa P (residuos 215–221; azul) y asa Q (residuos 261-263; violeta). B) Residuos catalíticos.

La estructura de compuesto **119-S** se optimizó geoméricamente utilizando el programa Spartan'10; posteriormente, se encontraron los posibles sitios de interacción empleando el programa AutoDock Tools. El protocolo se validó al modelar el modo de unión del ácido ursólico (RMSD = 1.02 Å; **Figuras 37–39**). A partir del análisis del modo de unión del ácido ursólico se determinó que se une en el sitio B de la enzima. Se observaron interacciones con los residuos reportados para este sitio (Ramírez-Espinosa et al., 2011; Puius et al., 1997). Las interacciones más importantes son con los residuos Arg24, Arg254 y Glu262. Adicionalmente, se observaron interacciones con los residuos Tyr46, Asp48, Val49 e Ile219.

El modelado del sitio de unión de la minimoidiona B (**119**) predijo que el compuesto **119-S** se une en la parte externa del sitio catalítico con una energía de unión de -6.4 kcal/mol, la cual es ligeramente superior a la mostrada por ácido ursólico (-6.1 kcal/mol). **119-S** mostró interacciones con los residuos catalíticos Asp181 y Gln262 y formó enlaces de hidrogeno con Lys120 y Asp181 (**Tabla 6; Figuras 40 y 41**).

**Tabla 6.** Principales interacciones entre los metabolitos modelados y la enzima PTP-1B.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones		
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno
<b>119-S</b>	-6.4	Arg24,Arg47, Asp48,Lys116, Lys120,Asp181, Gln262	Tyr46,Val49, Phe182,Ala217, Ile219	Lys120, Asp181
<b>ácido ursólico</b>	-6.1	Gln21,Arg24, Arg45,Arg47, Asp48,Lys120, Ser216,Arg254, Gln262,Thr263	Tyr20,Tyr46, Val49,Phe182, Ala217,Ile219, Gly259	



**Figura 37.** Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (morado) y la minimoidiona B isómero-S (**119-S**; amarillo) con la PTP-1B (verde, PDB 1SUG).

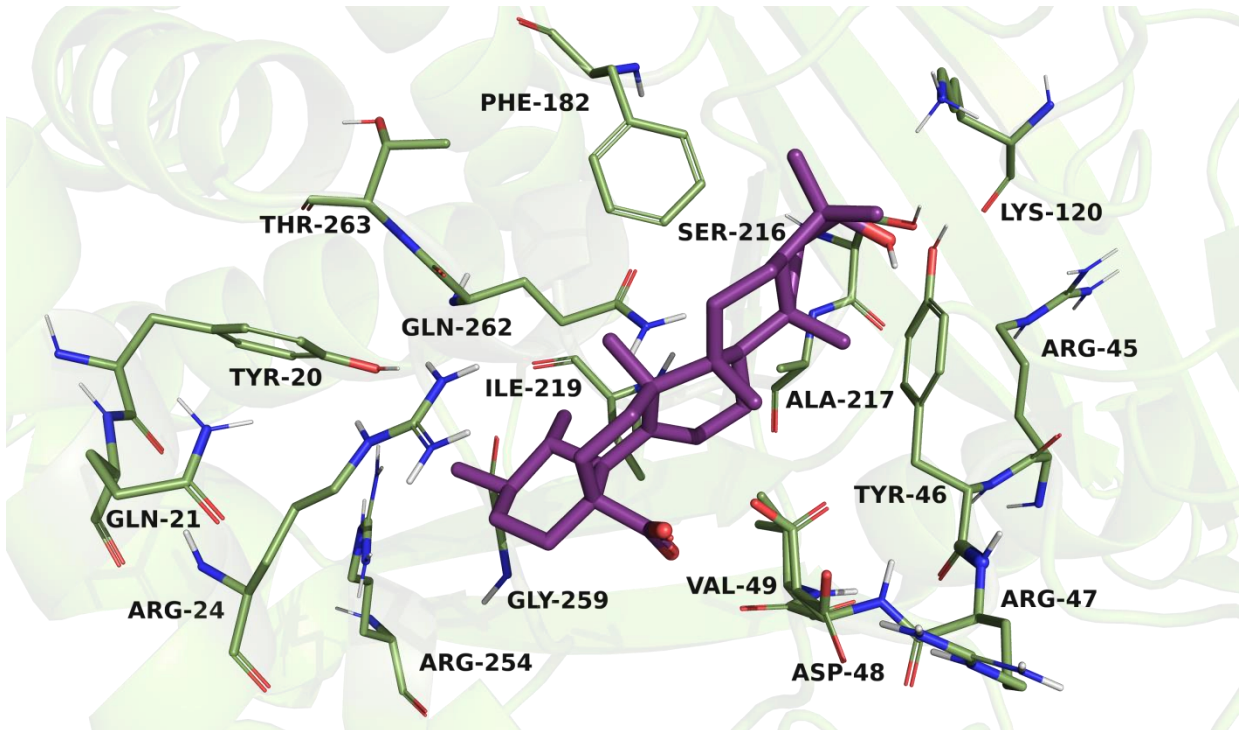


Figura 38. Representación en 3D del modo de unión del ácido ursólico con la PTP-1B.

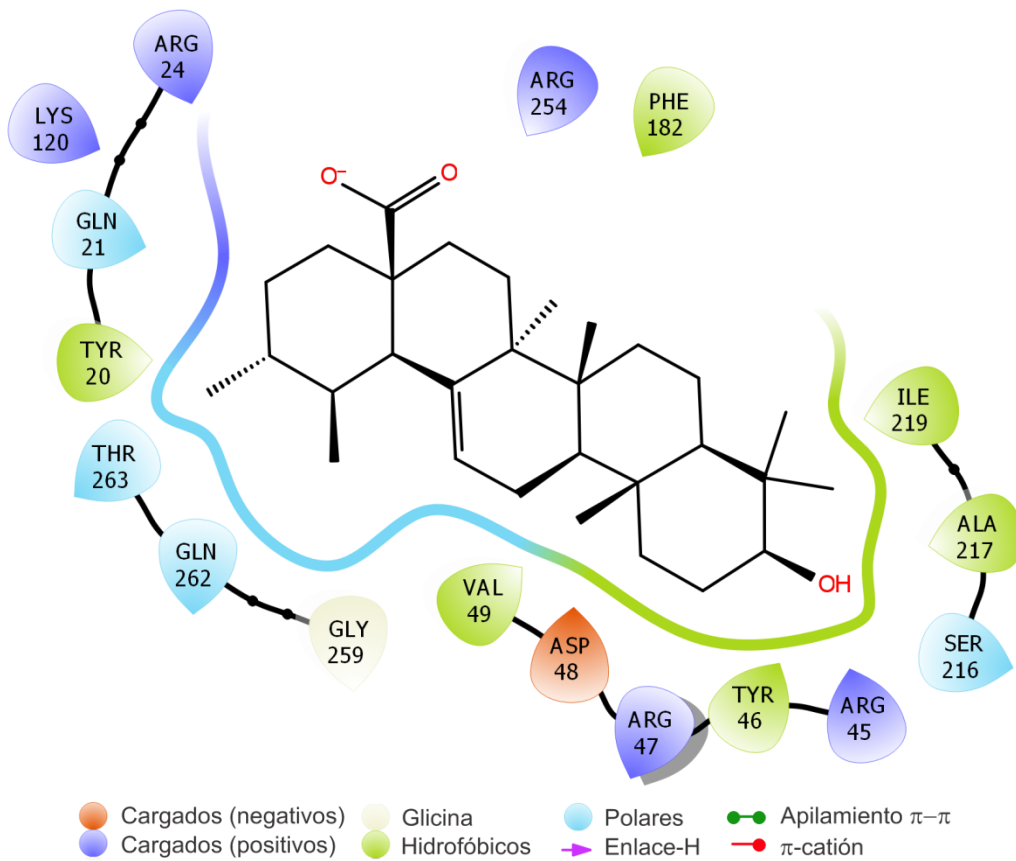
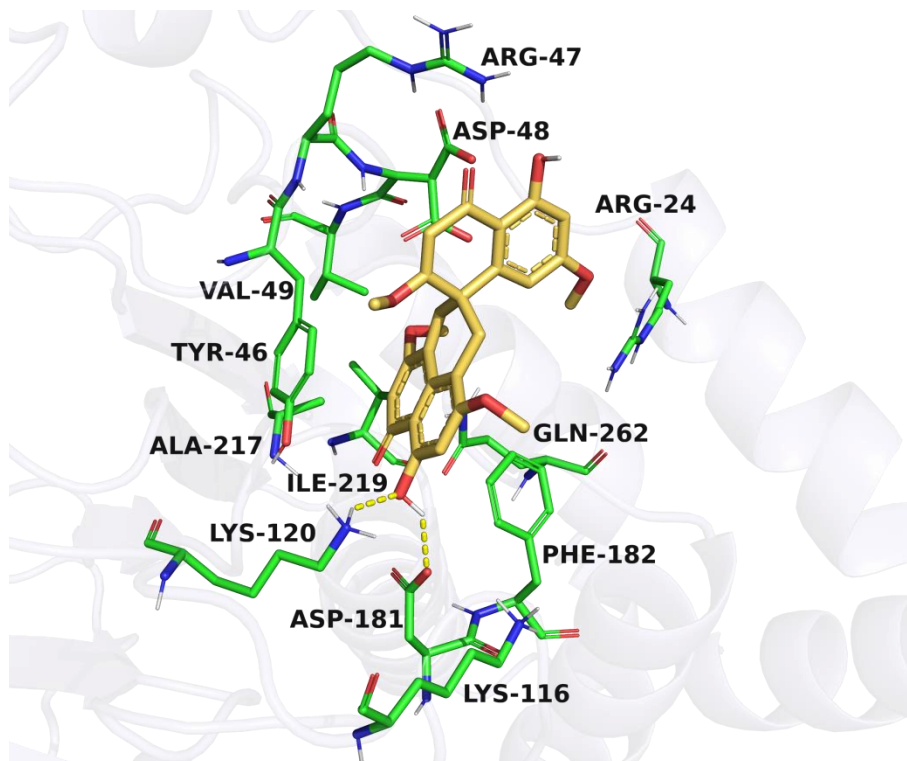
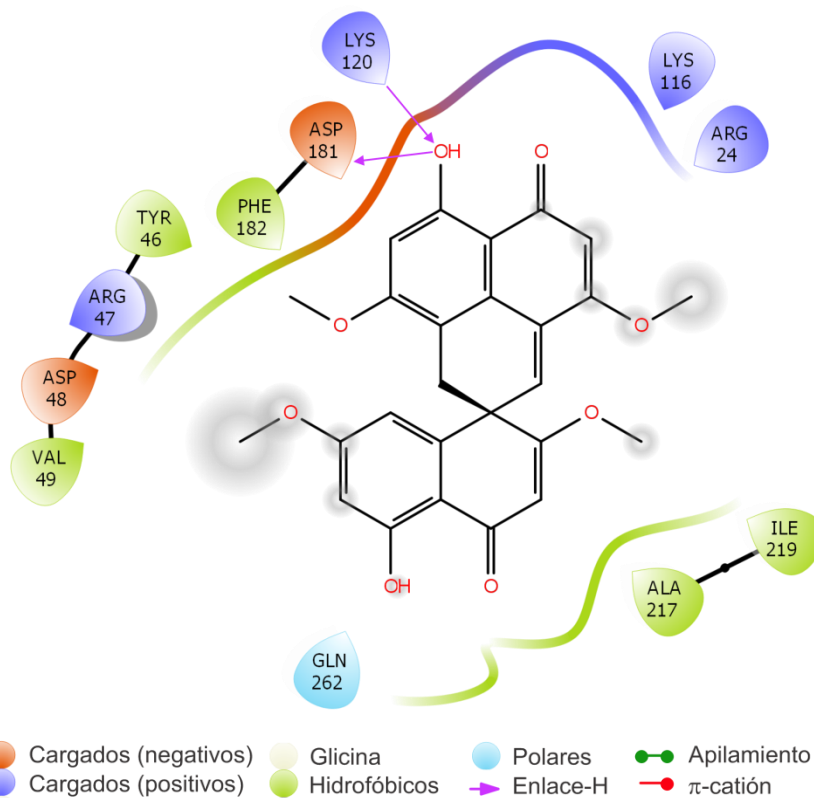


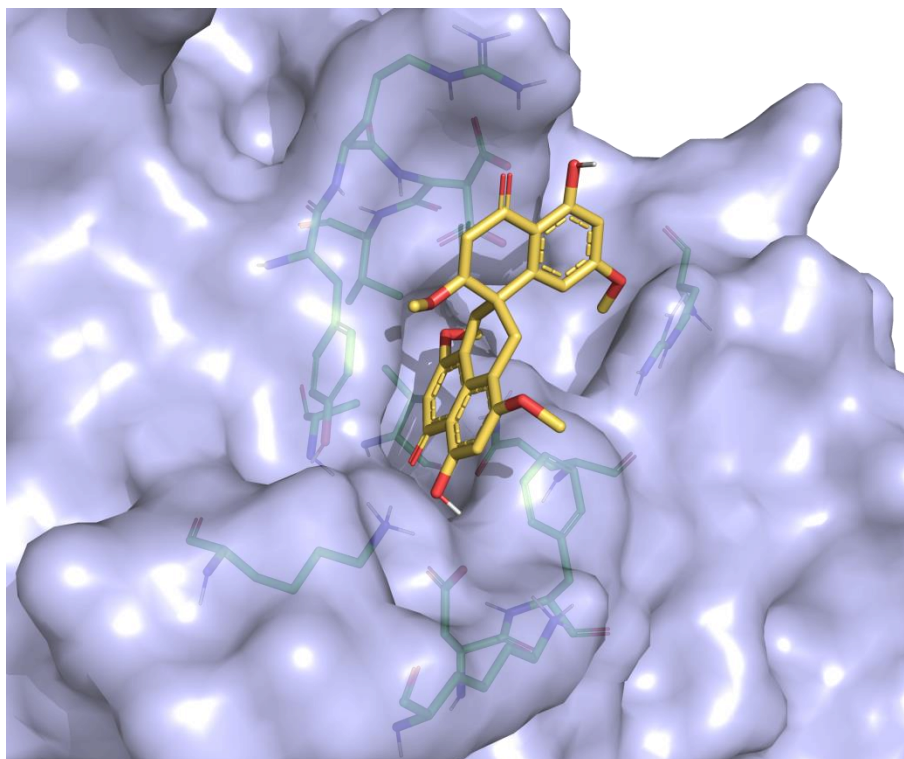
Figura 39. Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B.



**Figura 40.** Representación en 3D del modo de unión de la minimoidiona B, isómero-S (119) con la PTP-1B.



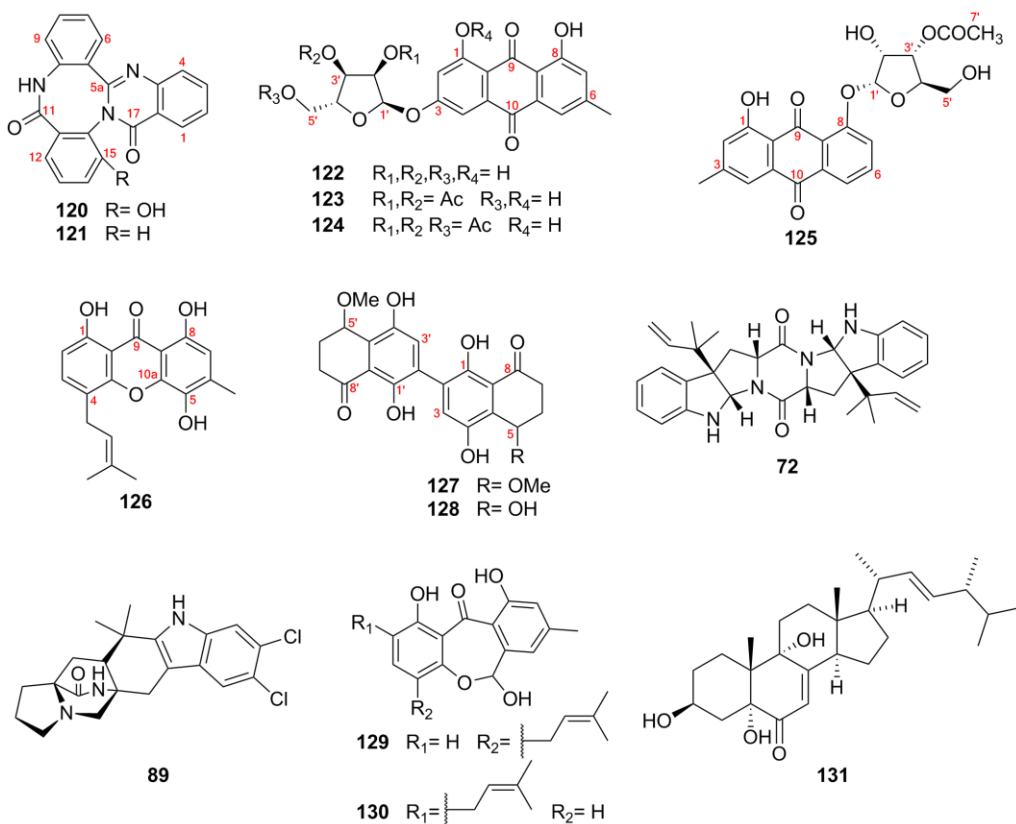
**Figura 41.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la minimoidiona B, isómero-S (119) con la PTP-1B.



**Figura 42.** Representación del sitio de unión de la minimoidiona B (**119-S**) con la PTP-1B, se observa como **119-S** se une en la parte externa del sitio catalítico.

#### 5.4. Estudio químico de la especie *Malbranchea circinata*

La fracción MeCN-MeOH obtenida de *M. circinata* inhibió la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con una  $CI_{50}$  de  $360.7 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ . Dada la actividad mostrada por esta fracción se realizó un fraccionamiento biodirigido, del cual se lograron aislar nueve productos naturales nuevos, de los cuales, dos de ellos son trímeros derivados del ácido antranílico (**120–121**), cuatro antraquinonas ribosiladas (**122–125**), una xantona prenilada (**126**) y dos dímeros derivados de naftalenonas (**127-128**). Adicionalmente, se aislaron los compuestos conocidos, amauromina (**72**), malbranqueamida (**88**), la mezcla epimérica de arugosina N (**129**) y 1,6,10-trihidroxi-8-metil-2-(3-metil-2-butenil)dibenzo[*b,e*]oxepin-11(6*H*)-ona (**130**; Sun et al., 2016) y la  $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihidroxi-( $22E,24R$ )-ergosta-7,22-dien-6-ona (**131**; Lei et al., 2019); los cuales representan el primer reporte de estos compuestos para esta especie. Las estructuras de estos compuestos se indican en la **Figura 43**.



**Figura 43.** Estructuras de los compuestos aislados de *M. circinata*.

**Tabla 7.** Evaluación del efecto inhibitorio de las fracciones flash de *M. circinata* sobre la  $\alpha$ -glucosidasa.

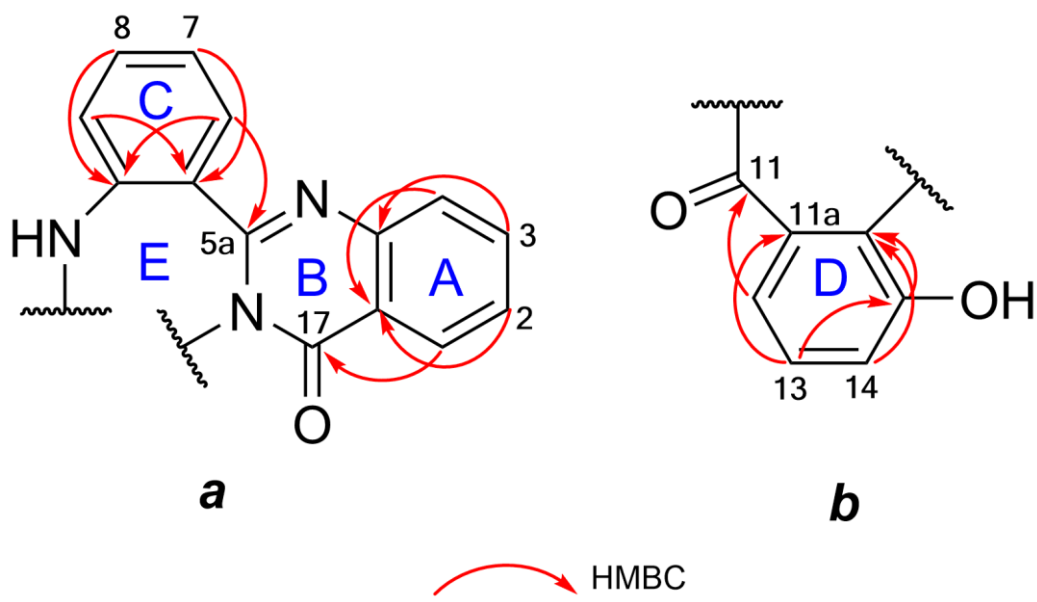
Fracción Flash	Fracción	Masa (mg)	$\alpha$ -glucosidasa <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
			% inhibición					
			1000 <sup>a</sup> ppm	200 <sup>a</sup> ppm	500 <sup>b</sup> ppm	100 <sup>b</sup> ppm	200 <sup>c</sup> ppm	40 <sup>c</sup> ppm
1-40	F1	121.4	72.9*	87.5			100.0	56.2
41-46	F2	248.6	90.3	44.5				
47-53	F3	159.1	104.1*	81.5			97.3	36.1
54-57	F4	32.3	41.4	17.1				
58-70	F5	104.0	154.8*	78.1	90.1	58.3		
71-93	F6	86.9	40.5	5.8				
94-98	F7	265.7	93.8	86.1			80.29	38.44
99-101	F8	215.7	81.8	72.4			86.76	32.50
102-105	F9	72.3	94.6	71.9			70.60	62.86
106-115	F10	40.3	40.5	5.8				
116-124	F11	74.7	28.9	9.9				
125-172	F12	492.8	57.6	32.2				
173-182	F13	379.3	74.9	38.6				
183-206	F14	200.1	28.3	0.9				

<sup>a</sup>Stock, <sup>b</sup>dilución 1:2 y <sup>c</sup>dilución 1:5.

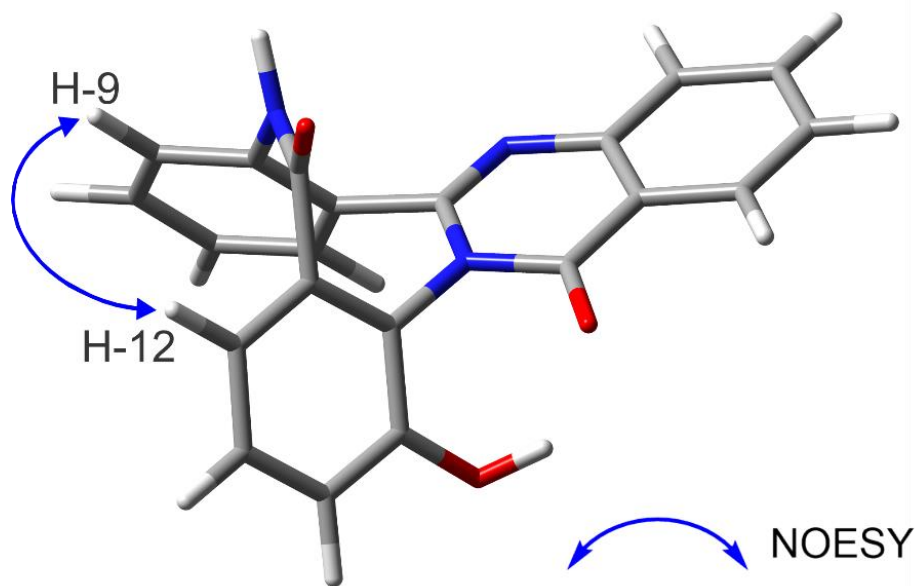
#### 5.4.1. Compuesto 120

El compuesto **120** fue aislado como un sólido cristalino blanco. Su fórmula molecular se estableció con base en los datos espectrométricos (HRESIMS 356.10324  $m/z$   $[M + H]^+$ ) y de RMN como  $C_{21}H_{12}N_3O_3$ , indicando un IDH de 17. El análisis de los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (**Tabla 8**; **Figuras 46 y 47**) indicaron la presencia de 21 carbonos, de los cuales, 18 son aromáticos (once metinos y siete no protonados, de los cuales uno se encontraba oxigenado), dos grupos carbonilo de amida y uno de imina. Basados en el espectro COSY (**Figura 48**) y la multiplicidad observada en el espectro de RMN de  $^1H$ , los once protones observados se encontraban distribuidos en tres anillos bencénicos, dos de ellos 1,2-disustituídos y uno 1,2,3-trisustituído. El análisis de las correlaciones HMBC observadas (**Figura 44**) y los desplazamientos químicos del compuesto **120** (**Tabla 8**), indican la presencia de una quinazolinona unida a un anillo bencénico (anillo C) a través de un carbono de imina (subestructura a).

Esta estructura básica se encuentra presente en algunos alcaloides derivados del ácido antranílico como son la esclerotigenina (Witt y Bergman, 2002), la circumdatina F (Rahbæk y Breinholt, 1999), las asperlicinas (Xu y Pieters, 2013; Tseng et al., 2010) y las benzomalvinas (Clevenger et al., 2018; Jang et al., 2012; Sun et al., 1994). Los protones en el anillo C (H-6–H-9) mostraron las siguientes correlaciones HMBC: H-6 con C-5a, C-8 y C-9a; H-7 con C-5b y C-9; H-8 con C-6 y C-9a; y H-9 con C-7, C-5a y C-5b. Por otro lado, las correlaciones HMBC observadas entre H-12 y C-11, C-11a y C-15; H-13 y C-11, C-12, C-15 y C-15a; H-14 y C-12 y C-15; así como el sistema de espín observado entre H-12–H-14, característico de un anillo aromático 1,2,3-trisustituído (anillo C), respalda la presencia de un residuo de ácido 3-hidroxiantranílico en la molécula (subestructura b). De acuerdo al IDH calculado para la fórmula molecular se requiere de un anillo adicional, el cual se obtiene al unir las subestructuras a y b a través de C-11 y N-10 y entre C-15a y N-16 (anillo E). La correlación observada en el espectro NOESY entre H-9 y H-12 (4.3 Å) debida a la flexión del anillo E (**Figura 45**), respalda los puntos de unión mencionados. Todo lo mencionado anteriormente indica que el compuesto **120** es un tripéptido formado por dos unidades de ácido antranílico y una de ácido 3-hidroxiantranílico.



**Figura 44.** Estructuras parciales *a* y *b*; correlaciones selectas de HMBC del compuesto **120**.



**Figura 45.** Correlación clave observada en el espectro NOESY para el compuesto **120**.



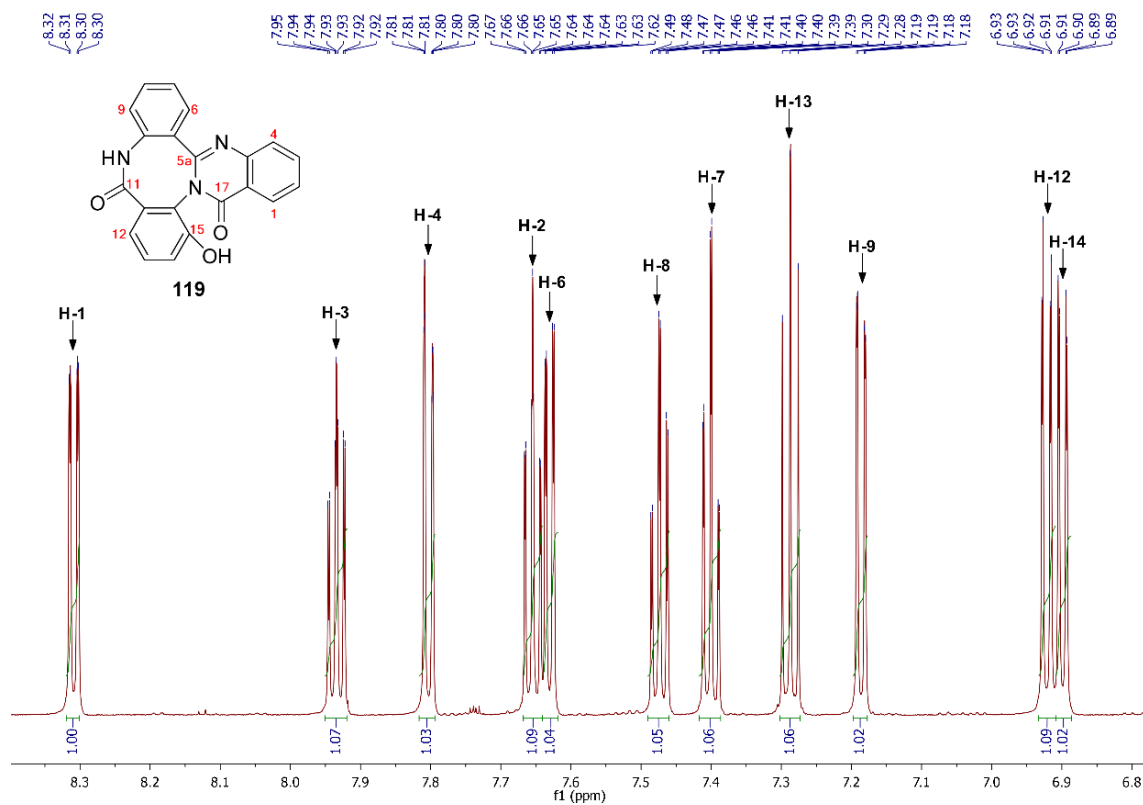


Figura 46. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 120.

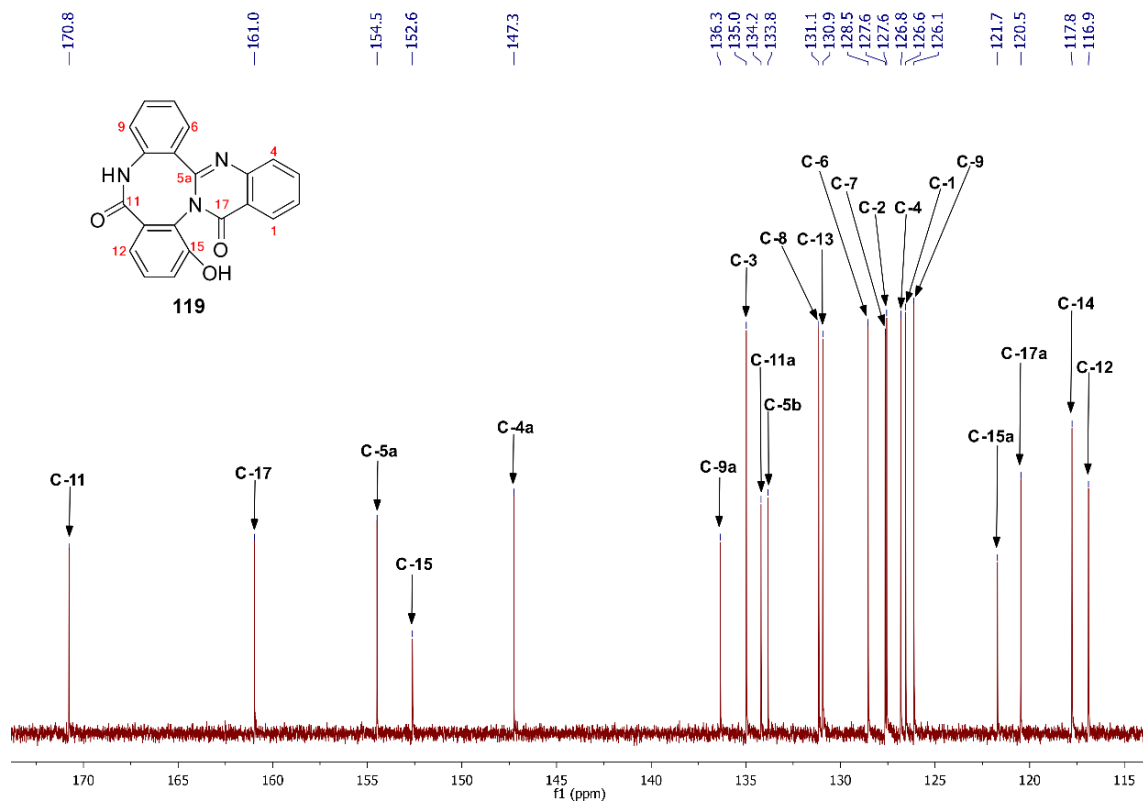
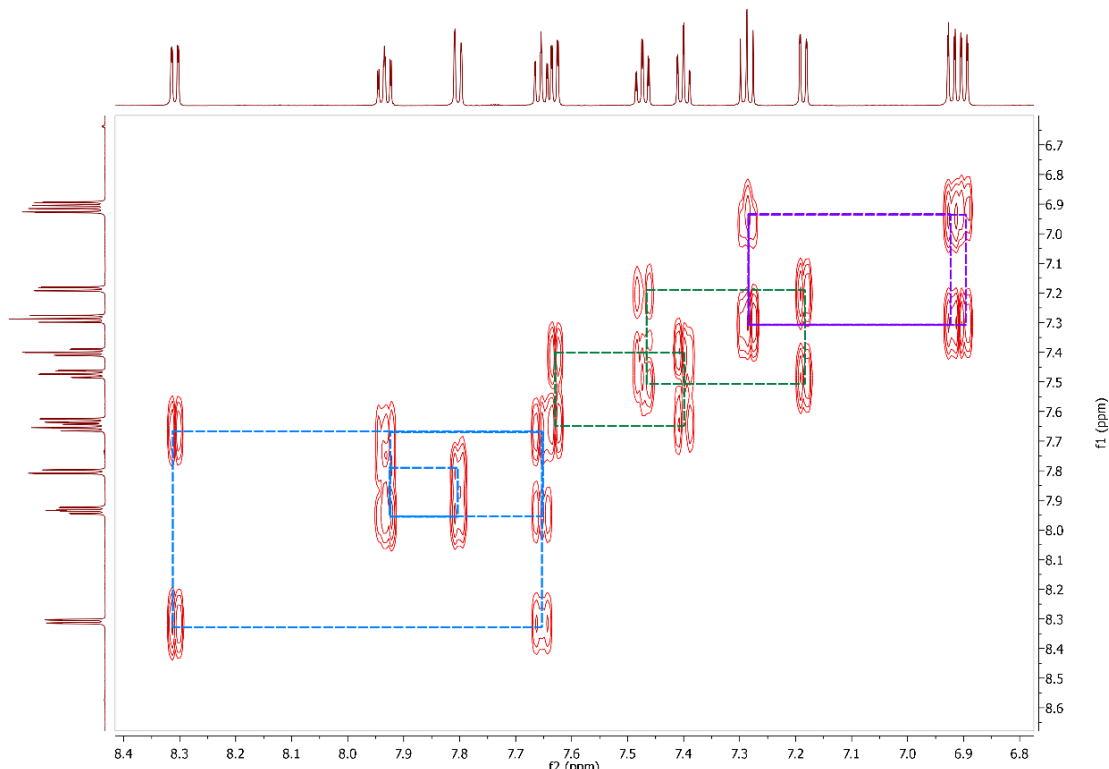


Figura 47. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 120.



**Figura 48.** Espectro de COSY del compuesto **120**.

**Tabla 8.** Datos de RMN del compuesto **120** en CD<sub>3</sub>OD (<sup>1</sup>H, 700 MHz and <sup>13</sup>C, 175 MHz).

posición	$\delta_C$	tipo	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	HMBC <sup>1</sup> H → <sup>13</sup> C
1	126.6	CH	8.31, dd (8.0, 1.5)	3,4,4a,17
2	127.6	CH	7.65, ddd (8.0, 7.2, 1.5)	4,4a,17,17a
3	135.0	CH	7.93, ddd (7.6, 7.2, 1.5)	1,4a,17a
4	126.8	CH	7.80, dd (7.6, 1.5)	2,3,4a,17,17a
4a	147.3	C		
5a	154.5	C		
5b	133.8	C		
6	128.5	CH	7.63, dd (7.6, 1.6)	5a,8,9a
7	127.6	CH	7.40, ddd (8.0, 7.6, 1.1)	5b,9
8	131.1	CH	7.47, ddd (8.0, 7.6, 1.6)	6,9a
9	126.1	CH	7.18, dd (8.0, 1.1)	5a,5b,7
9a	136.3	C		
11	170.8	C		
11a	134.2	C		
12	116.9	CH	6.90, dd (7.6, 1.3)	11, 11a
13	130.9	CH	7.29, dd (8.3, 7.6)	11,11a,12,15,15a
14	117.8	CH	6.92, dd (8.3, 1.3)	a
15	152.6	C		12,15,15a
15a	121.7	C		
17	161.0	C		
17a	120.5	C		

## 5.4.2. Compuesto 121

El compuesto **121** se aisló como un sólido cristalino. Su fórmula molecular se estableció como  $C_{21}H_{13}N_3O_2$  por HRESIMS ( $340.10860 m/z [M + H]^+$ ), que permite un IDH de 17. El análisis detallado de los espectros 1D y 2D RMN (**Tabla 9; Figuras 49 y 50**), en particular las correlaciones HMBC observadas, indicaron que este compuesto está íntimamente relacionado al compuesto **120**; las principales diferencias se observaron en el anillo D, el cual corresponde a un anillo bencénico 1,2-disustituido en **121**. El anillo 1,2,3-trisustituido identificado en **120** (protones H-12 al H-14) fue reemplazado por un sistema aromático 1,2-disustituido en **121** (protones H-12 al H-15). Adicionalmente, la diferencia de 16 unidades de masa y la señal diamagnéticamente desplazada del carbono C-15 de  $\delta_c$  152.6 en **120** a  $\delta_c$  128.2 en **121**, sugirió la pérdida del hidroxilo fenólico en C-15. Por lo tanto, el compuesto **121** se propuso como el derivado 15-desoxi de **120**.

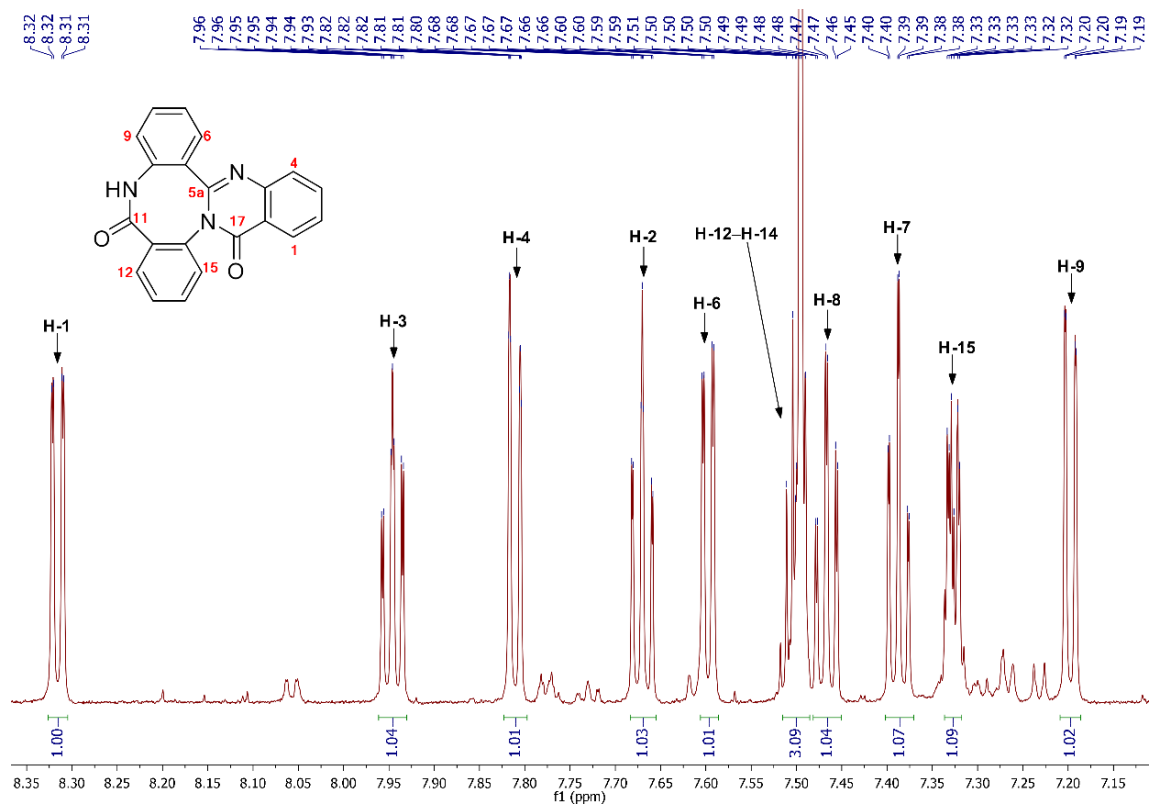
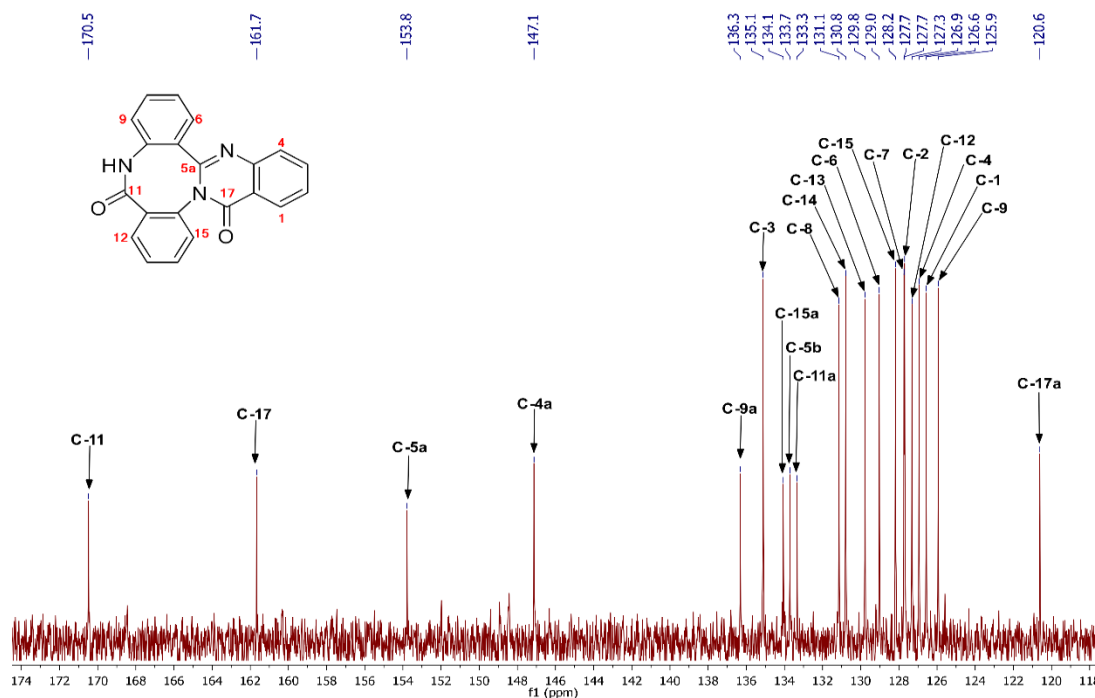


Figura 49. Espectro de RMN- $^1H$  (700 MHz,  $CD_3OD$ ) del compuesto **121**.



**Figura 50.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **121**.

**Tabla 9.** Datos de RMN del compuesto **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $^1\text{H}$ , 700 MHz and  $^{13}\text{C}$ , 175 MHz).

posición	$\delta_{\text{C}}$	tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ en Hz)	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	126.6	CH	8.32, dd (8.0, 1.5)	3,4a,17
2	127.7	CH	7.67, ddd (8.0, 7.2, 1.1)	4,4a,17,17a
3	135.1	CH	7.95, ddd (8.3, 7.2, 1.5)	1,4a
4	126.9	CH	7.81, dd (8.3, 1.1)	2,3,17a
4a	147.1	C		
5a	153.8	C		
5b	133.7	C		
6	129.0	CH	7.60, dd (7.6, 1.5)	5a,8,9a
7	127.7	CH	7.39, ddd (8.0, 7.6, 1.1)	5b,9
8	131.1	CH	7.47, ddd (8.0, 7.6, 1.5)	6,9a
9	125.9	CH	7.20, dd (8.0, 1.1)	5a,5b,7
9a	136.3	C		
11	170.5	C		
11a	133.3	C		
12	127.3	CH	7.48-7.50, m	11,11a,14
13	129.8	CH	7.48-7.50, m	11,11a,14
14	130.8	CH	7.48-7.50, m	11,11a,14
15	128.2	CH	7.33, m	13
15a	134.1	C		
17	161.7	C		
17a	120.6	C		

Con la finalidad de proporcionar más evidencia sobre la correcta elucidación estructural de los compuestos **120** y **121**, se realizó el cálculo de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  RMN y se compararon con los obtenidos experimentalmente. Básicamente, el protocolo consiste en una búsqueda conformacional y posterior optimización geométrica de los confórmeros utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con M06-2X/6-31+G(d) como nivel de teoría y para el cálculo de los desplazamientos químicos se utilizó el método GIAO con el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p). La comparación entre los desplazamientos calculados y los experimentales para los compuestos **120** y **121**, mostró un error absoluto promedio (MAE) menor a 0.11 ppm para  $^1\text{H}$  y menor a 2.0 ppm para  $^{13}\text{C}$  (**Tablas A5 y A7**).

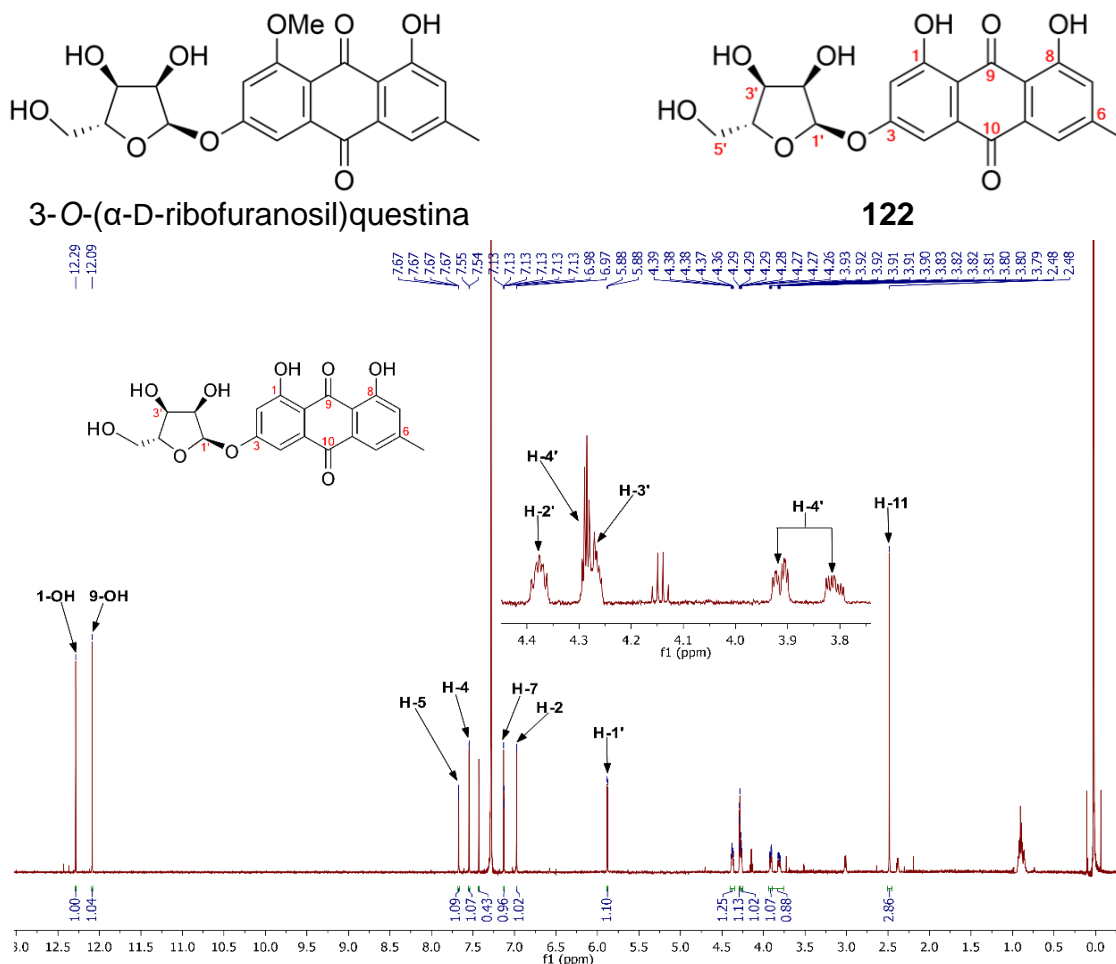
Esto indica que los valores obtenidos del cálculo computacional correlacionan de manera adecuada con los valores obtenidos experimentalmente y respalda las estructuras químicas propuestas, así como la correcta asignación de las mismas.

No existe precedente en la naturaleza de tripéptidos como **120** y **121**. Aun así, existen reportes donde se indica que el calentamiento de ácido antranílico con pentóxido de fosforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) en reflujo con xileno (Chatterjee y Ganguly, 1968) o con ácido polifosfórico en una atmosfera de argón (Siling y Ponomarev, 1978) producen el compuesto **121**. El perfil de UV reportado ( $\lambda_{\text{max}}$  280 y 306 nm) es similar al observado para los compuestos **120** y **121** ( $\lambda_{\text{max}}$  280, 306 y 320 nm); desafortunadamente no existen datos de RMN disponibles para realizar una comparación más precisa.

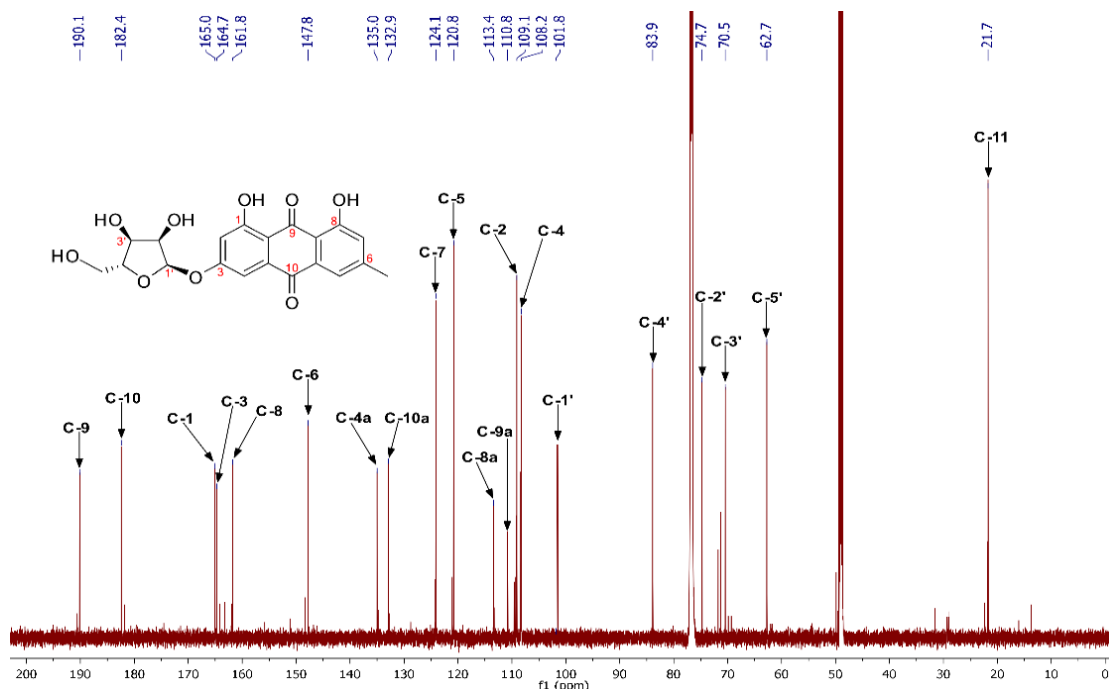
#### 5.4.3. Compuestos **122**, **123** y **124**

Los compuestos **122–124** fueron aislados como sólidos vítreos de color anaranjado oscuro; sus fórmulas moleculares se determinaron como  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_9$ ,  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  y  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$  con base en lo observado en RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y HRESIMS. Se calculó un IDH de 12, 14 y 15, para los compuestos **122**, **123** y **124**, respectivamente. Los datos de RMN obtenidos (**Tabla 10**) fueron muy similares a los reportados para la 3-O-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)questina (417.11801  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), compuesto previamente aislado del hongo endófito *Eurotium rubrum* (Li et al., 2019).

En el caso de **122** ( $403.10291\ m/z\ [M + H]^+$ ), la señal correspondiente al grupo metoxilo ( $\delta_H\ 3.97$ , s, 12-OMe) presente en la questina es reemplazada por la señal característica de un hidroxilo fenólico quelatado ( $\delta_H\ 12.29$ , s, 1-OH); este cambio está respaldado por la pérdida de 14 Da en su masa molecular. Adicionalmente, el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de **122** mostró señales para un segundo hidroxilo fenólico quelatado en  $\delta_H\ 12.09$ , (9-OH) y señales que permitieron identificar una unidad de  $\alpha$ -D-ribofuranosa (**Tabla 10**), al igual que en la 3-O-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)questina. Finalmente, la correlación HMBC observada entre el protón anomérico en  $\delta_H\ 5.88$  (d,  $J=4.5\ \text{Hz}$ , H-1') con la señal en  $\delta_C\ 164.7$  (C-3) apoyan que el residuo de ribosa se encuentre unido en esta posición mediante un enlace O-glicosídico. Posteriormente, de la hidrólisis del compuesto **122** se obtuvo ribosa, la cual, se identificó mediante CCF mediante coelución con una muestra de referencia. Adicionalmente, valor negativo de la rotación óptica del monosacárido obtenido fue consistente con la rotación óptica de la D-ribose.

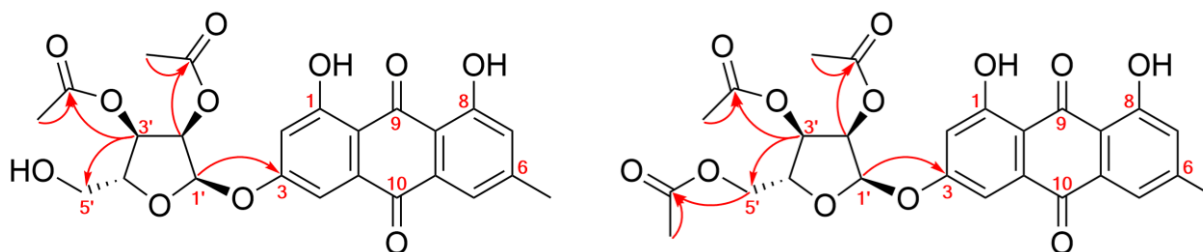


**Figura 51.** Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **122**.



**Figura 52.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **122**.

Basados en los datos de RMN (**Tabla 10**), los compuestos **123** y **124** mostraron la misma aglicona que el compuesto **122**; la principal diferencia radica en la unidad de ribofuranosa, que se encuentra di- y triacetilada en los compuestos **123** y **124**, respectivamente. El análisis del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **123** reveló la presencia de dos grupos carbonilo adicionales en  $\delta_{\text{C}}$  169.9 ( $2'\text{-COCH}_3$ ) y  $\delta_{\text{C}}$  170.6 ( $3'\text{-COCH}_3$ ) y dos grupos metilo en  $\delta_{\text{C}}$  20.5 ( $2'\text{-COCH}_3$ ) y  $\delta_{\text{C}}$  20.8 ( $3'\text{-COCH}_3$ ); con base en las correlaciones HMBC observadas entre H-2' y C-4'/2'- $\text{COCH}_3$ ; 2'- $\text{COCH}_3$  y 2'- $\text{COCH}_3$ ; H-3' y C-1'/C-5'/2'- $\text{COCH}_3$  (**Tabla 10** y **Figura 53**). Los espectros de RMN de **124** mostraron señales para un tercer grupo acetilo, con su grupo carbonilo en  $\delta_{\text{C}}$  170.6 ( $5'\text{-COCH}_3$ ) y su metilo en  $\delta_{\text{C}}$  20.6 ( $5'\text{-COCH}_3$ ); las correlaciones HMBC entre H-5' y C-3'/5'- $\text{COCH}_3$ ; 5'- $\text{COCH}_3$  y 5'- $\text{COCH}_3$ , indicaron que el grupo acetilo está en C-5'. La configuración del D-monosacárido se asumió por consideraciones biogénicas.



**Figura 53.** Correlaciones HMBC selectas para **123** y **124**.

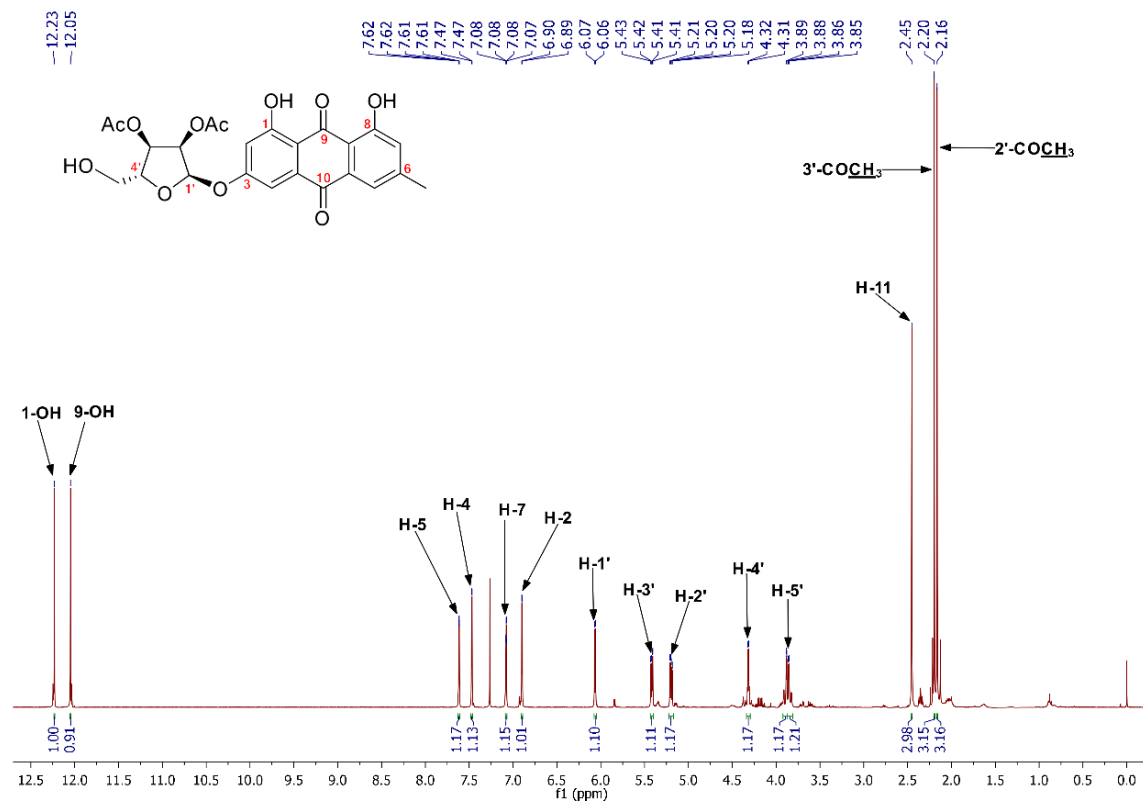


Figura 54. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 123.

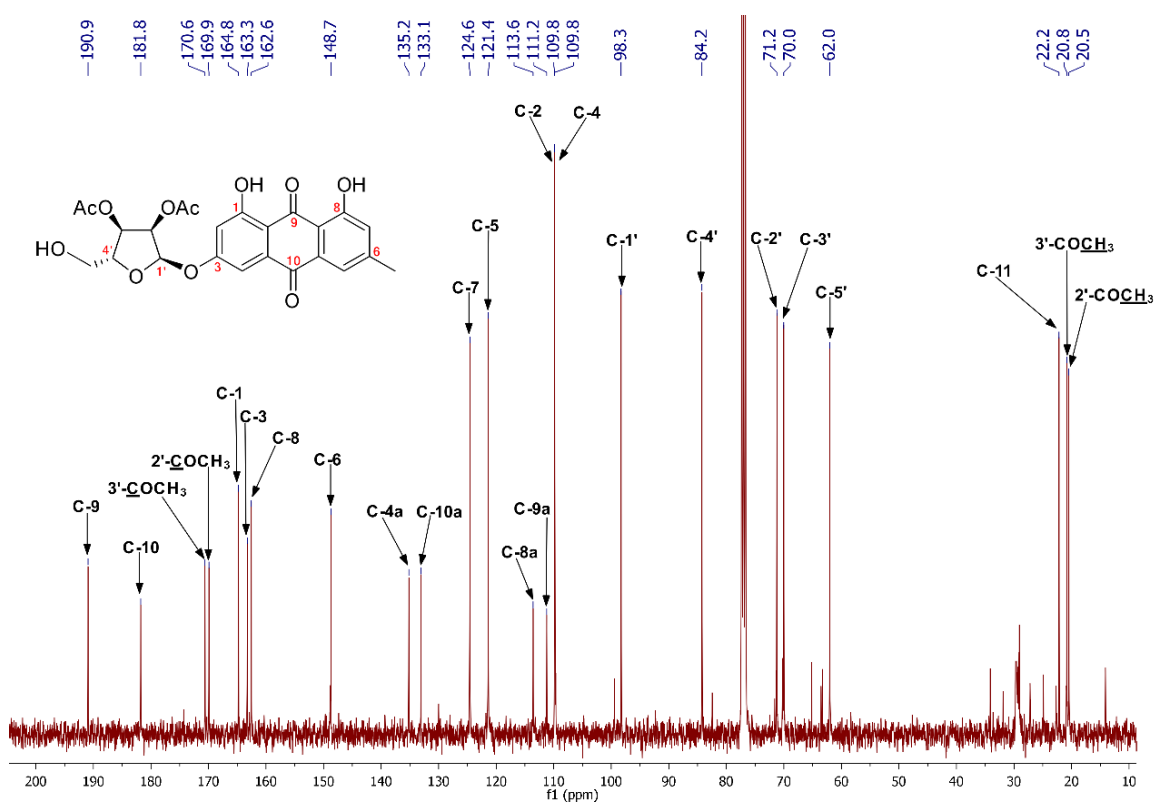


Figura 55. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 123.



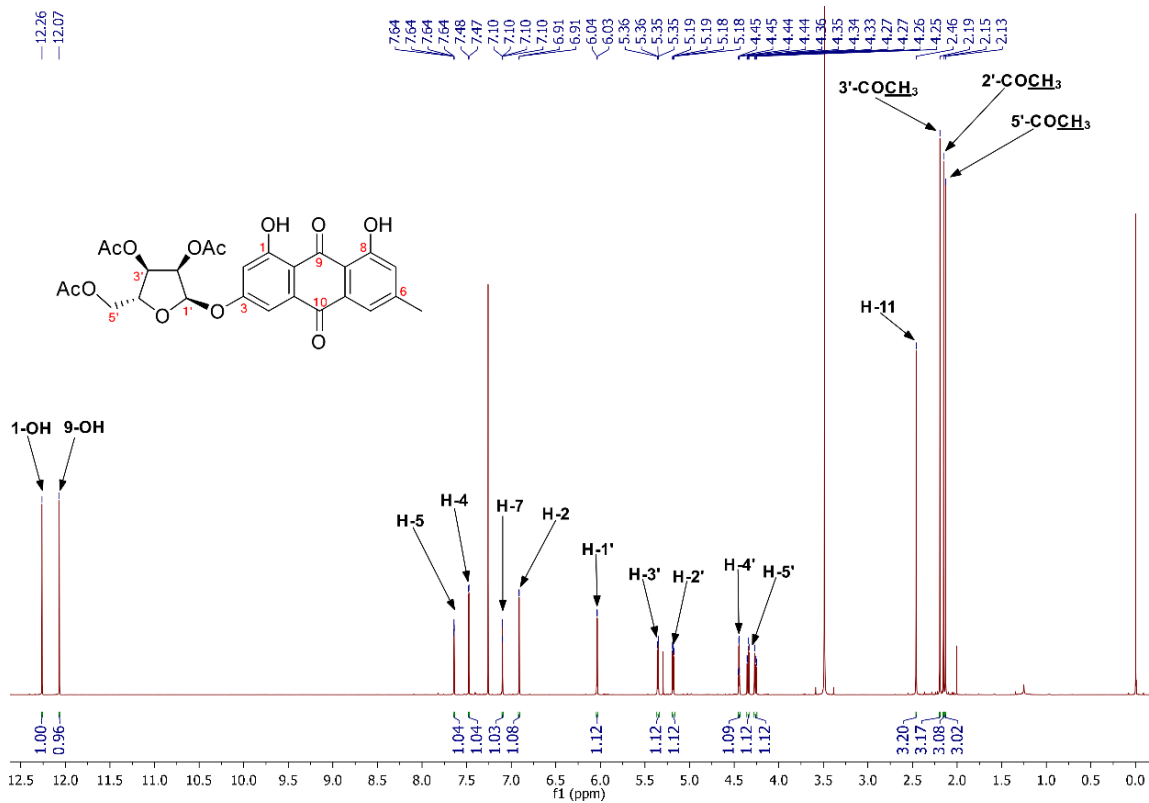


Figura 56. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 124.

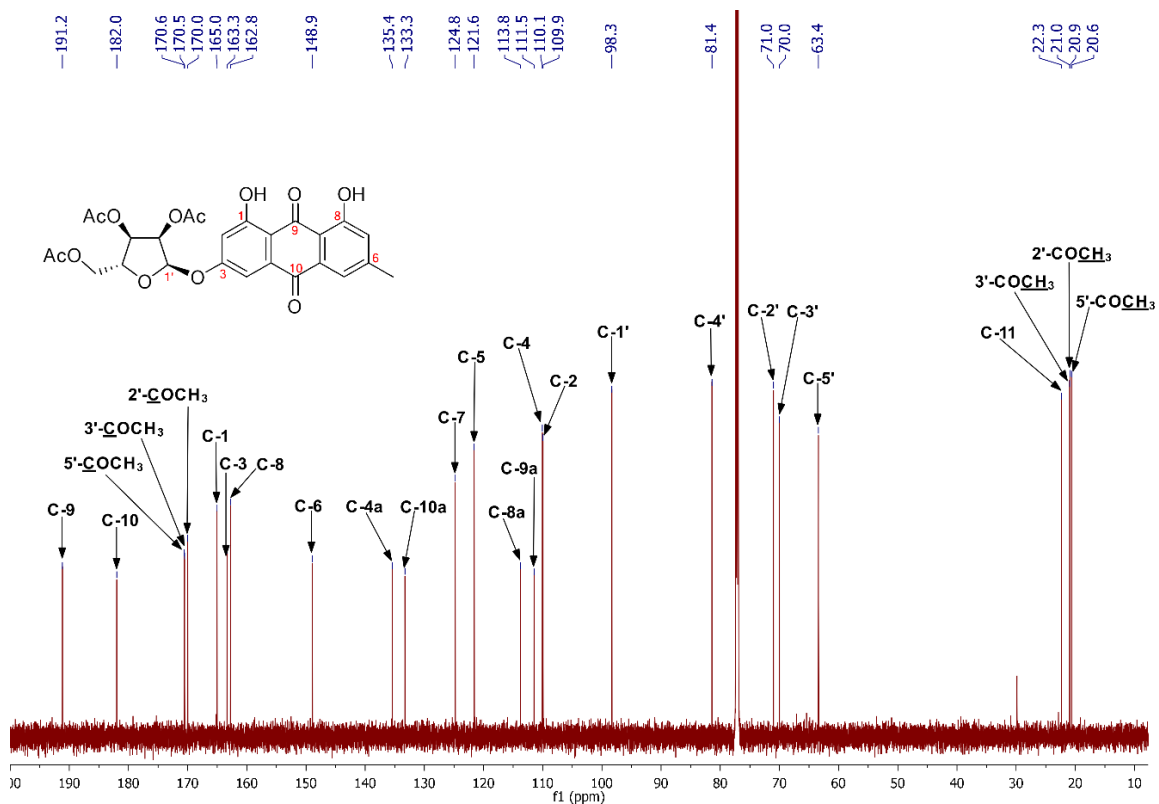


Figura 57. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 124.

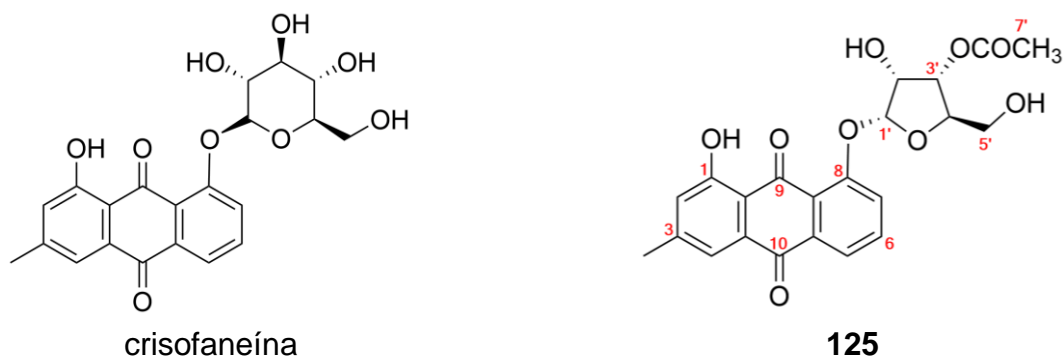
**Tabla 10.** Datos de RMN de los compuestos **122–124**.

posición	<b>122<sup>b,d</sup></b>				<b>123<sup>a,c</sup></b>			<b>124<sup>b,c</sup></b>		
	$\delta_C^d$	tipo	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz) <sup>c</sup>	HMBC <sup>d</sup> $^1H \rightarrow ^{13}C$	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	HMBC $^1H \rightarrow ^{13}C$	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	HMBC $^1H \rightarrow ^{13}C$
1	165.0	C			164.8			165.0		
2	109.1	CH	6.97, d (2.5)	1,4	109.8	6.90, d (2.5)	1,4,9a	109.9	6.91, d (2.5)	1,4,9a
3	164.7	C			163.3			163.3		
4	108.2	CH	7.55, d (2.5)	3,4a,10	109.8	7.47, d (2.5)	3,4a,10	110.1	7.48, d (2.5)	3,4a,10
4a	135.0	C			135.2			135.4		
5	120.8	CH	7.67, dq (1.7, 0.7)	7,8a,9,11	121.4	7.62, dq (1.7, 0.9)	7,8a,9,10,11	121.6	7.64, dq (1.7, 0.7)	7,8a,10,11
6	147.8	C			148.7			148.9		
7	124.1	CH	7.13, dq (1.7, 0.7)	5,8,8a,9,11	124.6	7.08, dq (1.7, 0.9)	5,8,8a,11	124.8	7.10, dq (1.7, 0.7)	5,8,8a,9,11
8	161.8	C			162.6			162.8		
8a	113.4	C			113.6			113.8		
9	190.1	C			190.9			191.2		
9a	110.8	C			111.2			111.5		
10	182.4	C			181.8			182.0		
10a	132.9	C			133.1			133.3		
11	21.7	CH <sub>3</sub>	2.48, s		22.2	2.45, s		22.3	2.46, s	
1'	101.8	CH	5.88, d (4.5)	3,3',4'	98.3	6.07, d (4.5)	3,3',4'	98.3	6.04, d (4.5)	3,3',4'
2'	74.7	CH	4.38, dd (6.9, 4.5)	4'	71.2	5.20, dd (7.0, 4.5)	4',2'- <u>COCH<sub>3</sub></u>	71.0	5.18, dd (7.0, 4.5)	4',2'- <u>COCH<sub>3</sub></u>
3'	70.5	CH	4.27, m	1',5'	70.0	5.42, m	1',5',3'- <u>COCH<sub>3</sub></u>	70.0	5.36, m	1',5',3'- <u>COCH<sub>3</sub></u>
4'	83.9	CH	4.28, m	2',5'	84.2	4.32, m	2',5'	81.4	4.45, m	2',5'
5'	62.7	CH <sub>2</sub>	3.90, m 3.81, m	3',4' 3',4'	62.0	3.89, dd (12.2, 3.2) 3.85, dd (12.2, 3.2)	3',4' 3',4'	63.4	4.34, dd (12.3, 3.2) 4.26, dd (12.3, 3.2)	3', 5'- <u>COCH<sub>3</sub></u> 3', 5'- <u>COCH<sub>3</sub></u>
2'- <u>COCH<sub>3</sub></u>					169.9			170.0		
2'- <u>COCH<sub>3</sub></u>					20.5	2.16, s	2'- <u>COCH<sub>3</sub></u>	20.9	2.15, s	2'- <u>COCH<sub>3</sub></u>
3'- <u>COCH<sub>3</sub></u>					170.6			170.5		
3'- <u>COCH<sub>3</sub></u>					20.8	2.20, s	3'- <u>COCH<sub>3</sub></u>	21.0	2.19, s	3'- <u>COCH<sub>3</sub></u>
5'- <u>COCH<sub>3</sub></u>					170.6			170.6		
5'- <u>COCH<sub>3</sub></u>					20.6	2.13, s		20.6	2.13, s	5'- <u>COCH<sub>3</sub></u>
1-OH			12.29, s	2,9a		12.23, s	2,9a		12.26, s	2,9a
9-OH			12.09, s	7,8a		12.05, s	7,8a		12.07, s	7,8a

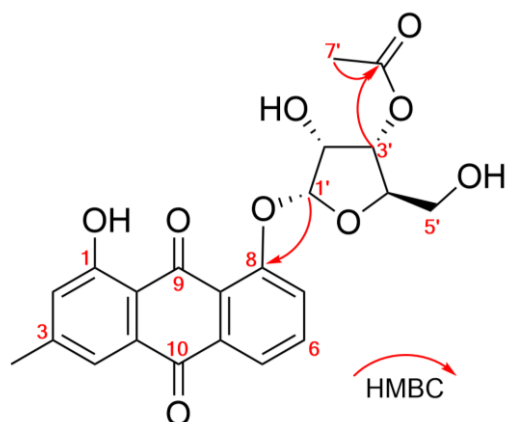
<sup>a</sup> <sup>1</sup>H (400 MHz) y <sup>13</sup>C (100 MHz). <sup>b</sup> <sup>1</sup>H (700 MHz) y <sup>13</sup>C (175 MHz). <sup>c</sup> CDCl<sub>3</sub>. <sup>d</sup> CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD.

#### 5.4.4. Compuesto 125

El compuesto **125** se aisló como un sólido naranja. Su fórmula molecular se determinó por HRESIMS como  $C_{22}H_{20}O_9$ , indicando un IDH de 13. Los datos de RMN (**Tabla 11**; **Figuras 60** y **61**) para este compuesto fueron casi idénticos a los reportados para la crisofaneína (Kubo et al., 1992) (**Figura 58**). La diferencia radica en que el compuesto **125** posee una unidad 3'-acetil- $\alpha$ -D-ribofuranosil ( $\delta_H$  5.85, d,  $J = 4.4$  Hz, H-1'; 4.56, m, H-2'; 5.29, dd,  $J = 7.0, 2.1$  Hz, H-3'; 4.38, m, H-4'; 3.91, m, H-5'; 2.22, s, 7'-CH<sub>3</sub>) en lugar de una unidad  $\beta$ -D-glucopiranosil en C-8. Se estableció que la unidad de ribofuranosa estaba unida por un enlace O-glicosídico al C-8, basados en las correlaciones HMBC del protón  $\alpha$ -anomérico H-1' ( $\delta_H$  5.85) con C-8 ( $\delta_C$  158.1). Por otro lado, las correlaciones HMBC entre H-3' y H-7' con C-6' indicaron la posición del grupo acetilo en C-3' (**Figura 59**). Con base en lo mencionado anteriormente llamamos al compuesto **125** como crisofanol O-3'-acetil- $\alpha$ -D-ribofuranosido.



**Figura 58.** Comparación de la estructura de la crisofaneína y el compuesto **125**.



**Figura 59.** Correlaciones HMBC selectas del compuesto **125**.

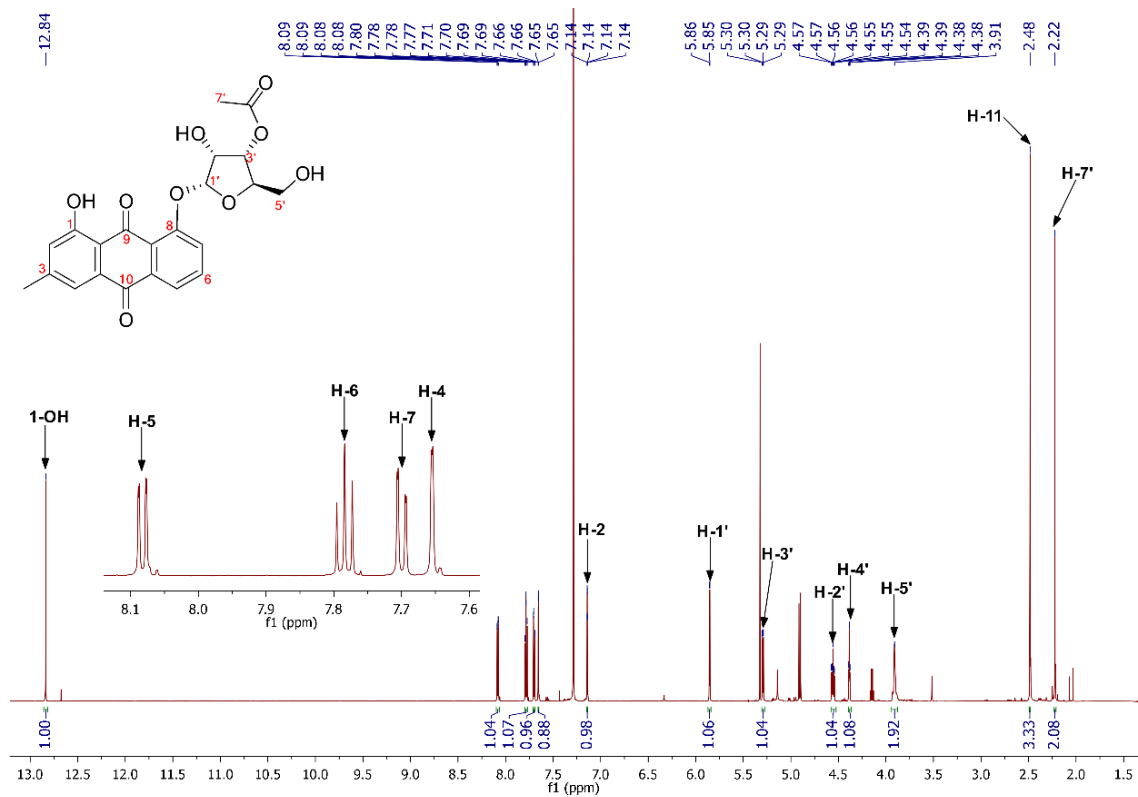


Figura 60. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 125.

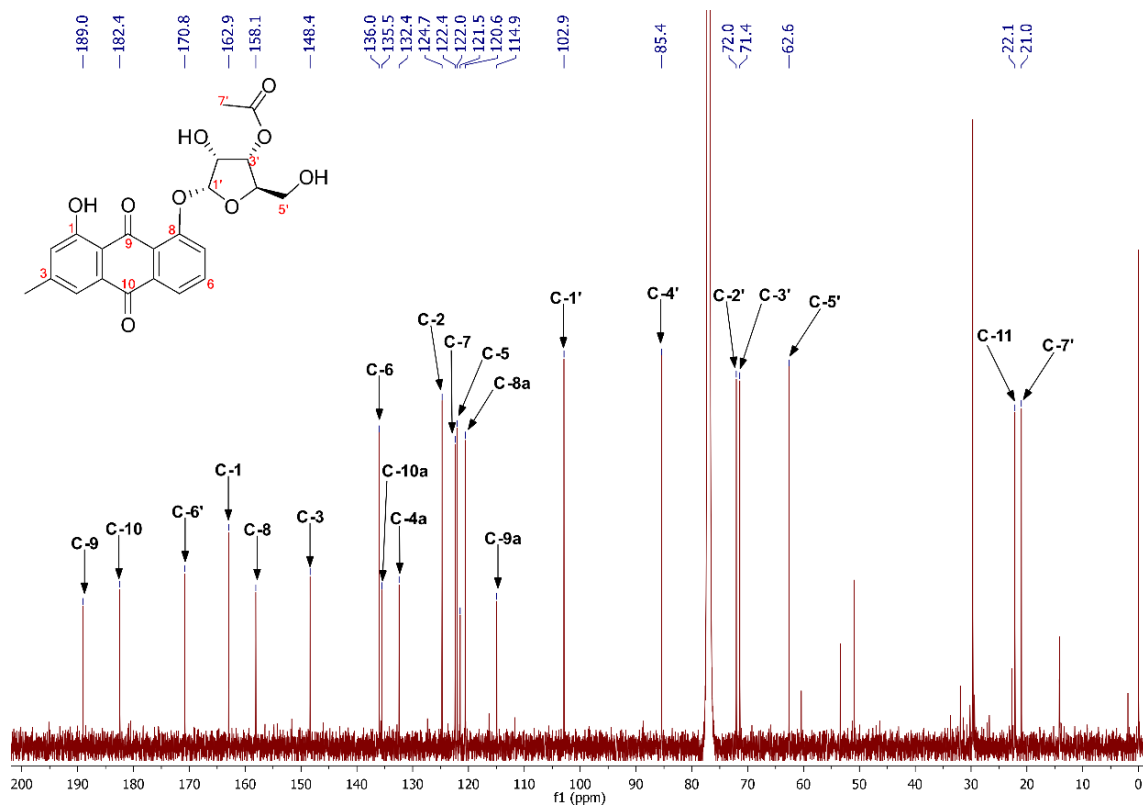


Figura 61. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 125.

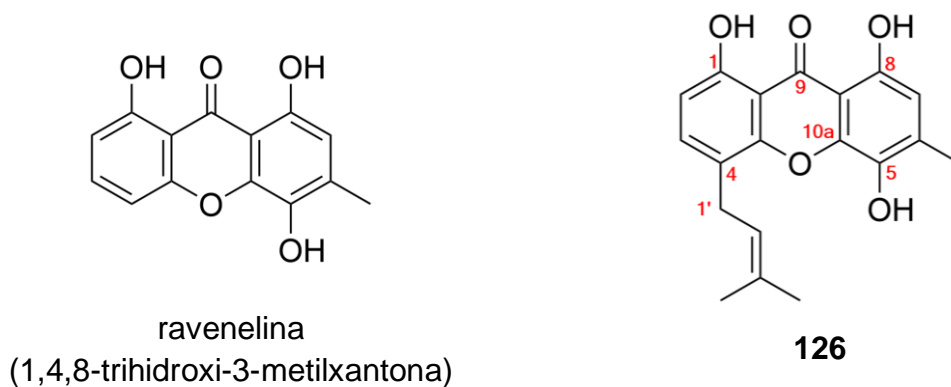
**Tabla 11.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (700 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) del compuesto **125** en  $\text{CDCl}_3$ .

posición	$\delta_{\text{C}}$	tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	162.9	C		
2	124.7	CH	7.14, dq (1.8, 0.9)	1,4,9a,11
3	148.4	C		
4	120.6	CH	7.65, dq (1.8, 0.9)	2,9a,10,11
4a	132.4	C		
5	122.0	CH	8.08, dd (7.7, 1.2)	6,7,10
6	136.0	CH	7.78, dd (8.0, 7.7)	5,8,10a
7	122.4	CH	7.70, dd (8.0, 1.2)	5,6,8,8a
8	158.1	C		
8a	121.5	C		
9	189.0	C		
9a	114.9	C		
10	182.4	C		
10a	135.5	C		
11	22.1	$\text{CH}_3$	2.48, s	2,3,4
1'	102.9	CH	5.85, d (4.4)	8,3',4'
2'	72.0	CH	4.56, m	4'
3'	71.4	CH	5.29, dd (7.0, 2.1)	1',4',5',6'
4'	85.4	CH	4.38, m	2'
5'	62.6	$\text{CH}_2$	3.91, m	3'
6'	170.8	C		
7'	21.0	$\text{CH}_3$	2.22, s	6'
1-OH			12.84, s	1,2,3,9a

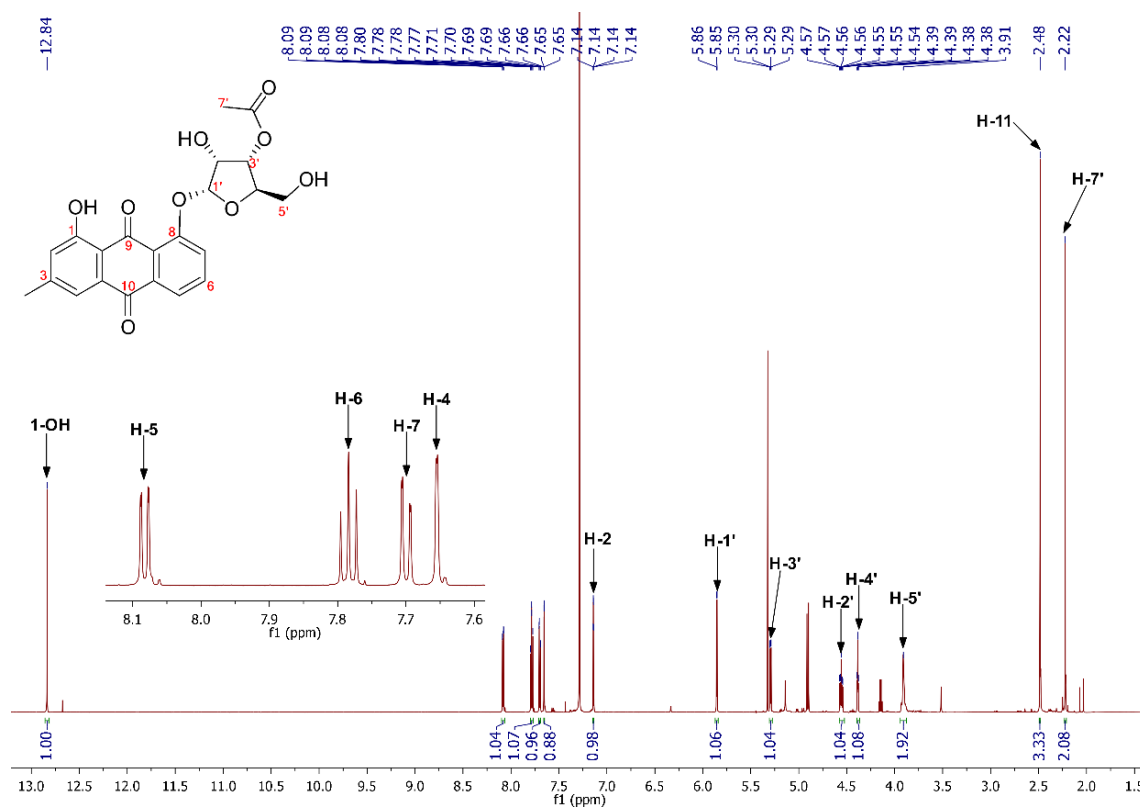
#### 5.4.5. Compuesto 126

El compuesto **126** se aisló como un sólido amarillo. Su fórmula molecular se determinó como  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$  con base en el ion molecular observado en el espectro de HRESIMS, indicando un IDH de 11. Los datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Tabla 12; Figuras 63 y 64**) fueron similares a la ravenelina (van Eijk et al., 1981) excepto por los siguientes cambios: la presencia de un grupo isopreno ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  C-1'/H-1', 28.5/3.53;

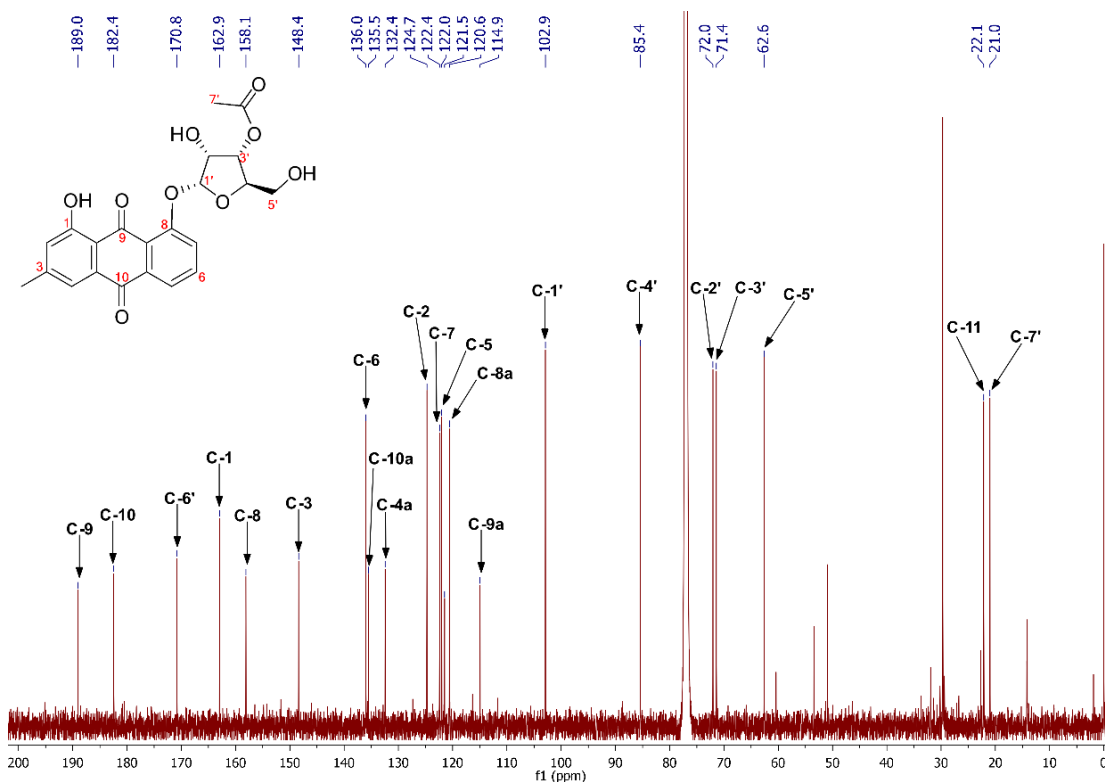
C-2'/H-2', 121.9/5.34; C-3', 133.5; C-4'/H<sub>3</sub>-4', 17.9/1.83; y C-5'/H<sub>3</sub>-5', 25.6/1.81) y dos protones aromáticos ( $\delta_c/\delta_H$  C-2/H-2, 110.7/6.73, y C-3/H-3, 137.7/7.48) con constantes de acoplamiento *orto* ( $J = 8.4$  Hz), en lugar del sistema 1,2,3-trisustituido observado en la ravenelina (**Figura 62**). La posición del grupo isopreno en C-4 ( $\delta_c$  119.0) fue confirmada mediante las correlaciones HMBC observadas entre H-1' y C-3/C-4/C-4a y entre H-2' y C-4. Con base en lo propuesto se asignó en nombre trivial de 4-isoprenilravenelina al compuesto **126**.



**Figura 62.** Estructura de la ravenelina comparada a la del compuesto **126**.



**Figura 63.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **126**.



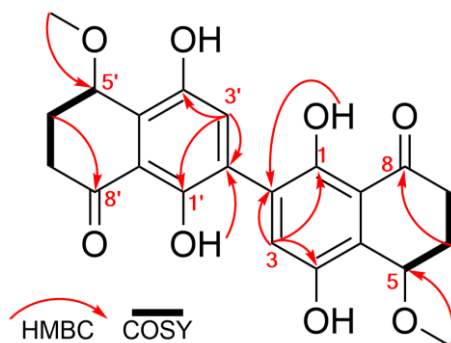
**Figura 64.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **126**.

**Tabla 12.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) del compuesto **126** en  $\text{CDCl}_3$ .

posición	$\delta_{\text{C}}$	tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ en Hz)	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	159.9	C		
2	110.7	CH	6.73, d (8.4)	1,4,9,9a
3	137.7	CH	7.48, d (8.4)	1, 1',4a,9a
4	119.0	C		
4a	153.0	C		
5	134.1	C		
6	135.4	C		
7	111.7	CH	6.64, s	5,8,8a,9,10a
8	153.1	C		
8a	105.8	C		
9	185.9	C		
9a	107.6	C		
10a	142.3	C		
11	16.7	$\text{CH}_3$	2.41, s	6,7
1'	28.5	$\text{CH}_2$	3.53, dd (6.8, 1.2)	3,3',4,4',4a,5'
2'	121.9	CH	5.34, m	4,4',5'
3'	133.5	C		
4'	17.9	$\text{CH}_3$	1.83, s	2',3',5'
5'	25.6	$\text{CH}_3$	1.81, s	2',3',4'
1-OH			11.85, s	1,2,9a
5-OH			5.15, s	5,6
8-OH			11.03, s	7,8,8a

#### 5.4.6. Compuesto 127

El compuesto **127** se aisló como un sólido amarillo, ópticamente inactivo y el DCE no mostró efectos Cotton, por lo que este compuesto se aisló como una mezcla racémica. La fórmula molecular se estableció como  $C_{22}H_{22}O_8$  (IDH = 12), de acuerdo a lo observado en el espectro HRESIMS ( $415.13951 m/z [M+H]^+$ ). El análisis detallado de los espectros  $^1H$  y  $^{13}C$  de RMN (**Tabla 13**; **Figuras 66** y **67**) indicó que este compuesto podría tratarse de un homodímero relacionado con la 5,8-dihidroxi-4-metoxi- $\alpha$ -tetralona (Machida et al., 2005). Las correlaciones HMBC observadas entre H-3 y C-1/C-2/C-4; 9-CH<sub>3</sub> y C-5; H-5 y C-4a/C-7/C-9; H-6 y C-4a/C-5/C-7/C-8; y entre H-7 y C-5/C-6/C-8, apoyan esta propuesta. Adicionalmente, las correlaciones HMBC entre 1-OH y C-1/C-2/C-8a; y 4-OH y C-3/C-4, confirmaron que las dos unidades estaban unidas a través de los carbonos C-2 y C-2'. La conformación del anillo de la ciclohexanona se estableció como una semisilla, con base en la correlación observada en el espectro NOESY entre H-5 y uno de los protones del metileno (H-7); las constantes de acoplamiento observadas en H-7 sugieren una orientación  $\alpha$ - o  $\beta$ -cuasi-axial con respecto al anillo de la ciclohexanona. Las correlaciones antes mencionadas aplican para cada una de los monómeros del homodímero. Cabe resaltar que los hidroxilos fenólicos no son equivalentes, probablemente debido a una barrera rotacional o a la presencia de atropoisomerismo. Previamente, los monómeros que conforman al compuesto **127** fueron obtenidos como una mezcla enantiomérica de la especie *Juglans mandshurica* Maxim. var. *sieboldiana* Makino (Juglandaceae); en la cual logran aislar ambos enantiómeros mediante CLAE quiral y su posterior caracterización estructural, incluyendo los valores de rotación óptica y de DCE. Sin embargo, la cantidad del compuesto **127** obtenida en este trabajo (0.8 mg) impidió la separación por ese medio.



**Figura 65.** Correlaciones HMBC selectas del compuesto **127**.



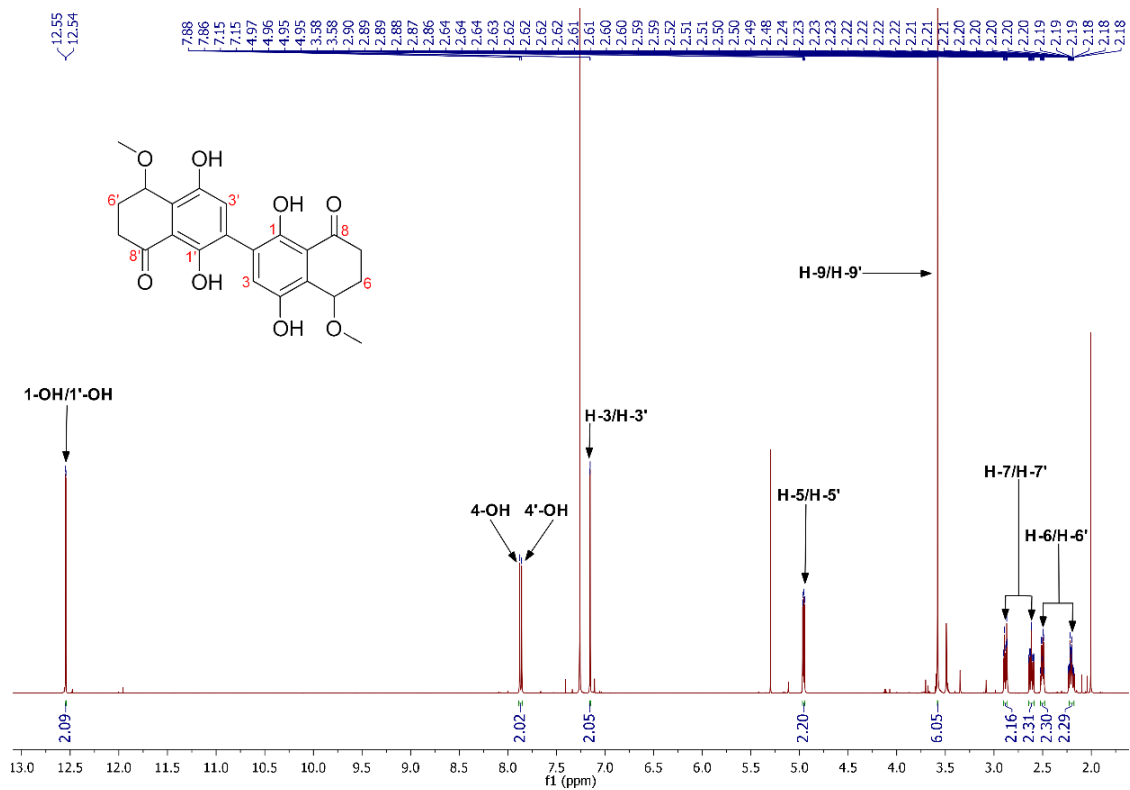


Figura 66. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 127.

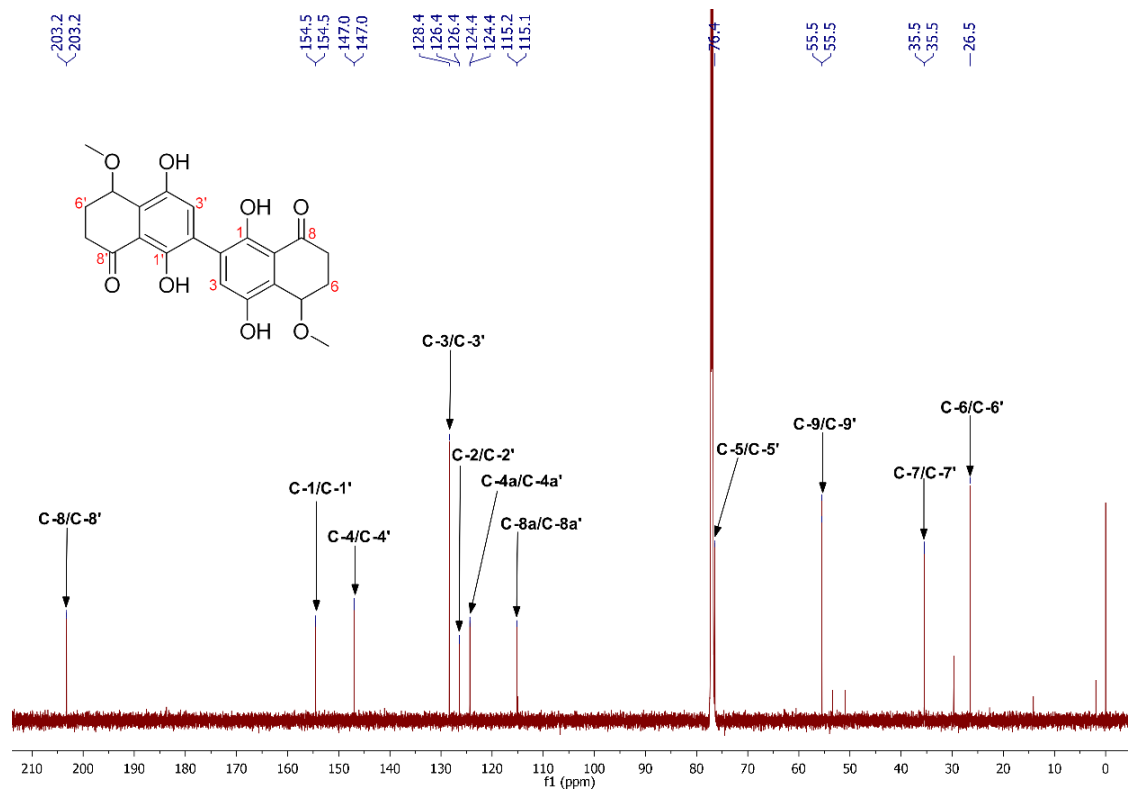


Figura 67. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 127.

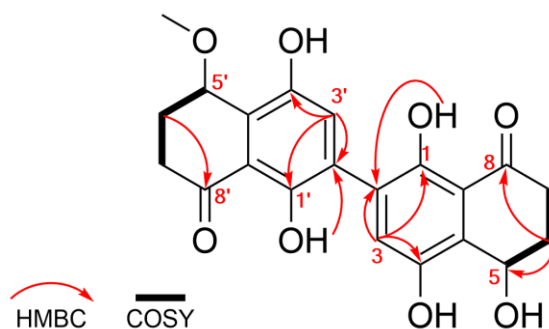
**Tabla 13.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (700 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de **127** en  $\text{CDCl}_3$ .

posición	$\delta_{\text{C}}$	tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ en Hz)	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	154.5	C		
2	126.4	C		
3	128.4	CH	7.15, s	1,2,2',4
4	147.0	C		
4a	124.4	C		
5	76.4	CH	4.96, dd (10.5, 4.9)	4a,7,9
6	26.5	CH <sub>2</sub>	2.51, dddd (13.3, 10.5, 4.9,1.0) 2.21, m	4a,5,7, 8 4a,5,7
7	35.5	CH <sub>2</sub>	2.89, ddd (17.5, 12.6, 4.2) 2.62, dddd (17.5, 12.6, 4.2, 1.0)	5,6,8 5,6,8
8	203.2	C		
8a	115.2	C		
9	55.5	CH <sub>3</sub>	3.58, s	5
1'	154.5	C		
2'	126.4	C		
3'	128.4	CH	7.15, s	1',2,2',4'
4'	147.0	C		
4a'	124.4	C		
5'	76.4	CH	4.96, dd (10.5, 4.9)	4a',7',9'
6'	26.5	CH <sub>2</sub>	2.51, ddd (13.3, 10.5, 4.9,1.0) 2.21, m	4a',5',7',8' 4a',5',7'
7'	35.5	CH <sub>2</sub>	2.89, ddd (17.5, 12.6, 4.2) 2.62, ddd (17.5, 12.6, 4.2, 1.0)	5',6',8' 5',6',8'
8'	203.2	C		
8a'	115.1	C		
9'	55.5	CH <sub>3</sub>	3.58, s	5'
1-OH			12.55, s	1,2,8a
4-OH			7.88, s	3,4
1'-OH			12.54, s	1',2',8a'
4'-OH			7.86, s	3',4'

### 5.4.7. Compuesto 128

El compuesto **128** se aisló como un sólido de color blanco. El análisis detallado de los espectros 1D y 2D RMN (**Tabla 14**; **Figuras 69** y **70**), indicó que este compuesto está relacionado al compuesto **127**. Las principales diferencias radican en la posición C-5 y C-5' del dímero, ya que en el compuesto **127** estos carbonos eran equivalentes ( $\delta_c$  76.4), en cambio, en **128** se observaron señales en  $\delta_c$  76.2 y  $\delta_c$  67.6 para los mismos carbonos. Adicionalmente, se observó el desplazamiento a campo bajo del metileno en  $\delta_c$  26.4 (C-6') a  $\delta_c$  31.6 (C-6) y del protón en  $\delta_H$  4.96 (H-5') a  $\delta_H$  5.30 (H-5). Estos desplazamientos concuerdan con los reportados previamente para los compuestos 5,8-dihidroxi-4-metoxi- $\alpha$ -tetralona (Machida et al., 2005) y 4,5,8-trihidroxi- $\alpha$ -tetralona (Liu et al., 2004), compuestos previamente aislados de *Juglans mandshurica*. Con base en lo anterior, se propuso la estructura del compuesto **128** como un heterodímero formado por los monómeros previamente reportados de *J. mandshurica*, los cuales están unidos a través de C-2/C-2' ( $\delta_c$  126.3/126.3). La conformación de los anillos de ciclohexanona se determinó como semisillas, con base en las constantes de acoplamiento observadas y los valores reportados previamente para este tipo de compuestos.

Como en el caso de **127**, no fue posible determinar la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en **128**, ya que solo se logró aislar 0.4 mg de este compuesto. Como se mencionó anteriormente, la 5,8-dihidroxi-4-metoxi- $\alpha$ -tetralona se ha aislado como una mezcla enantiomérica (Machida et al., 2005), en cambio, la 4,5,8-trihidroxi- $\alpha$ -tetralona se ha reportado únicamente como el enantiómero S (Liu et al., 2010; Liu et al., 2004). Por lo que cabe la posibilidad que el compuesto **128** se haya aislado como mezcla de los posibles diastereoisómeros (5*S*,5'*R* y 5*S*,5'*S*).



**Figura 68.** Correlaciones HMBC selectas del compuesto **127**

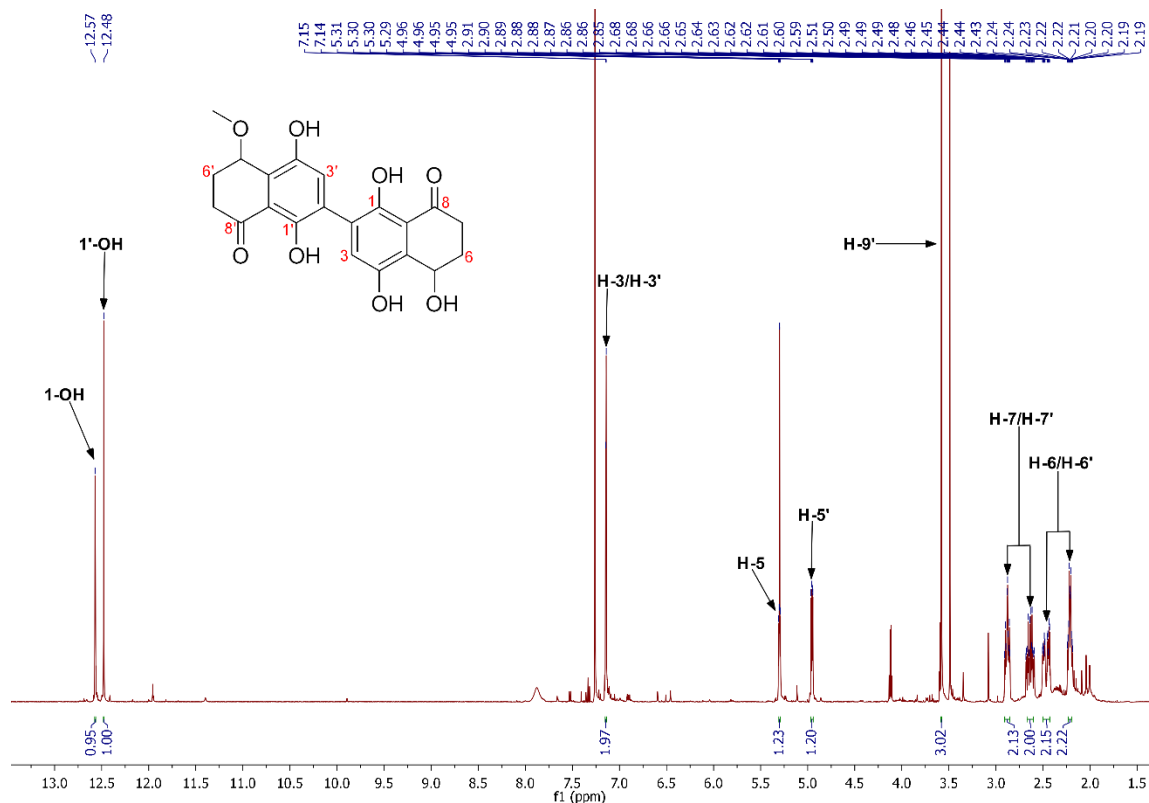


Figura 69. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 128.

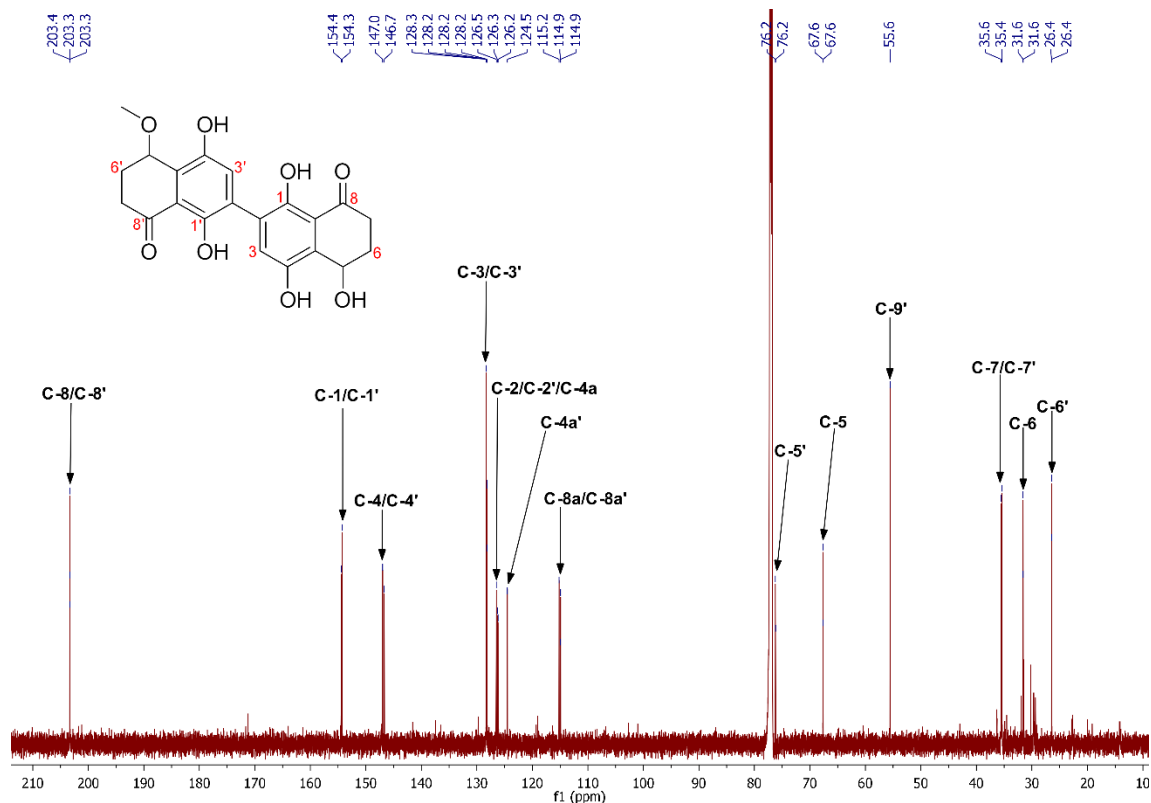


Figura 70. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 128.

**Tabla 14.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (700 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de **128** en  $\text{CDCl}_3$ .

posición	$\delta_{\text{C}}$	tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ en Hz)	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$
1	154.3	C		
2	126.3	C		
3	128.2	CH	7.15, s	1,2,2',4
4	146.7	C		
4a	126.2	C		
5	67.6	CH	5.30, dd (9.6, 4.6)	4a,7,9
6	31.6	$\text{CH}_2$	2.49, m	4a,5,7, 8
			2.21, ddd (16.6, 12.5, 3.9)	4a,5,7
7	35.4	$\text{CH}_2$	2.88, dddd (17.9, 12.6, 9.8, 4.6)	5,8
			2.64, dddd (17.1, 12.1, 4.6, 1.0)	5,8
8	203.4	C		
8a	114.9	C		
1'	154.4	C		
2'	126.5	C		
3'	128.3	CH	7.14, s	1',2,2',4'
4'	147.0	C		
4a'	124.5	C		
5'	76.2	CH	4.96, dd (9.5, 4.4)	4a',7',9'
			2.51, m	4a',5',7',8'
6'	26.4	$\text{CH}_2$	2.21, ddd (16.6, 12.5, 3.9)	4a',5',7'
			2.88, dddd (17.9, 12.6, 9.8, 4.6)	5',8'
7'	35.6	$\text{CH}_2$	2.64, dddd (17.1, 12.1, 4.6, 1.0)	5',8'
8'	203.3	C		
8a'	115.2	C		
9'	55.6	$\text{CH}_3$	3.58, s	5'
1-OH			12.57, s	1,2,8a
1'-OH			12.48, s	1',2',8a'

#### 5.4.8. Compuestos previamente reportados

Los compuestos conocidos como amauromina (**72**), malbranqueamida (**89**), arugosina N (**129**), 1,6,10-trihidroxi-8-metil-2-(3-metil-2-butenil)dibenz[*b,e*]oxepin-11(6*H*)-ona (**130**) y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -trihidroxi-(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-dien-6-ona (**131**), se identificaron mediante comparación de los espectros de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y de espectrometría de masas obtenidos (**Figuras A63–A66**) con los reportados en la literatura, siendo idénticos en todos los casos. Cabe señalar que es la primera vez que se reportan estos metabolitos en esta especie.

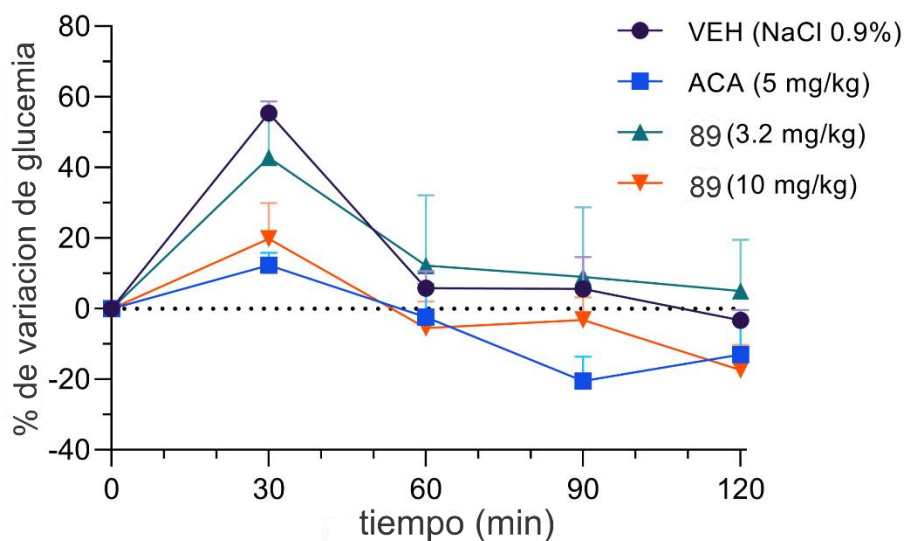
### 5.5. Ensayos biológicos

#### 5.5.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa

Se determinó el efecto inhibitorio del extracto y de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y PTP-1B humana mediante un ensayo enzimático *in vitro*. La fracción de MeCN-MeOH mostró actividad significativa sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y PTP-1B con una concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de 360.7  $\pm$  0.2  $\mu$ g/mL y 5.3  $\pm$  0.3  $\mu$ g/mL, respectivamente.

Los compuestos **120–122**, **127**, amauromina (**72**) y malbranqueamida (**89**) fueron los que presentaron actividad inhibitoria significativa frente a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura con valores de CI<sub>50</sub> de 116.8  $\pm$  7.2, 144.5  $\pm$  4.9, 261.3  $\pm$  7.8, 288.1  $\pm$  16.5, 57.4  $\pm$  0.2 y 71.3  $\pm$  0.7  $\mu$ M, respectivamente; los valores obtenidos se compararon con el control positivo de acarbosa (585.8  $\pm$  0.1  $\mu$ M) (**Tabla 15**). Los compuestos más activos, **72** y **89**, se evaluaron frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de mamífero (intestino de rata). Las CI<sub>50</sub> calculadas fueron de 742.6  $\pm$  7.3 y 485.7  $\pm$  6.6  $\mu$ M, respectivamente; los compuestos presentaron poca actividad comparadas con el control positivo de acarbosa (CI<sub>50</sub> 151.1  $\pm$  6.1  $\mu$ M).

El efecto de la malbranqueamida se corroboró *in vivo* mediante una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones normoglucémicos, utilizando dosis de 3.2 y 10.0 mg/kg. Como se puede observar en la **Figura 71**, la malbranqueamida (**89**) a la dosis de 10.0 mg/kg reduce el pico posprandial de forma similar a la acarbosa (control positivo).



**Figura 71.** Curva de tolerancia oral a la sacarosa de la malbranqueamida (**89**).

**Tabla 15.** Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ( $\alpha$ GHY).

Compuesto	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	$\alpha$ GHY
<b>120</b>	116.8 $\pm$ 7.2
<b>121</b>	144.5 $\pm$ 14.9
<b>122</b>	261.3 $\pm$ 7.8
<b>123</b>	1428.8 $\pm$ 47.3
<b>124</b>	> 3 mM
<b>125</b>	766.9 $\pm$ 15.7
<b>126</b>	> 3 mM
<b>127</b>	288.1 $\pm$ 16.5
<b>128</b>	N/E
<b>72</b>	57.4 $\pm$ 0.2
<b>89</b>	71.3 $\pm$ 0.7
<b>129 y 130</b>	> 3 mM
<b>131</b>	N/E
<b>acarbosa<sup>a</sup></b>	585.8 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup>Control positivo para la  $\alpha$ GHY.

N/E no evaluado

### 5.5.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B humana

La fracción de MeCN/MeOH mostró actividad importante sobre la PTP-1B con una  $CI_{50}$  de  $5.3 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ , pero los compuestos aislados (**72, 89, 120–130**) mostraron actividad moderada inhibiendo esta enzima (**Tabla 16**). Los compuestos más activos fueron **127, 126, 89, 72** y **120** con valores de  $CI_{50}$  de  $10.9 \pm 0.6$ ,  $13.9 \pm 1.3$ ,  $14.5 \pm 1.5$ ,  $15.3 \pm 0.4$  y  $17.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ , respectivamente. En este ensayo se utilizó ácido ursólico como control positivo ( $CI_{50} = 27.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ).

**Tabla 16.** Resultados obtenidos de la evaluación del potencial inhibitorio sobre la PTP-1B.

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
	PTP-1B
<b>120</b>	$17.3 \pm 0.9$
<b>121</b>	$106.2 \pm 1.6$
<b>122</b>	$39.6 \pm 1.9$
<b>123</b>	$27.9 \pm 0.7$
<b>124</b>	$92.5 \pm 2.6$
<b>125</b>	$25.5 \pm 1.4$
<b>126</b>	$13.9 \pm 1.3$
<b>127</b>	$10.9 \pm 0.6$
<b>128</b>	N/E
<b>72</b>	$15.3 \pm 0.4$
<b>89</b>	$14.5 \pm 1.5$
<b>129 y 130</b>	$30.3 \pm 1.2$
<b>131</b>	N/E
<b>ácido ursólico<sup>a</sup></b>	$27.8 \pm 0.1$

<sup>a</sup>Control positivo para la PTP-1B.

N/E no evaluado



## 5.6. Estudios de Acoplamiento Molecular

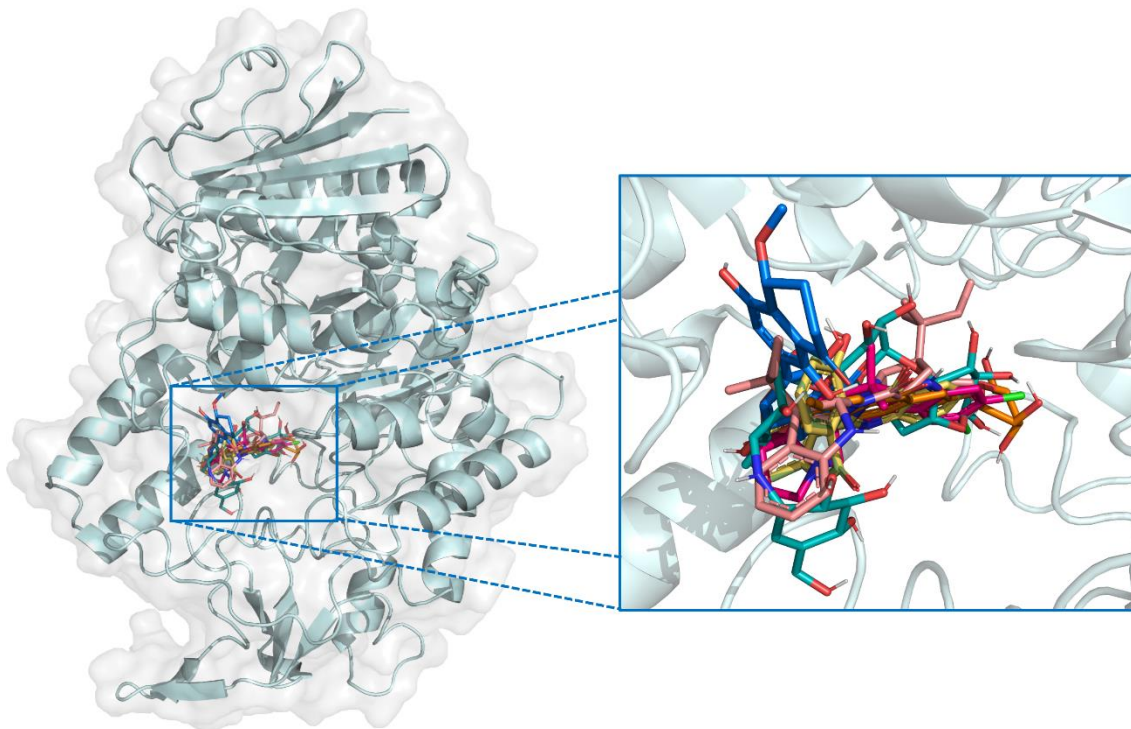
### 5.6.1. Enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura

Con la finalidad de predecir el sitio de unión de los compuestos que presentaron mayor actividad frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura, se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular utilizando la estructura obtenida por difracción de rayos X de la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (PDB 3A4A), ya que esta fue la enzima utilizada en la evaluación biológica. La estructura y características principales de esta enzima se mencionan en la **Sección 5.3.1** y esquematizan en la **Figura 26**. El protocolo utilizado se validó reproduciendo el modo de unión de la glucosa en el sitio catalítico (RMSD = 0.93 Å), para posteriormente modelar a los compuestos inhibidores. Adicionalmente, se modeló el modo de unión del control positivo, la acarbosa (**Figuras 85 y 86**). Los resultados predijeron que los compuestos **72, 89, 120–122 y 127**, al igual que el control positivo (acarbosa), se unen al sitio catalítico de la enzima (**Figuras 72–86**).

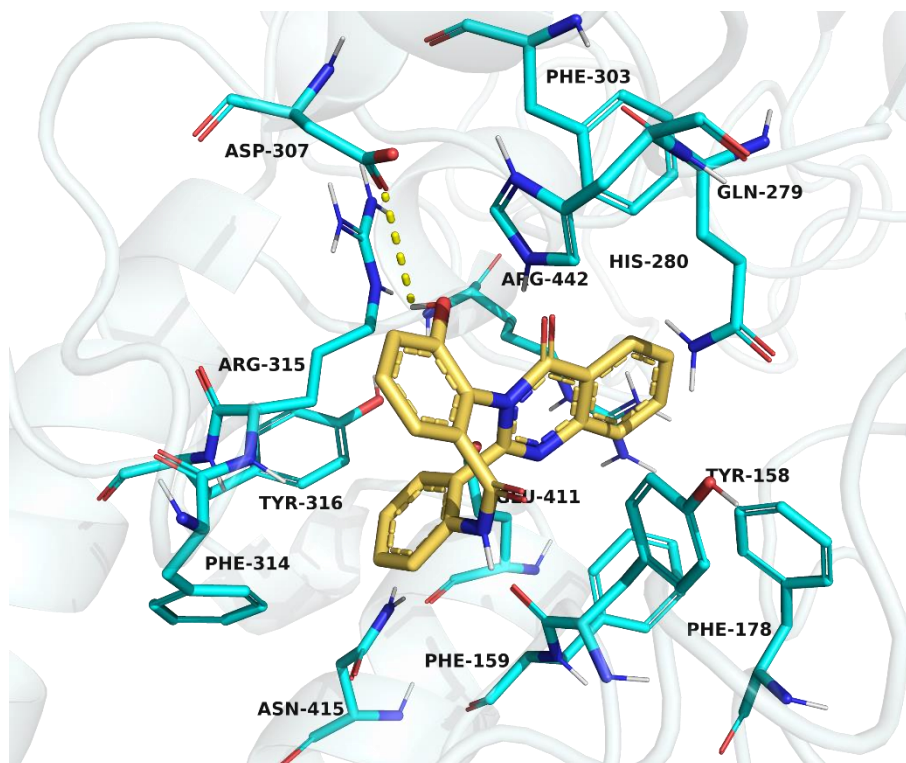
Los compuestos **120 y 121** se unieron de manera similar en el sitio catalítico, las principales interacciones son fueron con el asa 310-315, Tyr158, His280 y Arg442. Adicionalmente, el compuesto **120** forma un enlace de hidrogeno entre el hidroxilo fenólico en C-15 y Asp307. El compuesto **122** presentó interacciones principalmente polares, las más importantes con los residuos catalíticos Asp215 y Asp352 y los residuos Asp69, His280, His351, Asp446 y Arg442; así como cinco enlaces de hidrogeno uno de ellos con el residuo catalítico Glu277. En el compuesto **127** se observaron interacciones con al asa 310-315 y los residuos Tyr158 e His280 y formó tres enlaces de hidrógeno. En el caso de la amauromina (**72**) se observaron diversas interacciones como apilamiento de anillos ( $\pi$ - $\pi$ ),  $\pi$ -catión y de tipo polar, siendo estas las predominantes; entre las polares, resaltan las formadas con los residuos catalíticos Glu277 y Asp352. Finalmente, la malbranqueamida (**89**) mostró interacciones con los residuos catalíticos Asp215, Glu277 y Asp352, y con los residuos Asp69, His280 y Arg442, los cuales son relevantes en el reconocimiento de los sustratos de esta enzima. Además, se observó la formación de un enlace de hidrogeno con Arg315 y se identificó un apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo indólico de la malbranqueamida y el residuo de Tyr158. Las interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura se muestran en detalle en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Principales interacciones entre los metabolitos evaluados y la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de lavadura.

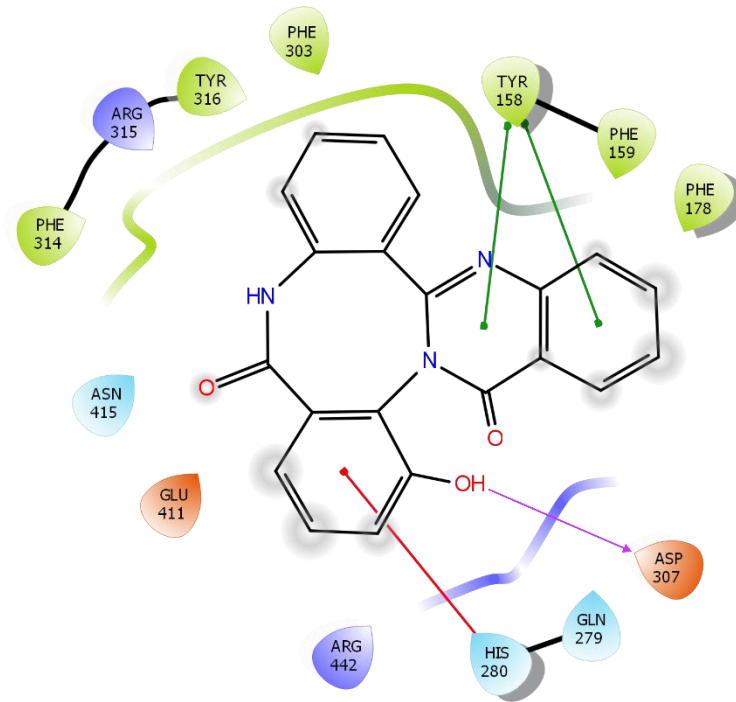
Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación	Apilamiento de anillos
120	-10.6	Gln279,His280, Arg315,Asp307, Glu411,Asn415, Arg442	Tyr158,Phe159, Phe178,Phe303, Phe314,Tyr316	Asp307	His280	Tyr316
121	-10.8	Gln279, His280, Arg315,Asp307, Glu411,Asn415, Arg442	Tyr158,Phe159, Phe178,Phe303, Phe314,Tyr316		His280	Tyr316
122	-10.3	Asp69,His112, Arg213,Asp215, Glu277,Gln279, His280,Arg315, His351,Asp352, Glu411,Arg442, Arg446	Tyr72, Tyr158, Phe159,Phe178, Val216, Phe303	Gln277, Glu279, Glu411, Arg442, Arg446	Arg315	Tyr158
127	-9.4	His280,Asp307, Thr310,Ser311, Arg315,Glu411, Asn415	Tyr158,Pro312, Leu313,Phe314, Tyr316	Asp307, Thr310, Arg315		
72	-8.9	Lys156,Ser157, Ser240,Asp242, Glu277,Gln279, His280,Asn302, Thr306,Asp307, Ser311,Arg315, Asn350,Asp352, Gln353, Glu411, Arg442	Tyr158,Phe159, Gly160,Phe303, Pro312,Leu313, Tyr347,	His280, Glu411	His280	Phe303
89	-10.9	Asp69, Arg213, Asp215,Glu277, Gln279,His280, Arg315,Asp352, Glu411,Asn415, Arg442,	Tyr158,Phe159, Phe178,Val216, Phe303,Phe314, Tyr316	Arg315,		Tyr158
Acarbosa (7)	-9.9	Ser240,Asp242, Gln279,His280, Asn302,Ser304, His305,Thr306, Asp307,Thr310, Ser311,Arg315	Val232,Phe301, Phe303,Val308, Pro312,Leu313, Phe314	His280, Ser304, Thr310		



**Figura 72.** Posible modo de unión del compuesto **72** (rosa), **89** (rojo), **120** (amarillo), **121** (verde), **122** (naranja), **127** (azul) y acarbosa (**7**; turquesa) con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura ( $\alpha$ GHY; cian, PDB 3A4A).

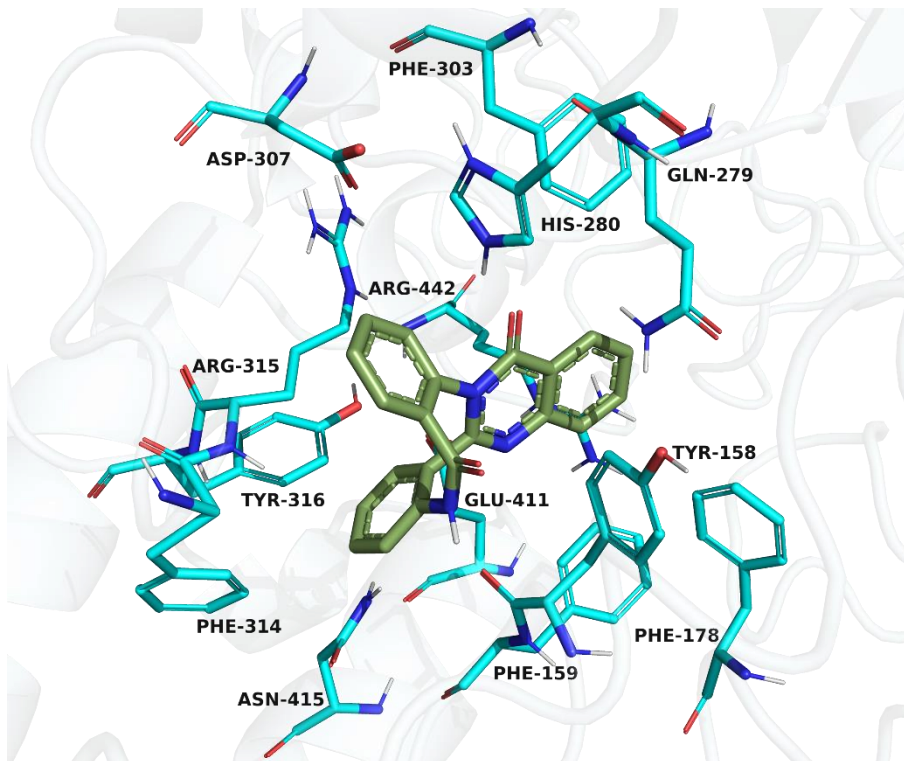


**Figura 73.** Representación en 3D del modo de unión de **120** con la  $\alpha$ GHY.

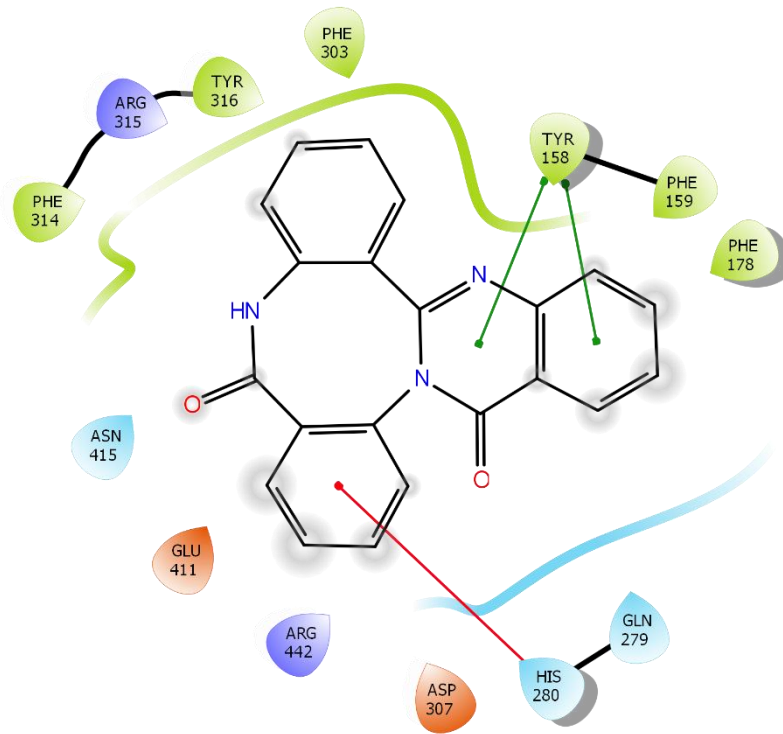


- Cargados (negativos)
- Glicina
- Polares
- Apilamiento  $\pi$ - $\pi$
- Cargados (positivos)
- Hidrofóbicos
- ▶— Enlace-H
- $\pi$ -catión

**Figura 74.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **120** con la  $\alpha$ GHY.

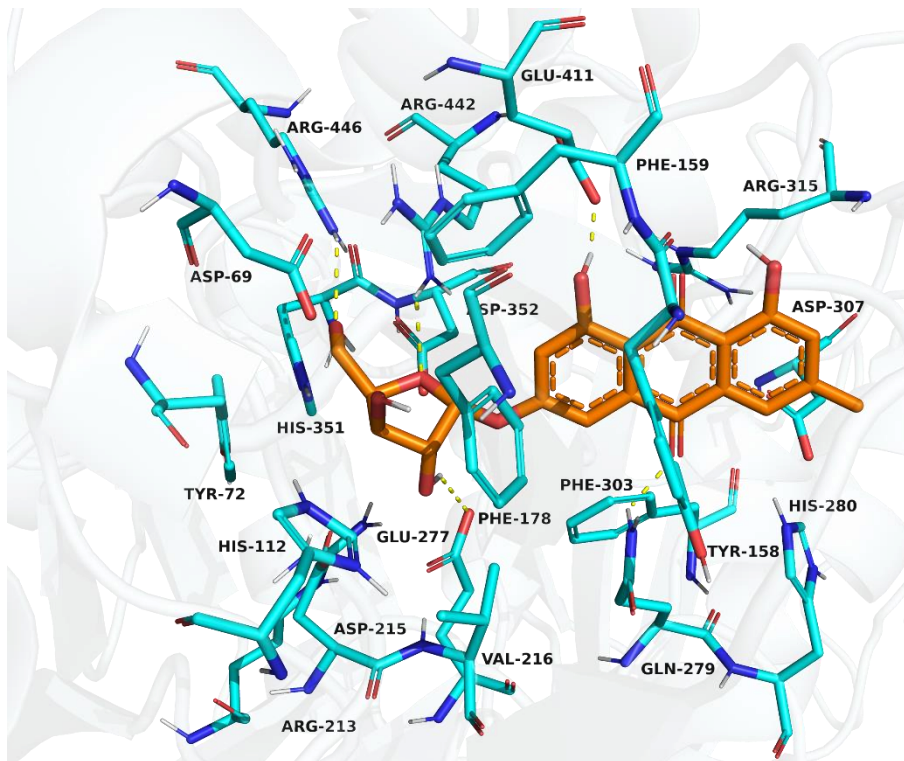


**Figura 75.** Representación en 3D del modo de unión de **121** con la  $\alpha$ GHY.

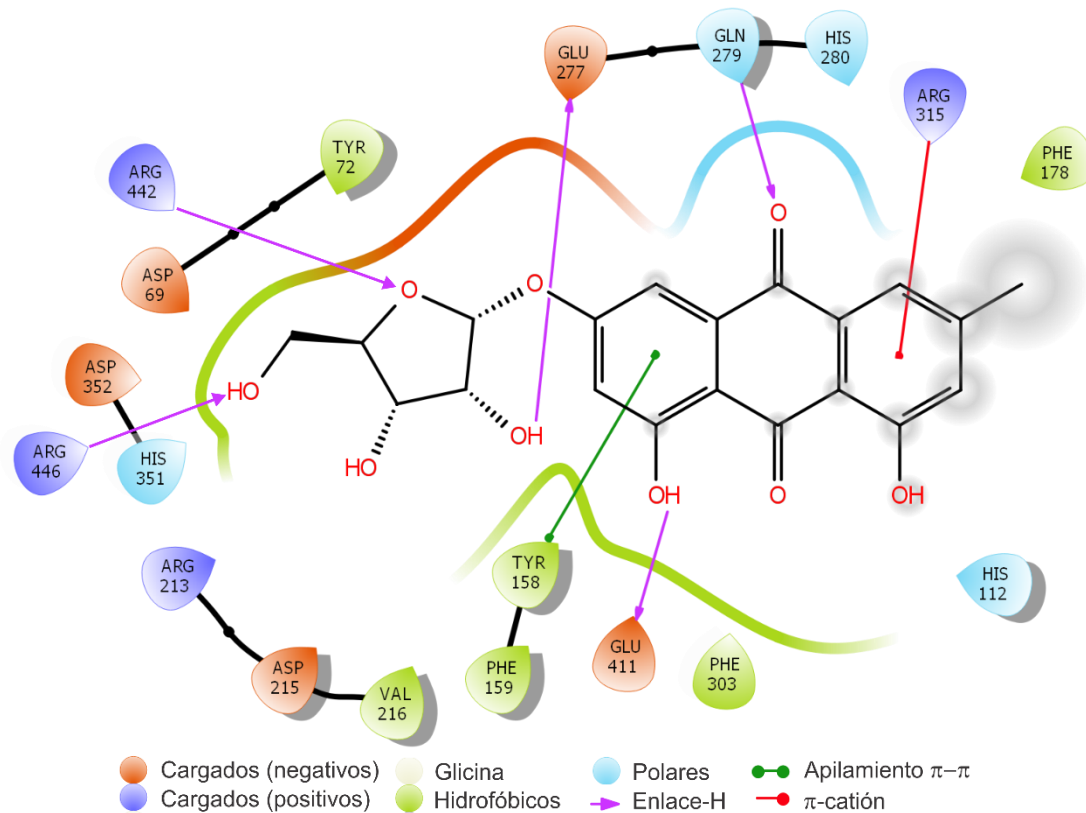


- Cargados (negativos)
- Glicina
- Polares
- Apilamiento  $\pi$ - $\pi$
- Cargados (positivos)
- Hidrofóbicos
- ▶ Enlace-H
- $\pi$ -catión

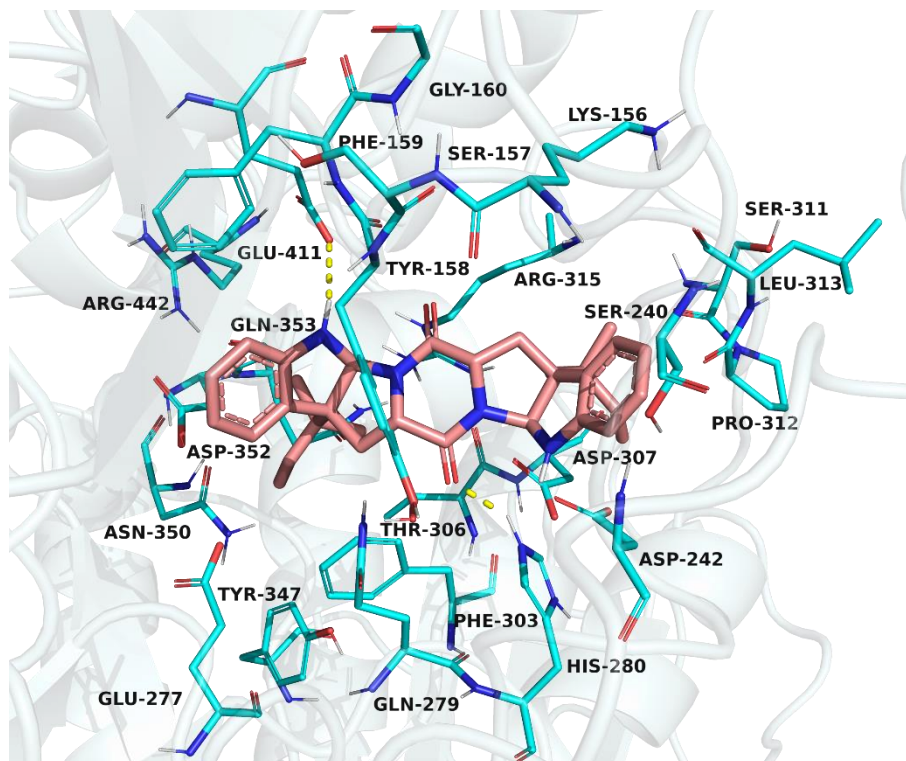
**Figura 76.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **121** con la  $\alpha$ GHY.



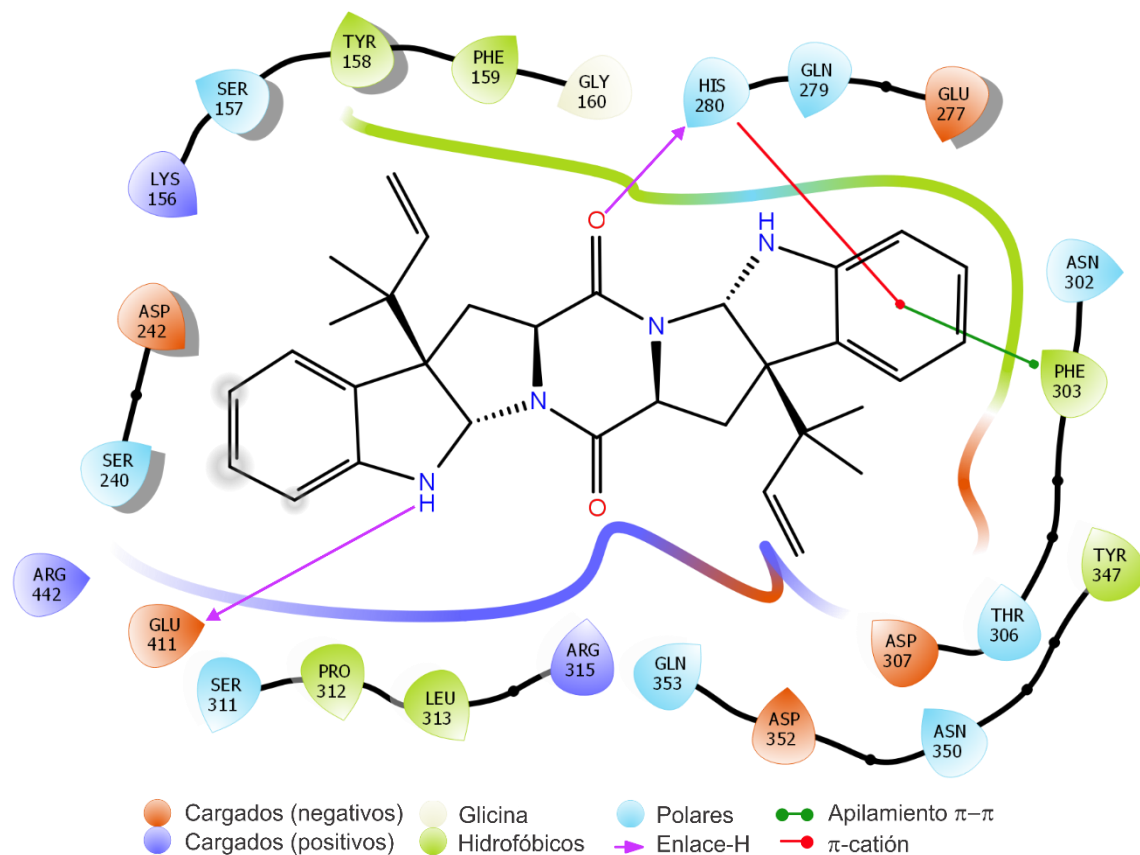
**Figura 77.** Representación en 3D del modo de unión de **122** con la  $\alpha$ GHY.



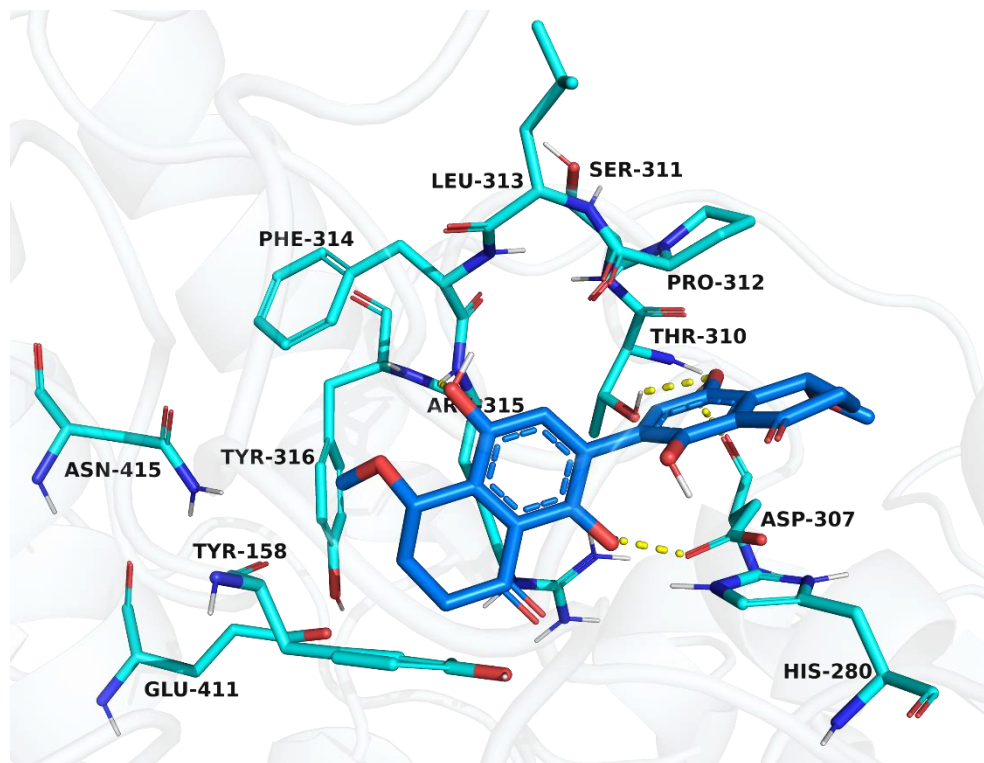
**Figura 78.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **122** con la  $\alpha$ GHY.



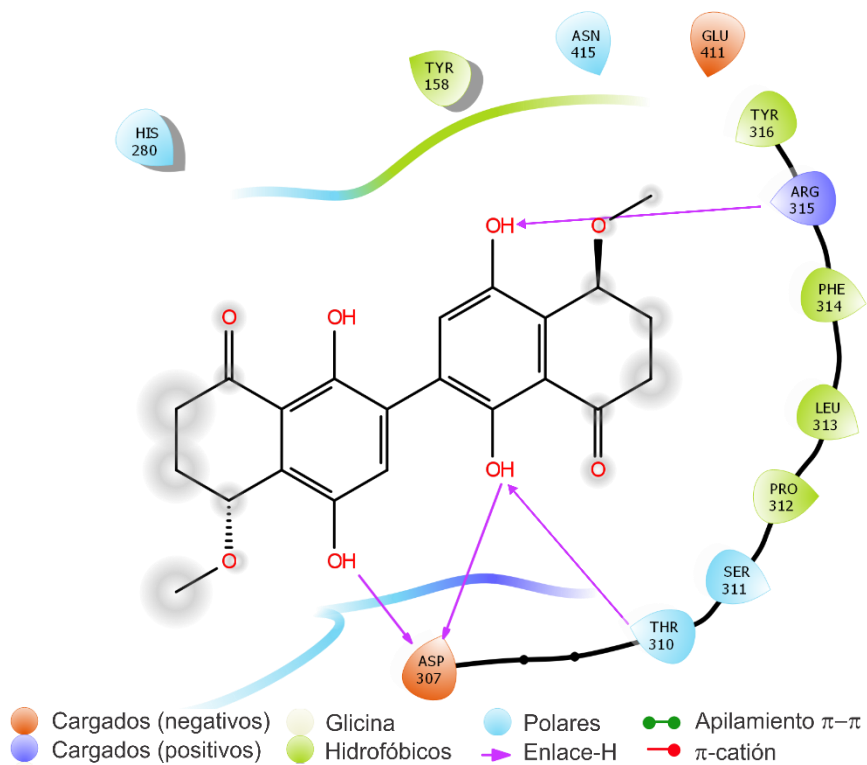
**Figura 79.** Representación en 3D del modo de unión de la amauromina (**72**) con la  $\alpha$ GHY.



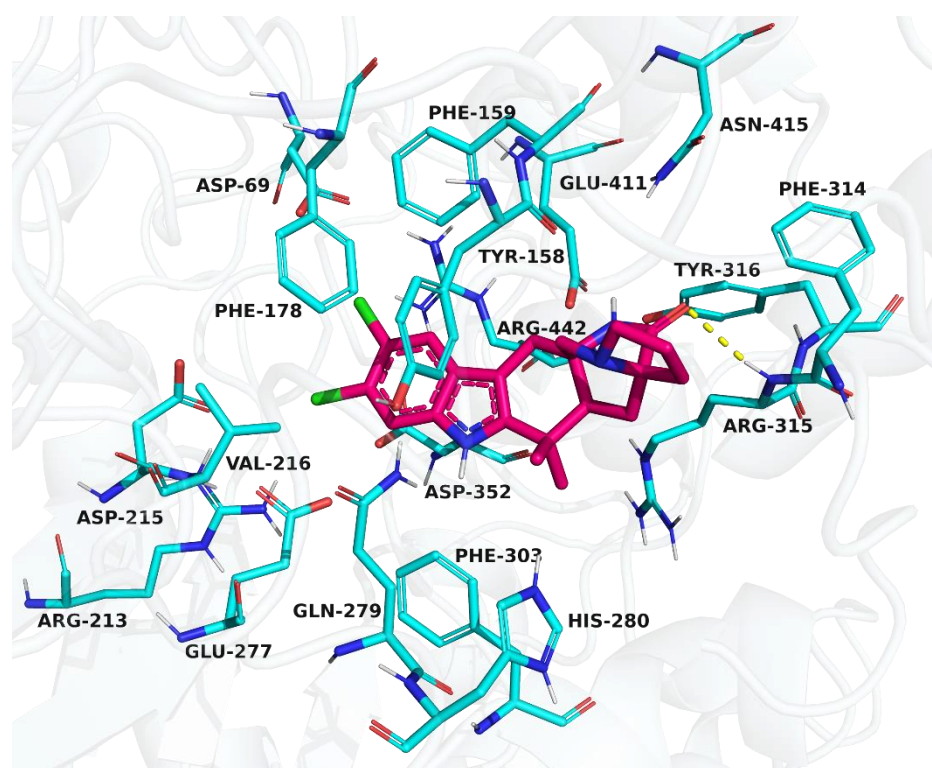
**Figura 80.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la amauromina (72) con la  $\alpha$ GHY.



**Figura 81.** Representación en 3D del modo de unión de 127 con la  $\alpha$ GHY.

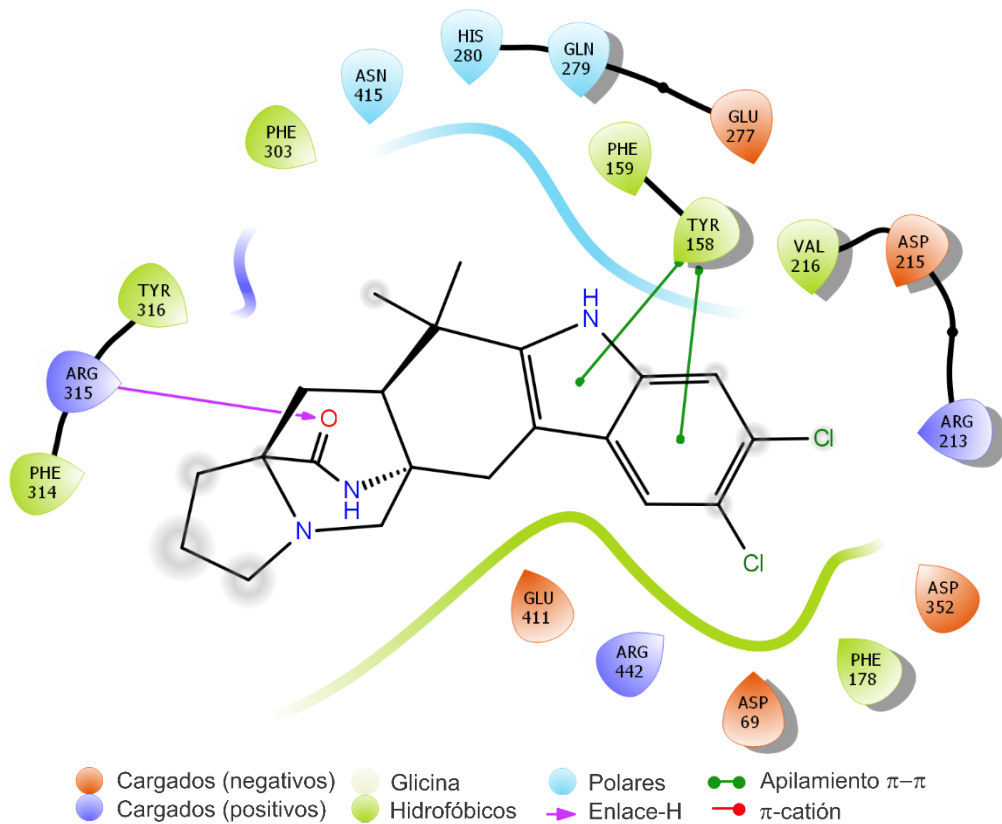


**Figura 82.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **127** con la  $\alpha$ GHY.

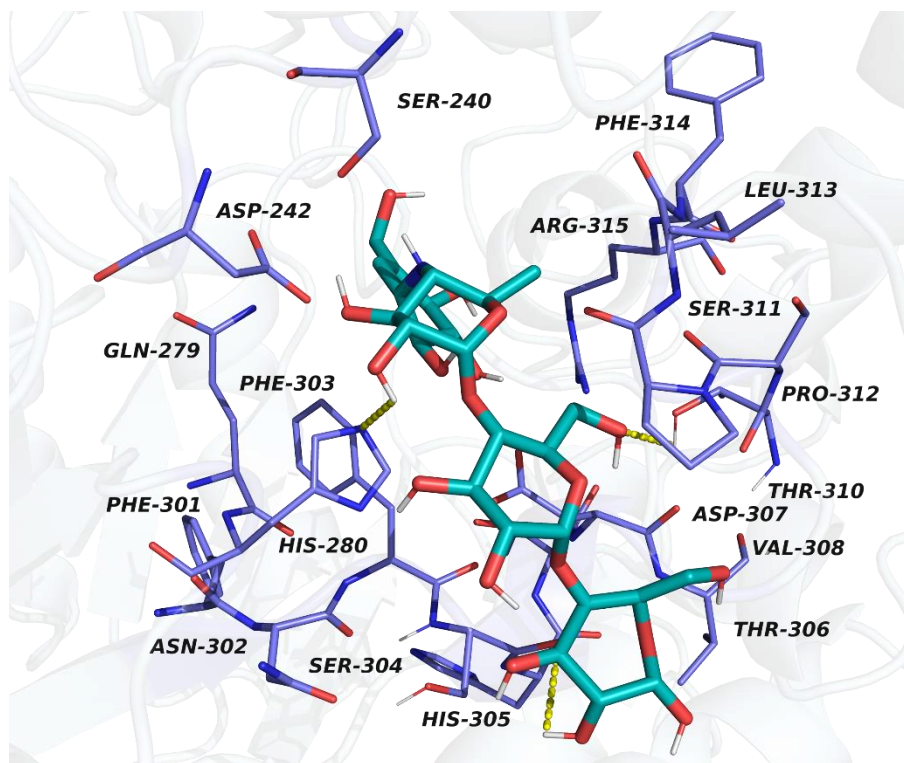


**Figura 83.** Representación en 3D del modo de unión de la malbranqueamida (**89**) con la  $\alpha$ GHY.

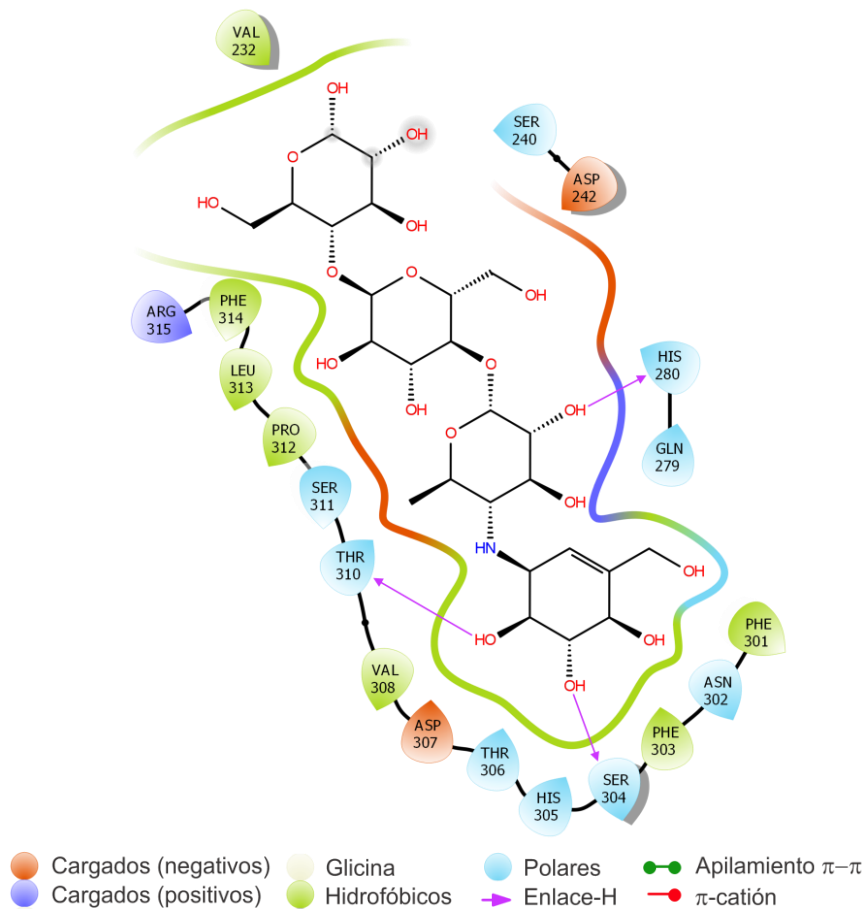




**Figura 84.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la malbranqueamida (**89**) con la  $\alpha$ GHY.



**Figura 85.** Representación en 3D del modo de unión de la acarbosa con la  $\alpha$ GHY.



**Figura 86.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con la  $\alpha$ GHY.

### 5.6.2. Enzimas $\alpha$ -glucosidasas humanas

Para complementar lo observado en las evaluaciones biológicas y brindar información adicional de los compuestos que presentaron mayor actividad frente a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (**72**, **89** y **120**), se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular con las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa de humano utilizando estructuras del dominio *N*-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana (*nt*-SI: código PDB 3LPP) y los dominios *N*- y *C*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (*nt*-MGAM PDB 2QMJ y *ct*-MGAM PDB 3TOP, respectivamente). Estas enzimas (PDB 3LPP, 2QMJ y 3TOP) se describen a detalle en el **Anexo 3**.

Los resultados obtenidos para los compuestos **72**, **89** y **120**, indicaron que estos compuestos se unen en los sitios catalíticos de los dominios *N*- y *C*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana. En el caso del dominio *nt*-MGAM los compuestos **72**, **89** y **120** presentaron una energía de unión de -6.9, -8.1 y -8.2 kcal/mol, respectivamente; en comparación, la acarbosa mostró una energía de unión de -7.4 kcal/mol, por lo que los compuestos **89** y **120** serían más afines a la enzima que la acarbosa (**Figuras B13–B15; Tabla B4**). Los compuestos **72**, **89** y **120** mostraron una energía de unión de -7.9, -9.9 y -8.4 kcal/mol, respectivamente, en el dominio *ct*-MGAM; mientras que para la acarbosa fue de -7.8 kcal/mol (**Figuras B16–B18; Tabla B5**). De igual manera, **72**, **89** y **120** se unieron al sitio catalítico del dominio *nt*-SI con una energía de unión de -7.3, -7.1 y -9.0 kcal/mol, respectivamente (**Figuras B19–B21; Tabla B6**), el cual corresponde también al sitio de unión del kotanolol (-6.1 kcal/mol), compuesto utilizado como inhibidor de esta enzima.

Los resultados obtenidos indican que la amauromina (**72**), la malbranqueamida (**89**) y el compuesto **120**, podrían mostrar actividad inhibitoria frente a las  $\alpha$ -glucosidasas humanas, ya que presentaron en la mayoría de los casos mejores energías de unión que las observadas para sus respectivos inhibidores; por lo que podrían representar nuevos inhibidores de dichas enzimas.

### 5.6.3. Proteína tirosina fosfatasa 1B humana

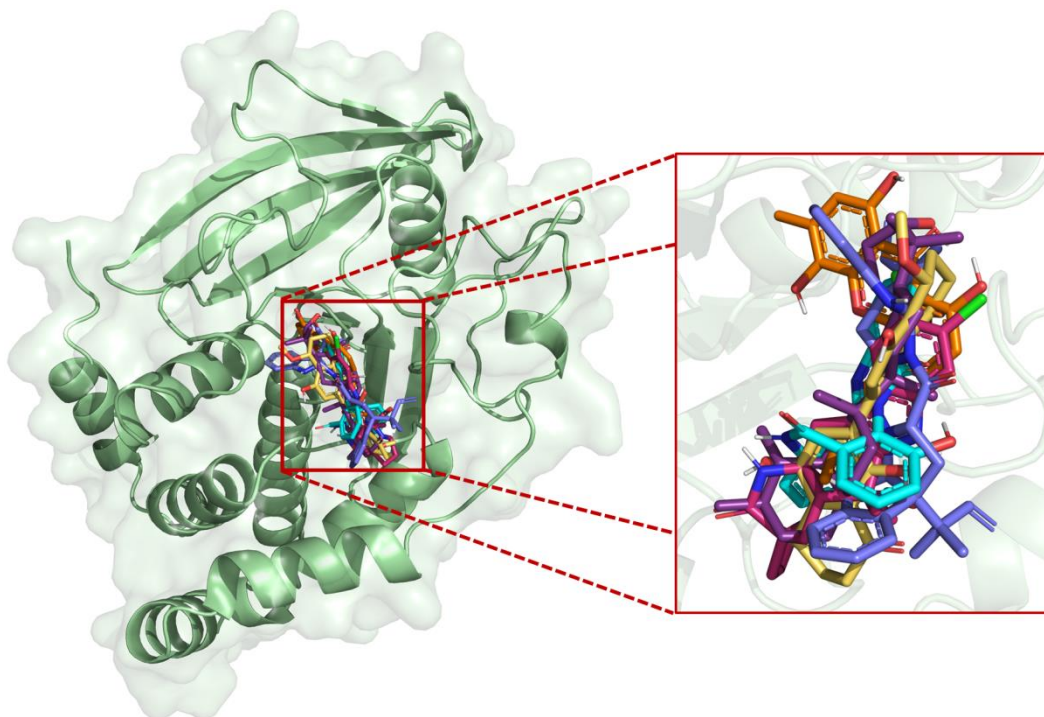
Con el mismo propósito de predecir el posible sitio de unión de los compuestos inhibidores de la PTP-1B, se llevó a cabo el análisis de acoplamiento molecular para los compuestos **72**, **89**, **120**, **126** y **127**, en este caso se utilizó la estructura de la PTP-1B de *Homo sapiens* obtenida por difracción de rayos X (PDB 1SUG). Para validar el modelo, se emuló la interacción del ácido ursólico con la PTP-1B (RMSD = 1.02 Å). Posteriormente, se modelaron los compuestos que presentaron la mejor actividad. Los resultados indicaron que los inhibidores modelados se unen al sitio B (**Figura 93**). Las características estructurales de la PTP-1B se detallan en la **Sección 5.3.3** y la **Figura 36**.

Todos los compuestos modelados presentan interacciones con los residuos característicos del sitio de unión B, como lo son Arg24, Arg254, Met258 y Gln262, siendo estos los más importantes. Además de los mencionados anteriormente, los residuos más comunes que se encontraron fueron con Tyr20, Asp48, Val49, Phe182, Ile219 y Gly259.

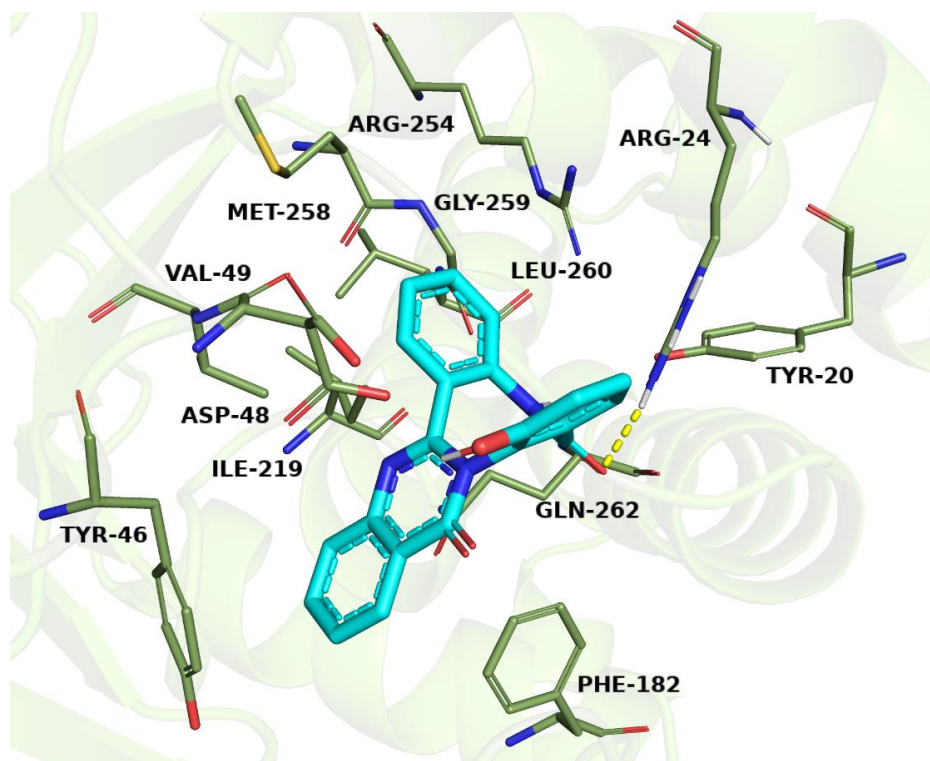
La tendencia actual de buscar inhibidores de la PTP-1B en sitios de unión alostéricos con alta afinidad, se basa en que estos proporcionan mayor especificidad y menor posibilidad de generar efectos adversos, por lo que la presencia de compuestos que se unen al sitio B representa una estrategia novedosa para la búsqueda de nuevos inhibidores de esta enzima.

**Tabla 18.** Principales interacciones entre los metabolitos evaluados y la enzima PTP-1B.

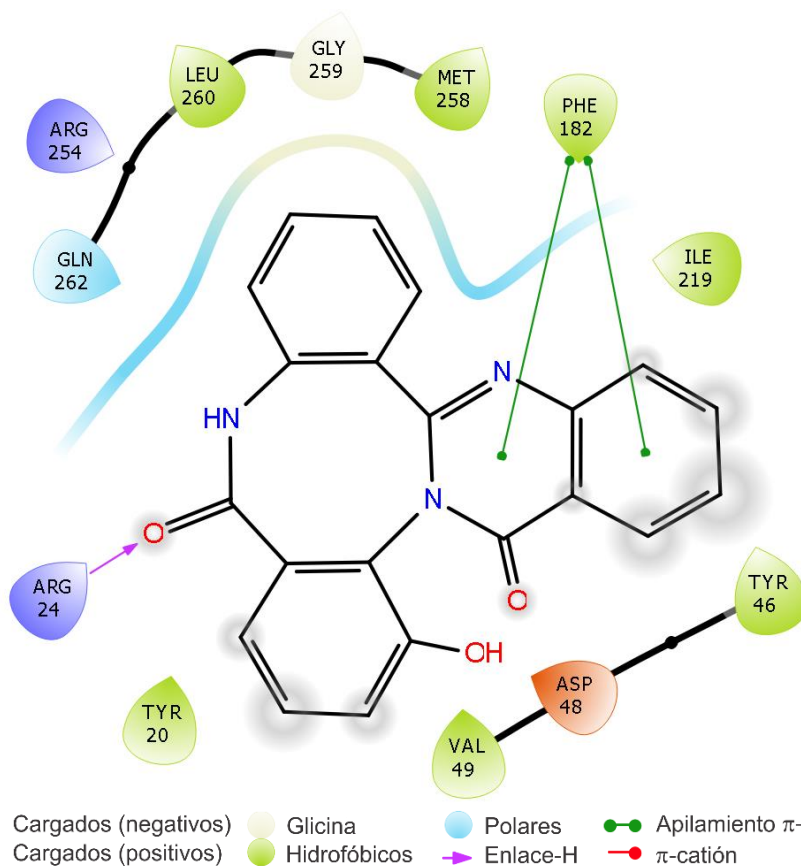
Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación	Apilamiento de anillos
120	-6.3	Arg24,asp48, Arg254,gln262	Tyr20,tyr46, Val49,phe182, Ile219,met258, Gly259,leu260	Arg24		Phe182
126	-6.0	Arg45,Asp48, Lys116,Lys120, Asp181,Ser216, Arg221,Gln262	Tyr46,Val49, Phe182,Ala217			
127	-7.3	Arg24,Asp48, Arg254,Gln262	Tyr20,Tyr46, Val49.Phe182, Ile219,Gly259	Asp48		
72	-6.4	Arg24,Arg47, Asp48,Lys116, Lys120,Asp181, Ser216,Gln262	Tyr46,Val49 Phe182,Ala217, Ile219	Gln262	Lys120	Phe182
89	-6.9	Arg24,Asp48, Ser50,Gln262, Thr263	Tyr20,Val49, Phe182,Ile219, Met258,Gly259			
ácido ursólico	-6.1	Gln21,Arg24, Arg45,Arg47, Asp48,Lys120, Ser216,Arg254, Gln262,Thr263	Tyr20,Tyr46, Val49,Phe182, Ala217,Ile219, Gly259			



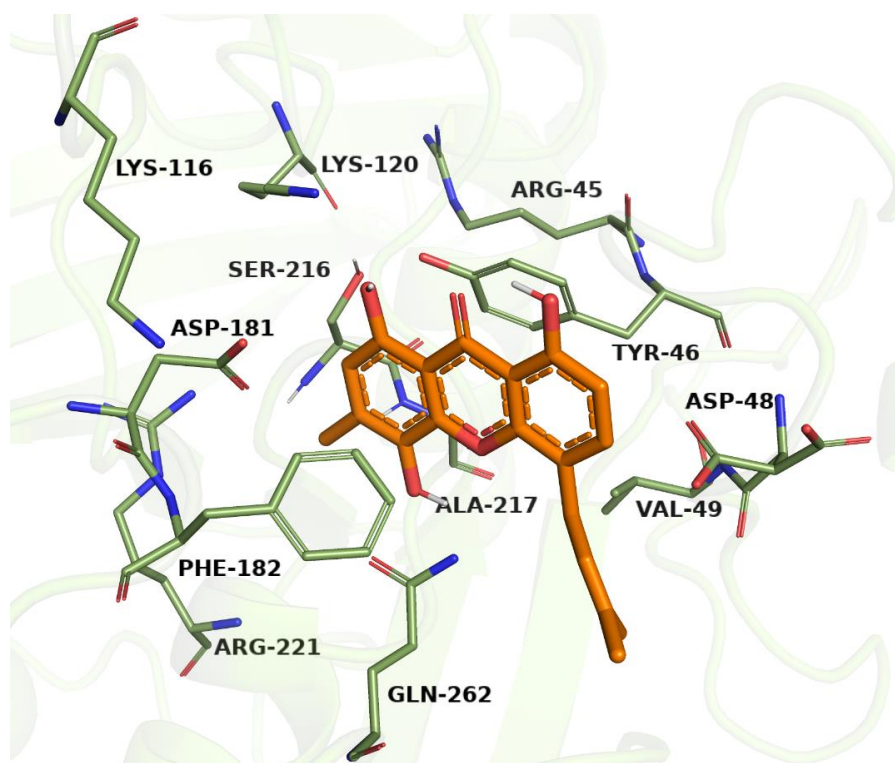
**Figura 87.** Posible sitio de unión para los compuestos **72** (azul), **89** (rosa), **120** (cian), **126** (anaranjado), **127** (amarillo) y ácido ursólico (morado) con la PTP-1B (verde, PDB1SUG).



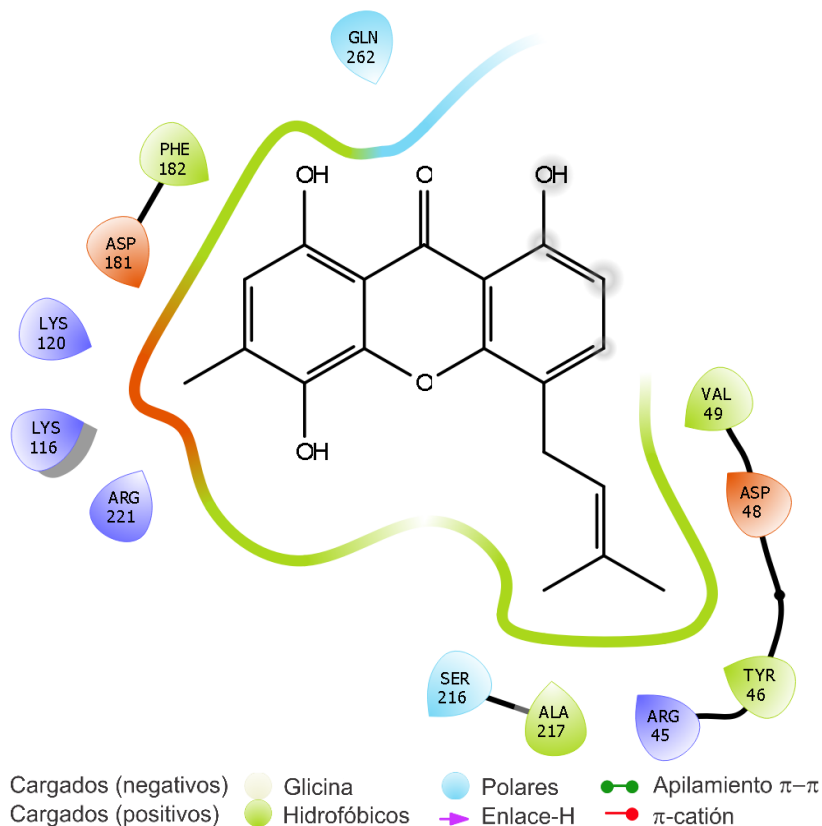
**Figura 88.** Representación en 3D del modo de unión de **120** con la PTP-1B.



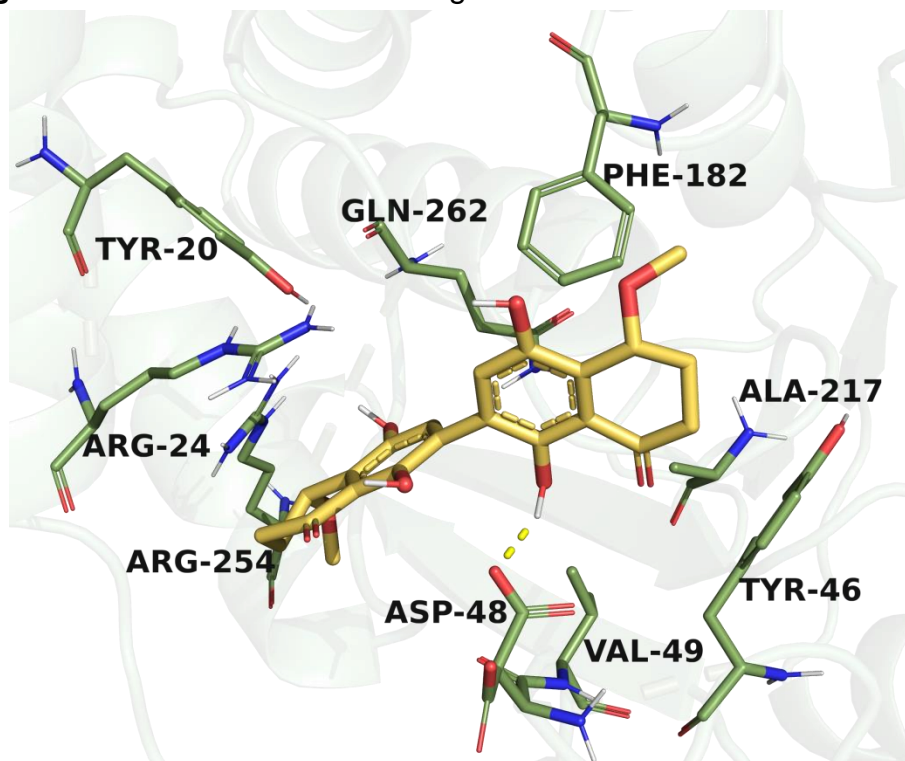
**Figura 89.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **120** con la PTP-1B.



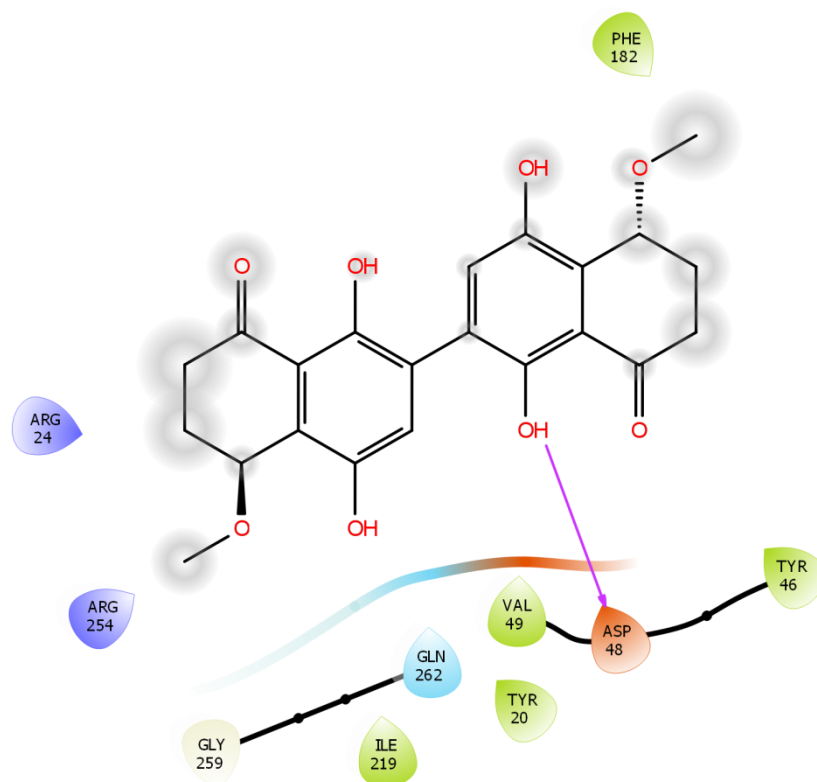
**Figura 90.** Representación en 3D del modo de unión de **126** con la PTP-1B.



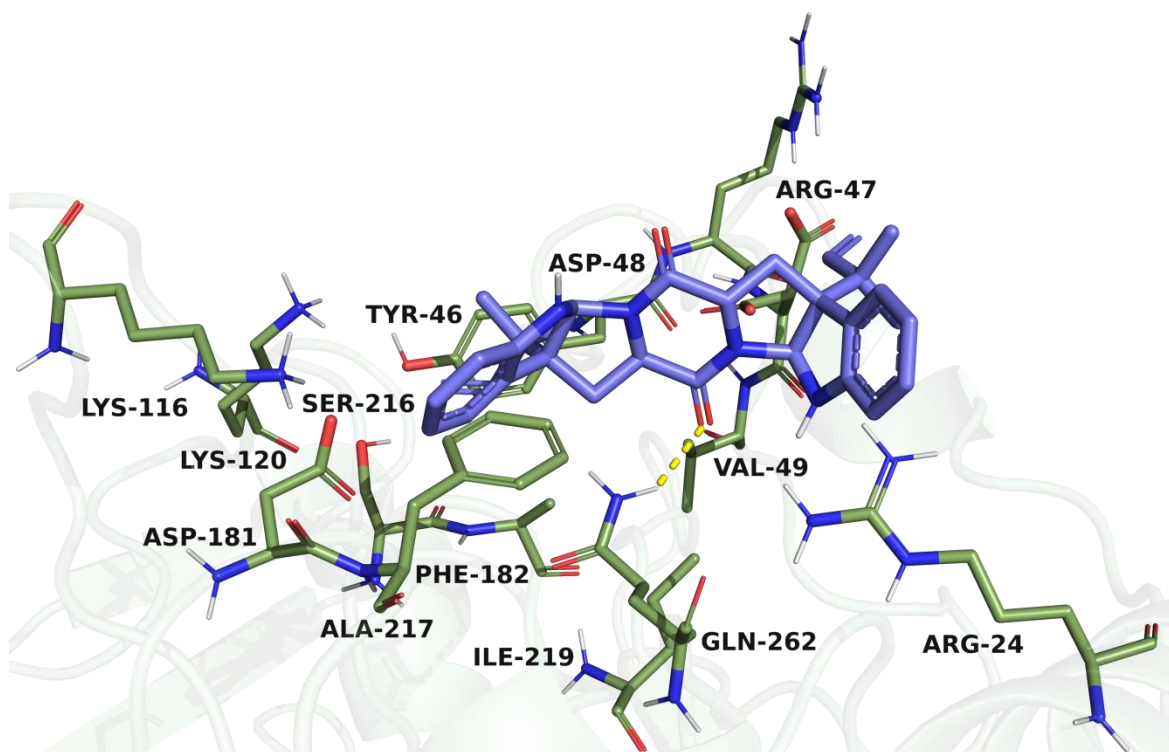
**Figura 91.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **126** con la PTP-1B.



**Figura 92.** Representación en 3D del modo de unión de **127** con la PTP-1B.

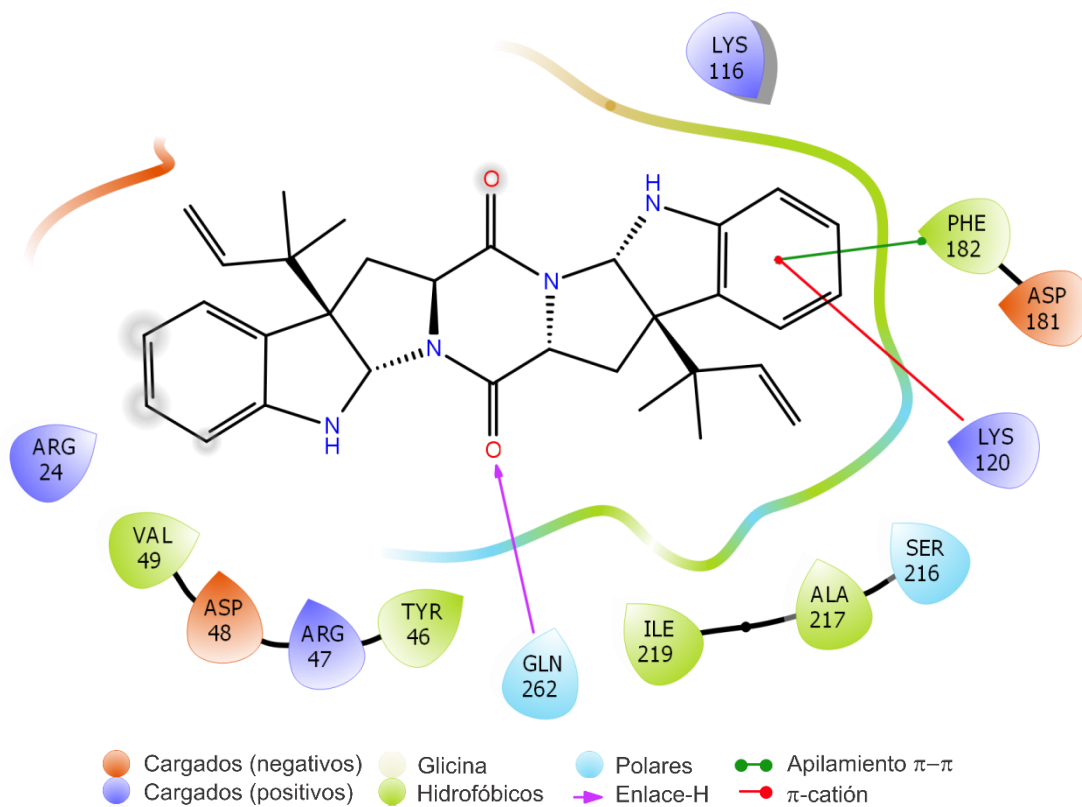


**Figura 93.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **127** con la PTP-1B.

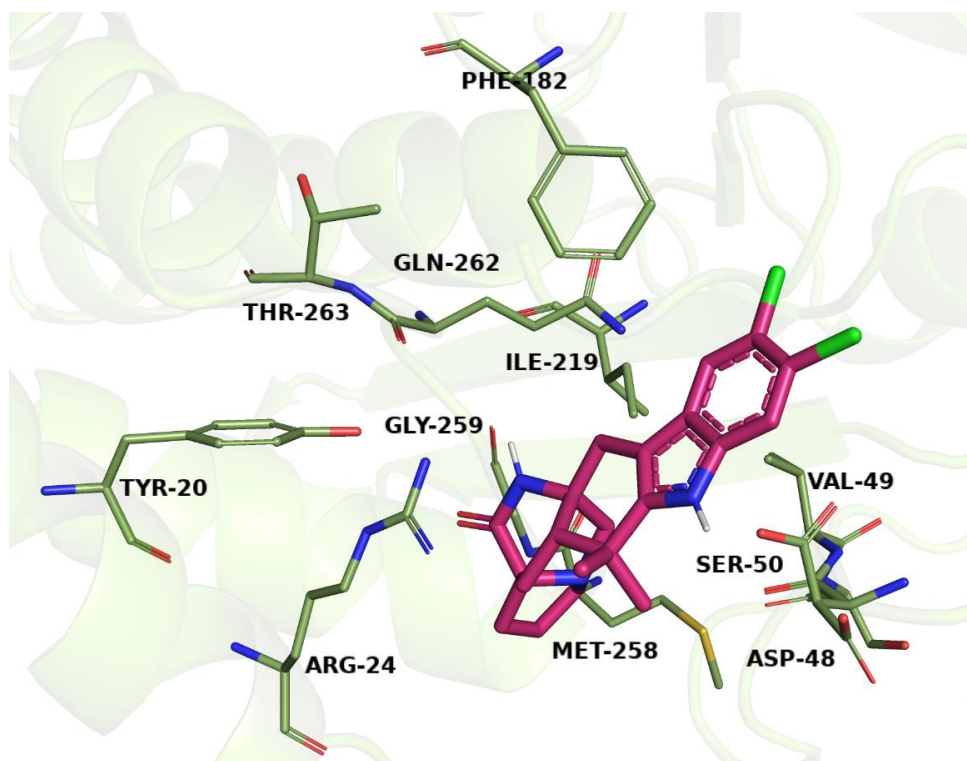


**Figura 94.** Representación en 3D del modo de unión de **72** con la PTP-1B.

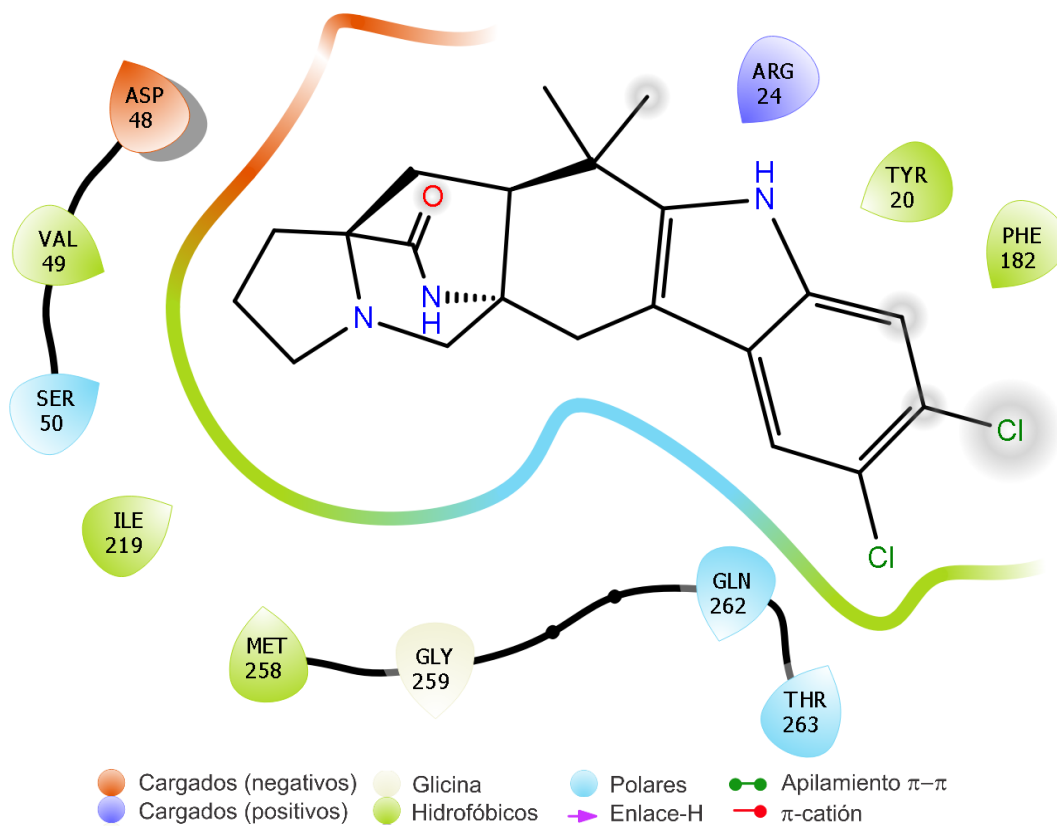




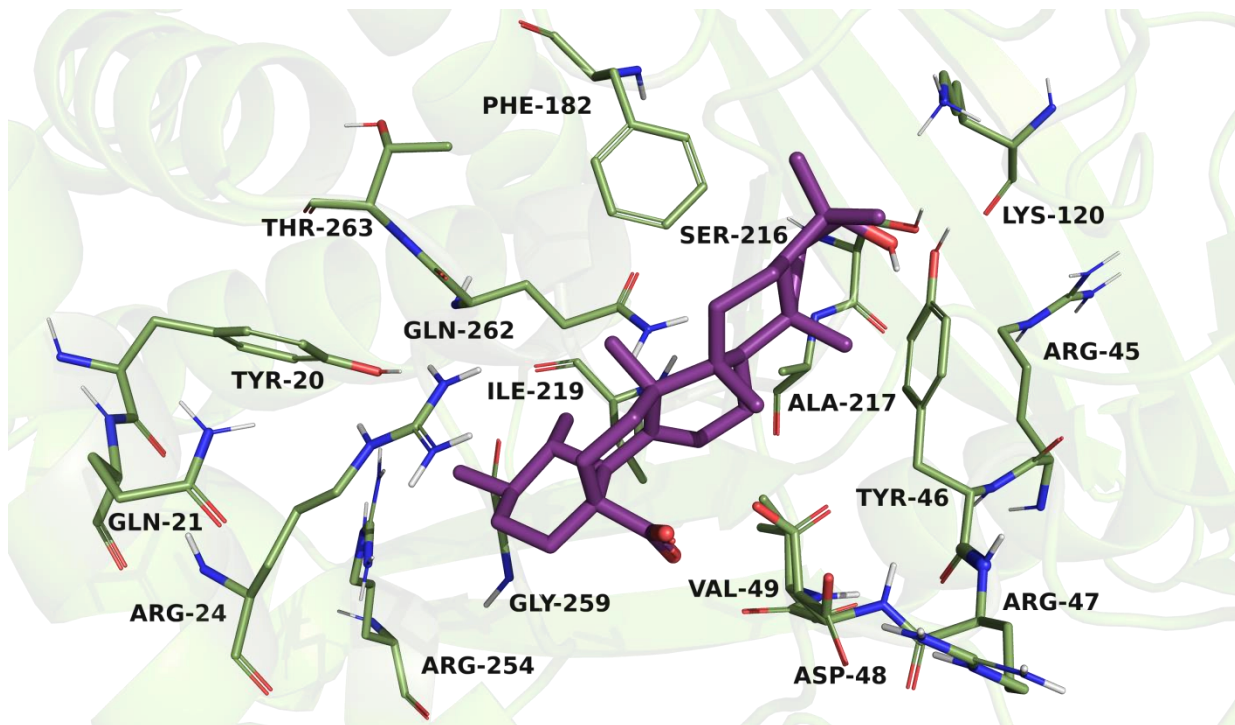
**Figura 95.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **72** con la PTP-1B.



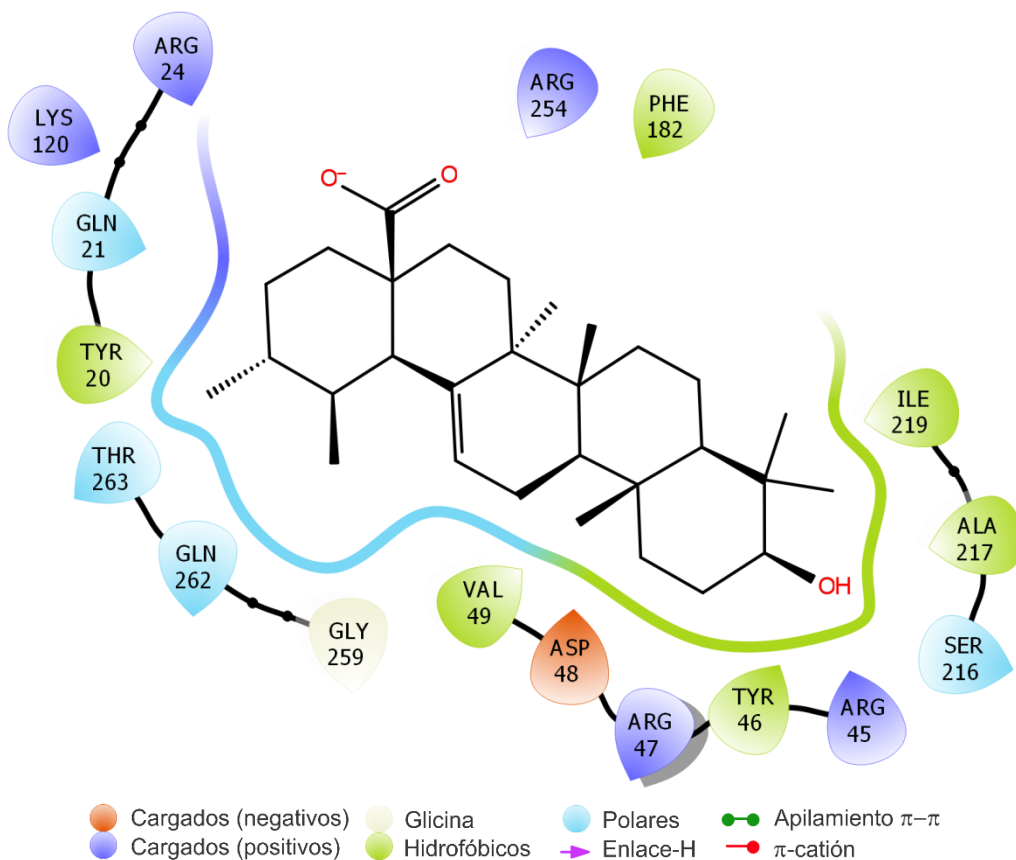
**Figura 96.** Representación en 3D del modo de unión de **89** con la PTP-1B.



**Figura 97.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **89** con la PTP-1B.



**Figura 98.** Representación en 3D del modo de unión del ácido ursólico con la PTP-1B.



**Figura 99.** Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B.

## 6. CONCLUSIONES

- Del hongo endófito *Preussia minimoides* se obtuvieron dos compuestos con esqueletos novedosos, las minimoidionas A y B (**118** y **119**) y notable actividad inhibitoria frente a la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura. De igual manera, el compuesto **119** mostro actividad inhibitoria significativa frente a la enzima PTP-1B humana. Los estudios de acoplamiento molecular mostraron que estas entidades se unen en el sitio catalítico de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de levadura y humanas y en el sitio B de la PTP-1B, al igual que sus respectivos fármacos de referencia. Estos resultados, indican que los hongos endófitos de plantas medicinales y el criterio quimiotaxonómico de selección constituyen indicadores valiosos para detectar fuentes de compuestos útiles para el desarrollo de fármacos.
- La aplicación del criterio quimiotaxonómico para seleccionar a *Malbranchea circinata* como un candidato idóneo para la obtención de inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa y la PTP-1B resultó exitoso, ya que se logró el aislamiento e identificación de doce entidades químicas, nueve de ellas novedosas (**120–128**). Los compuestos incluyeron varios policétidos de los tipos antraquinonas, xantonas, naftalenonas y varios derivados de dicetopiperazinas biosintetizados a partir de triptófano y ácido antranílico, algunos prenilados. De estos, la amauromina (**72**), la malbranqueamida (**89**) y los péptidos **120** y **121** fueron los metabolitos más activos frente a la  $\alpha$ -glucosidasa; mientras que **72**, **89**, **120**, **126** y **127** fueron los metabolitos más activos frente a la PTP-1B. Estudios de acoplamiento molecular con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura, indicaron que los metabolitos activos se unen en el mismo sitio que la acarbosa; en el caso de la enzima PTP-1B, los compuestos se unieron en el mismo sitio que el ácido ursólico (sitio B). La obtención de tripéptidos de ácido antranílico (**120** y **121**) no tiene precedentes en la naturaleza. *M. circinata* es la tercera especie del género que produce malbranqueamida, un alcaloide peptídico que tiene efectos vasorelajantes importantes así como otras propiedades biológicas importantes.

## 7. REFERENCIAS

- Abbas, G., Al Harrasi, A., Hussain, H., Hamaed, A., Supuran, C. T. *Bioorg. Chem.* **2019**, *86*, 305–315.
- Abdjul, D. B., Yamazaki, Takahashi, O., Kirikoshi, R., Mangindaan, R. E. P., Namikoshi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 904–907.
- Abu-Shady, M. R., El-Gindy, A. A., Saad, R. R., Ibrahim, Z. M. *African. J. Mycol. Biotechnol.* **2001**, *9*, 17–26.
- Agrawal, D., Basotra, N., Chadha, B. S., Balan, V., Tsang, A. *Appl. Biochem. Biotech.* **2019**, *191*, 463–481.
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., Valenzuela, R. *Rev. Mex. Biodivers.* **2014**, *85*, 76–81.
- Alberti, F., Foster, G. D., Bailey, A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 493–500.
- Arenal, F., Platas, G., Peláez, F. *Fungal Divers.* **2005**, *20*, 1–15.
- Arenal, F., Platas, G., Peláez, F. *Mycotaxon.* **2004**, *89*, 137–151.
- Asano, N. *Glycobiology.* **2003**, *13*, 93R–104R.
- Bai, M. P., Rao, P. L. *J. Biochem.* 1966, *3*, 187–90.
- Barr, A. J. *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 1563–1576.
- Basotra, N., Joshi, S., Satyanarayana, T., Pati, P. K., Tsang, A., Chadha, B. S. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, *108*, 185–192.
- Bergstrom, J. D., Dufresne, C., Bills, G. F., Nallin-Omstead, M., Byrne, K. *Ann. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 607–639.
- Bills, G. F., Gloer, J. B. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 1–32.
- Bugni, T. S., Bernan, V. S., Greenstein, M., Janso, J. E., Maiese, W. M., Mayne, C. L., Ireland, C. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2014–2017.
- Cai, R., Wu, Y., Chen, S., Cui, H., Liu, Z., Li, C., She, Z. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 1376–1383.
- Características De Las Defunciones Registradas En México Durante 2018. *INEGI*, **2019**. Comunicado de prensa Num.538/19.

- Centko, R. M., Ratnaweera, P. B., Tysoe, C., Withers, S. G., De Silva, E. D., Andersena, R. J. *Phytochem. Lett.* **2017**, *22*, 76–80.
- Chatterjee, A., Ganguly, M. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3358.
- Chen, H. L., Zhao, W. T., Liu, Q. P., Chen, H. Y., Zhao, W., Yang, D. F., Yang, X. L. *Fitoterapia.* **2020**, *141*, 104475.
- Chen, K., Liu, X. Q., Wang, W. L., Luo, J. G., Kong, L. Y. *Bioorg. Chem.* **2020**, *94*, 103400.
- Chen, X., Shi, Q., Lin, G., Guo, S., Yang, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1712–1715.
- Chen, Y., Stork, C., Hirte, S., Kirchmail, J. *Biomolecules.* **2019**, *9*, 43.
- Clapp-Shapiro, W. H., Burgess, B. W., Giacobbe, R. A., Harris, G. H., Mandala, S., Polishook, J., Rattray, M., Thornton, R. A., Zink, D. L.; Cabello, A., Diez, M. T., Martin, I., Pelaez, F. US5801172 A. **1998**.
- Clevenger, K. D., Ye, R., Bok, J. W., Thomas, P. M., Islam, M. N., Miley, G. P., Robey, M. T., Chen, C., Yang, K., Swyers, M., Wu, E., Gao, P., Wu, C. C., Keller, N. P., Kelleher, N. L. *Biochemistry.* **2018**, *57*, 3237–3243.
- Copeland, R. A. **2000**. Wiley-VCH, 2<sup>a</sup> Ed.
- Cui, C. M., Li, X. M., Li, C. S., Sun, H. F., Sun, S. S. G., Wang, B. G. *Helv. Chim. Acta.* **2009**, *92*, 1366–1370.
- Cui, H., Liu, Y., Nie, Y., Liu, Z., Chen, S., Zhang, Z., Lu Y., He, L., Huang, X., She, Z. *Mar. Drugs.* **2016**, *14*, 1–9.
- Del Valle, P., Martínez, A. L., Figueroa, M., Raja, H. A., Mata, R. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1286–1294.
- Derosa, G., Maffioli, P. *Arch. Med. Sci.* **2012**, *8*, 899–906.
- Deshmukh, S. K. *Mycopathologia.* **2002**, *156*, 177–181.
- Ding, Y., Greshock, T. J., Miller, K. A., Sherman, D. H., Williams, R. M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4863–6.
- Ding, Y., Williams, R. M., Sherman, D. H. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16068–16076.
- Du, F. Y., Li, X. M., Song, J. Y., Li, C. S. & Wang, B. G. *Helv. Chim. Acta.* **2014**, *97*, 973–978.

- Du, L., Robles, A. J., King, J. B., Mooberry, S. L., Cichewicz, R. H. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1459–1466.
- Du, L., Robles, A. J., King, J. B., Powell, D. R., Miller, A. N., Mooberry, S. L., Cichewicz, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 804–809.
- Duan, X., Liu, Y., You, X., Jiang, Z., Yang, S., Yang, S. *Biotechnol. Biofuels.* **2017**, *10*, 223/1–223/14.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L., Kennedy, B. P., *Science.* **1999**, *283*, 1544–1548.
- El-Gindy, A. A.; Ibrahim, Z. M.; Ali, U. F.; El-Mahdy, O. M. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* **2009**, *5*, 42–62.
- Ezzat, S. M., El Bishbishy, M. H., Habtemariam, S., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Martins, N., Sharifi-Rad, J. *Molecules* **2018**, *23*, 3334–3362.
- Fan, G., Yan, Y., Yang, S., Yan, Q., Jiang, Z. *Chinese J. Appl. Envir. Biol.* **2013**, *19*, 48–53.
- Fang, S. M., Cui, C. B., Li, C. W., Wu, C. J., Zhang, Z. J., Li, L., Huang, X. J., Ye, W. C. *Mar. Drugs.* **2012**, *10*, 1266–1287.
- Feldhammer, M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D., Tremblay, M. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *48*, 430–445.
- Figueroa, M., González, M. D. C., Mata, R. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 709–714.
- Figueroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Río-Portilla, F., González, M. D. C. Mata, R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 378–385.
- Figueroa, M.; González, M. D. C.; Mata, R. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 709–714.
- Fraley, A. E. Haatveit, K. C., Ye, Y., Kelly, S. P., Newmister, S. A., Yu, F., Williams, R. M., Smith, J. L., Houk, K. N., Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 2244–2252.
- Fraley, A. E., Garcia-Borràs, M., Tripathi, A., Khare, D., Mercado-Marin, E. V., Tran, H., Dan, Q., Webb, G. P., Watts, K. R. Crews, P., Sarpong, R., Williams, R. M., Smith, J. L., Houk, K. N., Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12060–12068.

- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A. Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. **2013**. *Gaussian 09, Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- Gao, L., Xu, X., Yang, J. *Chem. Nat. Compd.* **2017**, *53*, 1160–1162.
- Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D., Taylor, J. W. *Can. J. Bot.* **1991**, *69*, 180–190.
- Gaucher, G. M., Stevenson, K. J. *Handbook of Proteolytic Enzymes. 2nd Ed.*, **2004**, *2*, 1834–1835.
- Geetha, M. *Intl. J. Scie. Res. Rev.* 2018, *7*, 2215–2221.
- Ghani, U. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 133–162.
- Gonzalez-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A. *Anal. Biochem.* 2009, *387*, 64–70.
- González-Medina, M., Owen, J. R., El-Elimat, T., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Figueroa, M., Medina-Franco, J. L. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 1–12.
- Gonzalez-Medina, M.; Owen, J. R., El-Elimat, T., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Figueroa, M., Medina-Franco, J. L. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 180.
- Graefe, U., Haenel, F., Munder, T., Schlegel, B. *Ger. Offen.* **2004**, Patent, 6.
- Gregg, E. W., Li, Y., Wang, J., Rios-Burrows, N., Ali, M. K., Rolka, D., Williams, D. E., Geiss, L. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1514–1523.



- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J. E. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, 137–149.
- Guo, L. D., Huang, G. H., Wang, Y. *J. Integr. Plant Biol.* **2008**, 50, 997–1003.
- Gupta, A. K., Gautam, S. P. *J. Gen. Microbiol.* **1993**, 139, 963–7.
- Hawksworth, D. L., Lucking, R. *Microbiol. Spectr.* **2017**, 5, FUNK-0052-2016.
- He, R. J., Yu, Z. H., Zhang, R. Y., Zhang, Z. Y. *Dev.* **2014**, 57, 1227–1246.
- Hensens, O. D., Helms, G. L., Jones, E. T. T., Harris, G. H. *J Org Chem.* **1995**, 60, 1772–1776.
- Hoang, D. M., Ngoc, T. M., Dat, N. T., Ha, D. T., Kim, Y. H., Luong, H. V., Ahn, J. S., Bae, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2009**, 19, 6759–6761.
- Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S. I., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K. I. *Phytochemistry.* **2005**, 66, 2776–2779.
- Hover, B. M., Kim, S. H., Katz, M., Charlop-Powers, Z., Owen, J. G., Ternei, M. A., Maniko, J., Estrela, A. B., Molina, H., Park, S., Perlin, D. S., Brady, S. F. *Nat. Microbiol.* **2018**, 3, 415–422.
- Huttner, S., Varnai, A., Petrovic, D. M., Bach, C. X., Anh, D. T. K., Thanh, V. N., Eijsink, V. G. H., Larsbrink, J., Olsson, L. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019, 85, 01408.
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn.* **2019**, Brussels, Belgium: International Diabetes Federation,. <http://diabetesatlas.org>.
- Israili, Z. *Am. J. Ther.* **2011**, 18, 117–152.
- Jang, J. P., Jang, J. H., Soung, N. K., Kim, H. M., Jeong, S. J., Asami, Y., Shin, K. S., Kim, M. R., Oh, H., Kim, B. Y. *J. Antibiot. (Tokyo).* **2012**, 65, 215–217.
- Jiang, C. S., Liang, L. F., Guo, Y. W. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, 33, 1217–1245.
- Juntunen, K., Mäkinen, S., Isoniemi, S., Valtakari, L., Pelzer, A., Jänis, J., Paloheimo, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, 177, 407–430.
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., Del Prato, E. *Lancet.* **2014**, 383, 1068–1083.
- Kato, A., Kano, E., Adachi, I., Molyneux, R. J., Watson, A. A., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Wormald, M. R., Kizu, H., Ikeda, K. Asano, N. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2003**, 14, 325–331.

- Khursheed, R., Singh, S. K., Wadhwa, S., Kapoor, B., Gulati, M., Kumar, R., Ramanunmy, A. K., Awasthi, A., Dua, K. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *862*, 172625.
- Kinoshita, K., Sasaki, T., Awata, M., Takada, M., Yaginuma, S. *J Antibiot.* **1997**, *50*, 961–964.
- Koehn, F. E., Carter, G. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206–220.
- Komoldin, K., Åqvist, J. *FEBS Letters.* **2001**, *498*, 208–213.
- Krasikov, V. V., Karelov, D. V., Firsov, L. M. *Biochemistry (Moscow).* **2001**, *66*, 267–281.
- Kubo, I., Murai, Y., Soediro, I., Soetarno, S., Sastrodihardjo, S. *Phytochemistry.* **1992**, *31*, 1063–1065.
- Kumar, J., Kumar, P., Kushwaha, R. K. S. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2015, *6*, 160–164.
- Kumar, J., Kushwaha, R. K. S. *Arch. Appl. Sci. Res.* 2014, *6*, 73–78.
- Lee, J. S., Abdjul, D. B., Yamazaki, H., Takahashi, O., Kirikoshi, R., Ukai, K., Namikoshi, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3900–3902.
- Lei, H. M., Ma, N., Wang, T., Zhao, P. J. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *13*;1-7.
- Leyte-Lugo, M., Figueroa, M., González, M. D. C., Glenn, A. E., González-Andrade, M., Mata, R. *Phytochemistry.* **2013**, *96*, 273–278.
- Li, C. W., Wu, C. J., Cui, C. B., Xu, L. L., Cao, F., Zhu, H. J. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 73383–73387.
- Li, D. L., Li, X. M., Wang, B. G. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *19*, 675–680.
- Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G. *Nature.* **2003**, *426*, 247–254.
- Li, Y., Li, L., Hölscher, C.. *Rev. Neurosci.* **2016**, *27*, 689–711.
- Lin, A. H. M., Lee, B. H., Chang, W. J. *Food Hydrocoll.* **2016**, *53*, 163–171.
- Liu, L., Li, W., Koike, K., Zhang, S., Nikaido, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 566–569.
- Liu, M., Li, X., Liu, Q., Xie, S., Chen, M., Wanga, L., Fenga, Y., Chen, X. *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *85*, 103336.
- Liu, Q., Zhao, P., Li, X. C., Jacob, M. R., Yang, C. R., Zhang, Y. J. *Helv. Chim. Acta.* **2010**, *93*, 265–271.

- Liu, Y. Liu, Y., Yang, Q., Xia, G., Huang, H., Li, H., Ma, L., Lu, Y., He, L., Xia, X., She, Z. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1816–1822.
- Liu, Z., Liu, Z., Chen, S., Qiu, P., Tan, C., Long, Y., Lu, Y., She, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 10276–10280.
- Lodewyk, M. W., Siebert, M. R., Tantillo, D. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1839–1862.
- Lozano-González, M., Ovalle-Magallanes, B., Rangel-Grimaldo, M., De La Torre-Zavala, S., Noriega, L. G., Tovar-Palacio, C., Tovar, A. R., Mata, R. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 7756–7762.
- Luthra, T., Banothu, V., Adepally, U., Kumar, K., Swathi M, Chakrabarti, S., Maddi, S. R., Sen, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *188*, 112034.
- Machida, K., Matsuoka, E., Kasahara, T., Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 934–937.
- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., Mata, R. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67*, 551–558.
- Mahajan, C., Basotra, N., Singh, S., Di Falco, M., Tsang, A., Chadha, B. S. *Bioresour. Technol.* **2016**, *200*, 55–63.
- Mandala, S. M., Thornton, R. A., Frommer, B. R., Curotto, J. E., Rozdilsky, W., Kurtz, M. B., Giacobbe, R. A., Bills, G. F., Cabello, M. A., Martin, I., Pelaez, F. J. *Antibiot.* **1994**, *48*, 349–357.
- Marchisio, V. F., Fusconi, A., Rigo, S. *Mycopathologia.* **1994**, *127*: 103–115.
- Martínez-Luis, S., González, M. D. C., Ulloa, M., Mata, R. *Phytochemistry.* **2005**, *66*, 1012–1016.
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M. C., Lira-Rocha, A., Mata, R. *Tetrahedron.* **2006**, *62*, 1817–1822.
- Mata, R., Figueroa, M., Rivero-Cruz, I., Macías-Rubalcava, M. L. *Planta Med.* **2018**, *84*, 594–605.
- Mendivil, A., Ariza, S. *Rev. Fac. Med.* **2005**, *53*, 235–243.
- Miller, K. A., Welche, T. R., Greshock, T. J., Ding, Y., Sherman, D. H., Williams, R. M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3116–3119.

- Moorthy, N. S. H. N., Ramos, M. J., Fernandes, P. A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 713–720.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- Mudur, S. V., Gloer, J. B., Wicklow, D. T. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2006**, *59*, 500–506.
- Nakai, H., Okuyama, M., Kim, Y. M., Saburi, W., Wongchawalit, J., Mori, H., Chiba, S., Kimura, A. *Biologia, Bratislava*. **2005**, *16*, 131–135.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803.
- Nishioka, M., Nakano, K., Ishioka, R. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. **1998**, Patente, 6.
- Noumeur, S. R., Helaly, S. E., Jansen, R., Gereke, M., Stradal, T. E. B., Harzallah, D., Stadler, M. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1531–1540.
- Oh, H., Seok, B., Bae, E. Y., Kim, B. Y., Lee, H. B., Kim, C. J., Ahn, J.S. *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 528–531.
- Oliveira-Monteiro, L. M., Vici, A. C., Pinheiro, M. P., Heinen, P. R., Cavalcante De Oliveira, A. H., Warf, R. J., Prade, R. A., Buckeridge, M. S., Polizeli, M. L. T. M. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6998.
- Organización Mundial de la Salud. *Diabetes mellitus*. **2019**. OMS.
- Osadebe, P. O., Uzor, P.F., Omeje, E. O., Agbo, M. O., Obonga, W. O. *J Pharm Res.* **2014**, *13*, 1437–1443.
- Otani, T., Sugimoto, Y., Aoyagi, Y., Igarashi, Y., Furumai, T., Saito, N., Yamada, Y., Asao, T., Oki, T. *J. Antibiot. Res.* **2000**, *53*, 337–344.
- Overy, D. P., Zidorn, C., Petersen, B. O., Duus, J. Ø., Dalsgaard, P. W., Larsen, T. O., Phipps, R. K. *Tetrahedron letters*. **2005**, *46*, 3225–3228.
- Paululat, T., Kulik, A., Hausmann, H., Karagouni, A. D., Zinecker, H., Imhoff, J. F., Fiedler, H. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2344–2350.
- Pedersen, A. K., Peters, G. H., Møller, K. B., Iversen, L. F., Kastrup, J. S. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1527–1534.

- Pereira, M. G., Guimaraes, L. H. S., Furriel, R. P. M., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. *J. Microbiol. (Seoul, Republic of Korea)*. **2011**, *49*, 809–815.
- Poch, G. K., Gloer, J. B. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 213–217.
- Proyecto De Norma Oficial Mexicana, PROY-NOM-015-SSA2-2018. **2019**. Dof: 03/05/2018. 1–45.
- Puius, Y. A., Zhao, Y., Sullivan, M., Lawrence, D. S., Almo, S. C., Zhang, Z. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 13420–13425.
- Qi, B. Xiao Liu, X., MO, T., Li, S., Wang, J., Shi X., Wang, X., Zhu, Z., Zhao, Y., Jin, H., Tu, P., Shi, S. *Fitoterapia*. **2017**, *123*, 35–43.
- Rahbæk, L., Breinholt, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 904–905.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., Oberlies, N. H. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 756-770.
- Raksat, A., Phukhatmuen, P., Yang, J., Maneerat, W., Charoensup, R., Andersen, R. J., Wang, Y. A., Pyne, S. G., Laphookhieo, S. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 164–168.
- Ramírez-Espinosa, J. J., Rios, M. Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J. L., Paoli, P., Camici, G., Navarrete-Vázquez, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2243–2251.
- Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Madariaga-Mazón, A., Figueroa, M., Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 582–587.
- Rebollar-Ramos, D., Macías-Ruvalcaba, M. L., Figueroa, M., Raja, H. A., González-Andrade, M., Mata, R. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2018**, *71*, 862–871.
- Rehner, S. A., Samuels, G. J. *Can. J. Bot.* **1995**, *73*, 816–823.
- Ren, L., Qin, X., Cao, X., Wang, L., Bai, F., Bai, G., Shen Y. *Protein Cell.* **2011**, *2*, 827–836.
- Ribeiro, L. F. C., De Lucas, R. C., Vitcosque, G. L., Ribeiro, L. F., Ward, R. J., Rubio, M. V., Damasio, A. R. L., Squina, F. M., Gregory, R. C., Walton, P. H., Jorge, J. A., Prade, R. A., Buckeridge, M. S., Polizeli, M. L. T. M. *Biotechnol. Biofuels*. 2014, *7*, 115/1-115/11.

- Rong-jun, H. E., Zhi-hong, Y. U., Ruo-yu, Z., Zhong-yin Z. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 1227–1246.
- Rudnitskaya, A., Török, B., Török, M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2010**, *38*, 261–265.
- Ryu, H. W., Lee, B. E., Curtis-Long, M. J., Jung, S., Ryu, Y. B., Lee, W. S., Park, K. S. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 202–208.
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., Williams, R., IDF Diabetes Atlas Committee. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **2019**, *157*, 107843.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberon, J., Dirizo, R., Halfter, G., March, I., Mohar, A., Pisanty, I. *Capital natural de México.* **2017**. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Schlegel, B., Hanel, F., Gollmick, F. A., Saluz, H.-P., Gräfe, U. *J. Antibiot. (Tokyo).* **2003**, *56*, 917–922.
- Schrödinger Release 2019-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- Schrödinger, L. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.1*; 2015.
- Seeliger, D., De Groot, B. L. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24*, 417–422.
- Seo, C., Sohn, J. H., Ahn, J. S., Yim, J. H., Lee, H. K., Oh, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2801–2803.
- Seo, C., Sohn, J. H., Park, S. M., Yim, Z. H., Lee, H. K., Oh, H. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1322.
- Seo, E. J., Curtis-Long, M. J., Lee, B. W., Kim, H. Y., Ryu, Y. B., Jeong, T. S., Leec, W. S., Parka, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6421–6424.
- Shan, W. G., Wu, Z. Y., Pang, W. W., Ma, L. F., Ying, Y. M., Zhan, Z. J. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 1718–1724.
- Sharma, M., Chadha, B. S., Saini, H. S., *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8834–8842
- Sharma, M., Mahajan, C., Bhatti, M. S., Chadha, B. S. *Biotech.* **2016**, *6*, 30.
- Sherman, D. H., Fraley, A. E., Tripathi, A. *PCT Int. Appl.* **2020**, Patent, 61.

- Shrestha, S., Seong, S. H., Park, S. G., Min, B. S., Jung, H. A., Choi, J. S. *Molecules*. **2019**, *24*, 2893–2904.
- Sigler, L., Carmichael, J. W. *Mycotaxon*. **1976**, *4*, 349–488.
- Siling, S. A., Ponomarev, I. I. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1978**, *27*, 1643–1649.
- Sim, L., Jayakanthan, K., Mohan, S., Nasi, R., Johnston, B. D., Pinto, B. M., Rose, D. R. *Biochemistry*. **2010**, *49*, 443–451.
- Sim, L., Quezada-Calvillo, R., Sterchi, E. E., Nichols, B. L., Rose, D. R. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 782–792.
- Sim, L., Willemsma, C., Mohan, S., Naim, H. Y., Pinto, B. M., Rose, D. R. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 17763–17770.
- Singh, C. J. *Mycopathologia*, 1999, *143*, 147–150.
- Sohn, J. H., Lee, Y. R., Lee, D. S., Kim, Y. C., Oh, H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *23*, 1206–1211.
- Soman, A. G., Gloer, J. B., Koster, B., Malloch, D. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*: 659–661.
- Soulsby, M., Bennett, A. M. *Physiology*. **2009**, *24*, 281–289.
- Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W. B., Kremer, A., Li, S. M. *Curr. Med. Chem.* 2009, *16*, 218–231.
- Sun, H. H., Barrow, C. J., Sedlock, D. M., Gillum, A. M., Cooper, R. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1994**, *47*, 515–522.
- Sun, T. Y., Kuang, R. Q., Chen, G. D., Qin, S. Y., Wang, C. X., Hu, D., Wu, B., Liu, X. Z., Yao, X. S., Gao, H. *Molecules*. **2016**, *21*, 1184–1196.
- Tabák, A. G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E. J., Kivimäki, M. *The Lancet*. **2012**, *379*, 2279–2290.
- Takase, S., Kawai, Y., Uchida, I., Tanaka, H., Aoki, H. *Tetrahedron*. **1985**, *41*, 3037–3048.
- Tamrakar, A. K., Maurya, C. K., Rai, A. K. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 1101–1115.
- Tan, K., Tesar, C., Wilton, R., Jedrzejczak, R. P., Joachimiak, A. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 1498–1508.

- Tonks, N. K. *FEBS J.* **2013**, *280*, 346–378.
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., Fischer, E. H. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6731–6737.
- Trott, O., Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.
- Tseng, M. C., Yang, H. Y., Chu, Y. H. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 419–427.
- Valencia, W. M., Florez, H. *Diabetes, Obes. Metab.* **2014**, *16*, 1192–1203.
- Van Beers, E. H., Büller, H. A., Grand, R. J., Einerhand, A. W. C., Dekker, J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 197–262.
- Verastegui-Omaña, B., Rebollar-Ramos, D., Pérez-Vásquez, A., Martínez, A. L., Madariaga-Mazón, A., Flores-Bocanegra, L., Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 190–195.
- Vilgalys, R., Hester, M. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 4283–4246.
- Von Eijk, Gerbertus W., Roeymans, H. J. *Exp. Mycol.* **1981**, *5*, 373–375.
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Fukushima, K., Kawai, K. *Mycotoxins.* **2008**, *58*, 1–6.
- Wakana, D., Hosoe, T., Wachi, H., Itabashi, T., Fukushima, K., Yaguchi, T., Kawai, K. *J. Antibiot. (Tokyo).* **2009**, *62*, 217–219.
- Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K. I., Yaguchi, T., Fukushima, K., Goda, Y., Hosoe, T. *J. Antibiot. (Tokyo).* **2014**, *67*, 585–588.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., Thornton, J. M. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127–134.
- Wang, C., Guo, L., Hao, J., Wang, L., Zhu, W., *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2977–2981.
- Wang, J. F., Zhou, L. M., Chen, S. T., Yang, B., Liao, S. R., Kong, F. D., Lin, X. P., Wang, F. Z., Zhou, X. F., Liu, Y. H. *Fitoterapia.* **2018**, *125*, 49–54.
- Wardrop, D. J., Waidyarachchi, S. L. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1431–1468.
- Watts, K. R., Loveridge, S. T., Tenney, K., Media, J., Valeriote, F. A., Crews, P. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6201–6208.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. *PCR Protocols: a guide to methods and application.* San Diego, **1990**, 315–322.
- Willoughby, P. H., Jansma, M. J., Hoye, T. R. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 643–660.
- Witt, F. A., Bergman, J. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 351–355.



- Wu, W., Schulein, M., Kauppinen, M. S., Stringer, M. A. *PCT Int. Appl.* **2001**, Patent, 89.
- Xu, L. L., Chen, H. L., Hai, P., Gao, Y., Xie, C. D., Yang, X. L., Abe, I. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1078–1081.
- Xu, Y. J., Pieters, L. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1056–1072.
- Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., Osaki, S. *FEBS Journal.* **2010**, *277*, 4205–4214.
- Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., Tabata, S. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3414–3420.
- Yamazaki, H., Nakazawa, T., Sumilat, D. A., Takahashi, O., Ukai, K., Takahashi, S., Namikoshi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2151–2154.
- Yamazaki, H., Takahashi, O., Kanno, S. I., Nakazawa, T., Takahashi, S., Ukai, K., Sumilat, D. A., Ishikawa, M., Namikoshi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 797–802.
- Yan, Q. J., Han, P., Yang, S. Q., Jiang, Z. Q. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 1279–1286.
- Yang, D., Zhao, J., Liu, S., Songa, F., Liu, Z. *Anal. Methods.* **2014**, *6*, 3353.
- Yang, H., Liu, D. Q., Liang, T. J., Li, J., Liu, A. H., Yang, P., Lin, K., Yu, X. Q., Guo, Y. W., Mao, S. C., Wang, B. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, *16*, 1158–1165.
- Yang, Y. L., Liao, W. Y., Liu, W. Y., Liaw, C. C., Shen, C. N., Huang, Z. Y., Wu, S. H. *Chem. A. Eur. J.* **2009**, *15*, 11573–11580.
- Youssef, Y. A., el-Din, A. A., Hassanein, S. M. *Zbl. Mikrobiol.* **1992**, *147*, 80–85.
- Zhang, F., Li, L., Niu, S., Si, Y., Guo, L., Jiang, X., Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 230–237.
- Zhang, L., Niaz, S. I., Wang, Z., Zhu, Y., Lin, Y., Li, J., Liu, L. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 2887–2892.
- Zhang, Z. Y., Lee, S. Y. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **2003**, *12*, 223–233.
- Zhou, Y., Zhang, W., Liu, X., Yu, H., Lu, X., Jiao, B. *Chem. Biodiversity* **2017**, *14*, e1600462.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1

#### *Preussia minimoides*

- Figura S1.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S2.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S3.** Espectro DEPT-135 de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S4.** Espectro HSQC de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S5.** Espectro HMBC de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S6.** Espectro NOESY de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S7.** Espectro COSY de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S8.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S9.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S10.** Espectro DEPT-135 de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S11.** Espectro HSQC de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S12.** Espectro HMBC de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S13.** Espectro NOESY de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S14.** Espectro FTIR de la minimoidiona B (**119**).
- Figura S15.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la preusocromona C (**44**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S16.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la corimbiferona (**57**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura S17.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**63**) en  $\text{CDCl}_3$ .
- Tabla S1.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos de  $^1\text{H}$  NMR para la minimoidiona A (**118**; B3LYP/6-311 + G(2d, p))
- Tabla S2.** Comparación de datos de  $^1\text{H}$  RMN calculados y experimentales para **118**.
- Tabla S3.** Cálculos DCE para el enantiómero 7aS, 8S,11aS de **118**.
- Tabla S4.** Cálculos DCE para el enantiómero 7aR, 8R,11aR de **118**.
- Figura S21.** DCE calculado para el enantiómero 7aS,8S,11aS de **118** (B3LYP/ 6-31+G(d)).
- Tabla S5.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos de  $^1\text{H}$  NMR para el enantiómero R de minimoidiona B (**119**; B3LYP/6-311 + G(2d, p)).
- Tabla S6.** Comparación de los datos de  $^1\text{H}$  RMN calculados y experimentales para el enantiómero R de **119**.
- Tabla S7.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos de  $^1\text{H}$  NMR para el enantiómero S de minimoidiona B (**119**; B3LYP/6-311 + G(2d, p))
- Tabla S8.** Comparación de los datos de  $^1\text{H}$  RMN calculados y experimentales para el enantiómero S de **119**.
- Tabla S9.** Efecto inhibitorio de los compuestos 1-4 probados contra la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura ( $\alpha$ GHY)
- Figura S23.** Representación 2D de las interacciones entre  $\alpha$ GHY y acarbosa en el sitio de unión previsto.
- Tabla S10.** Datos del cristal y refinamiento de la estructura de la Minimoidiona A (**119**).

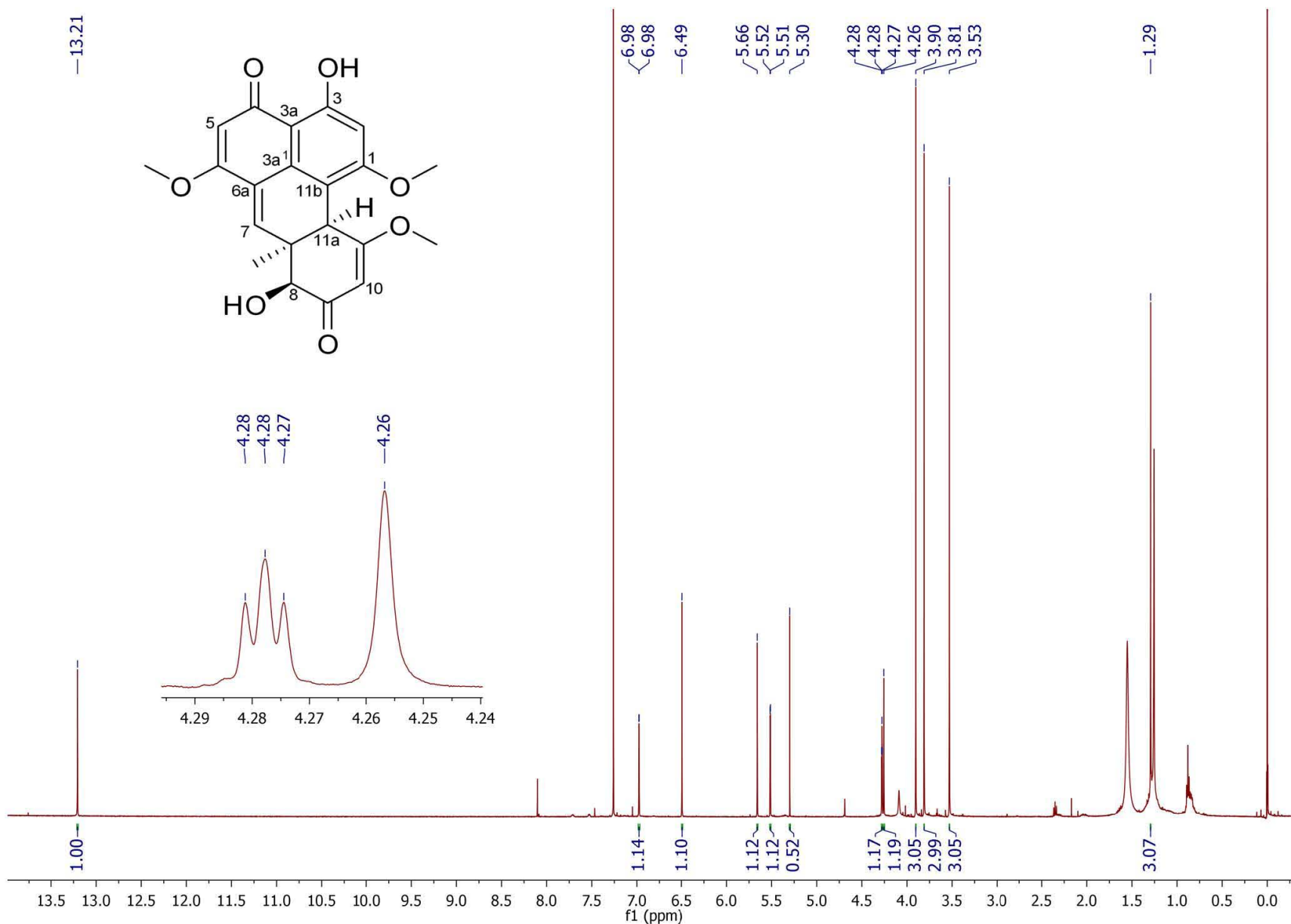


Figura S1. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la minimoidona A (118) en CDCl<sub>3</sub>.

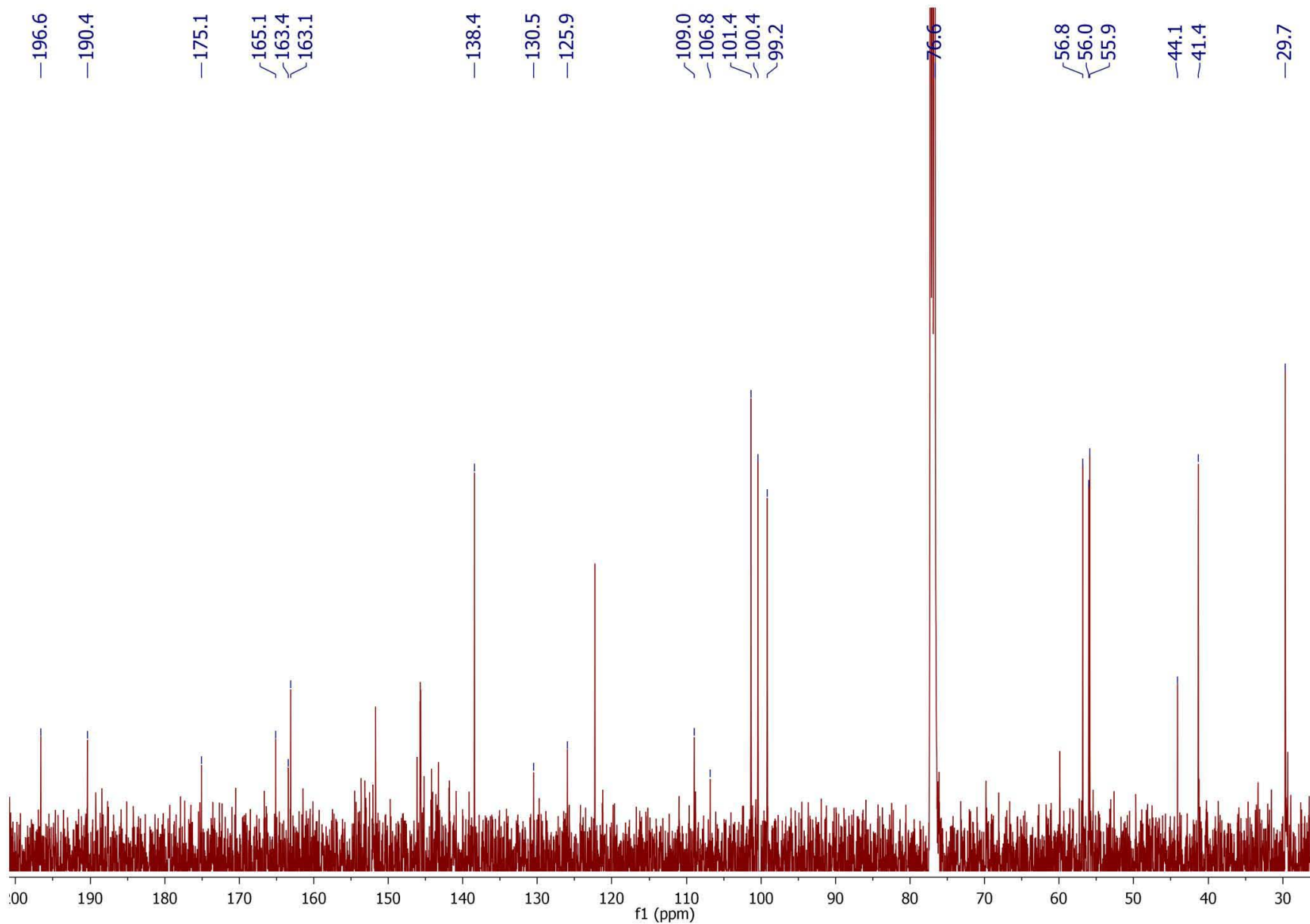


Figura S2. Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la minimoidiona A (118) en CDCl<sub>3</sub>.

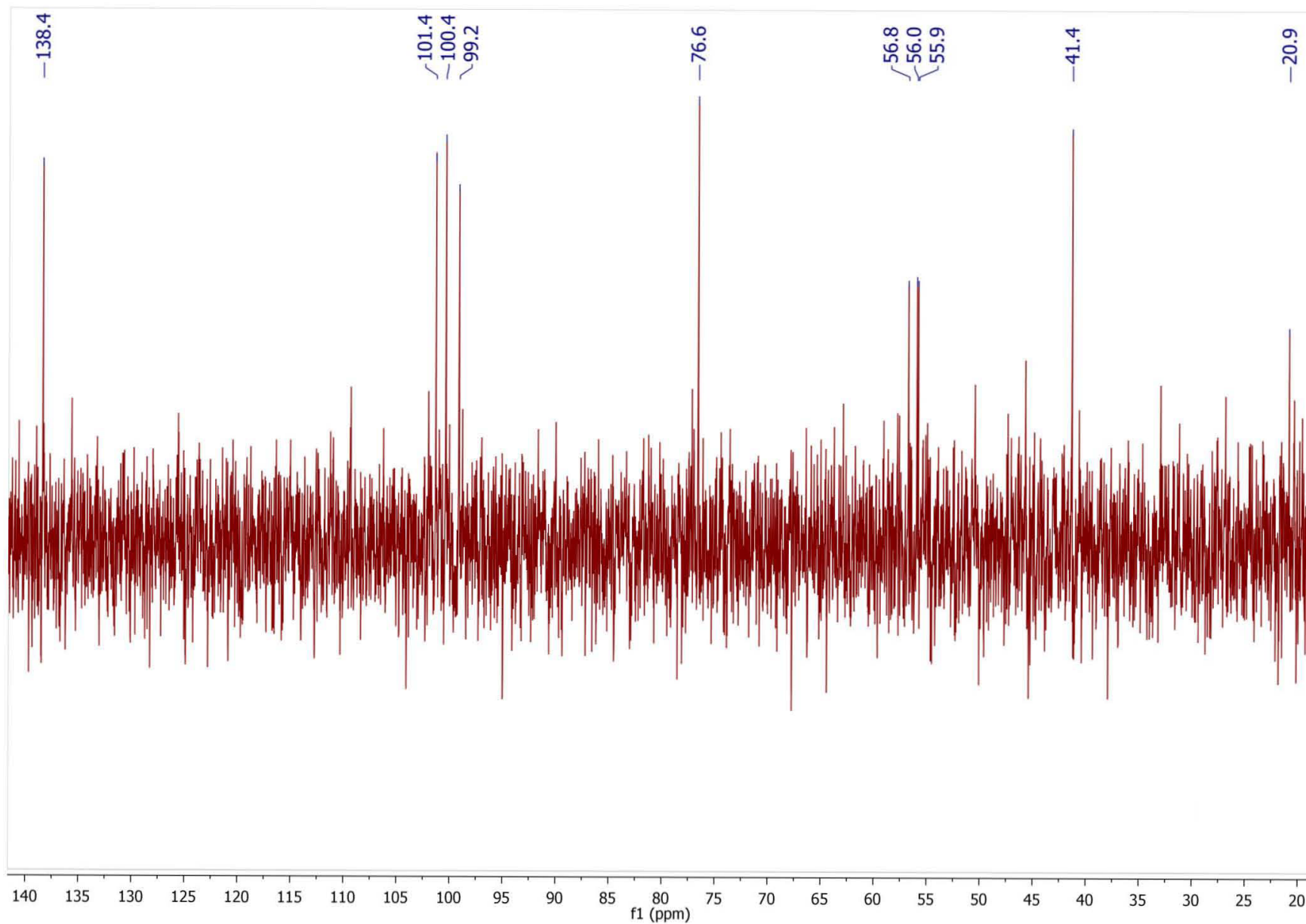


Figura S3. Espectro DEPT-135 de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .

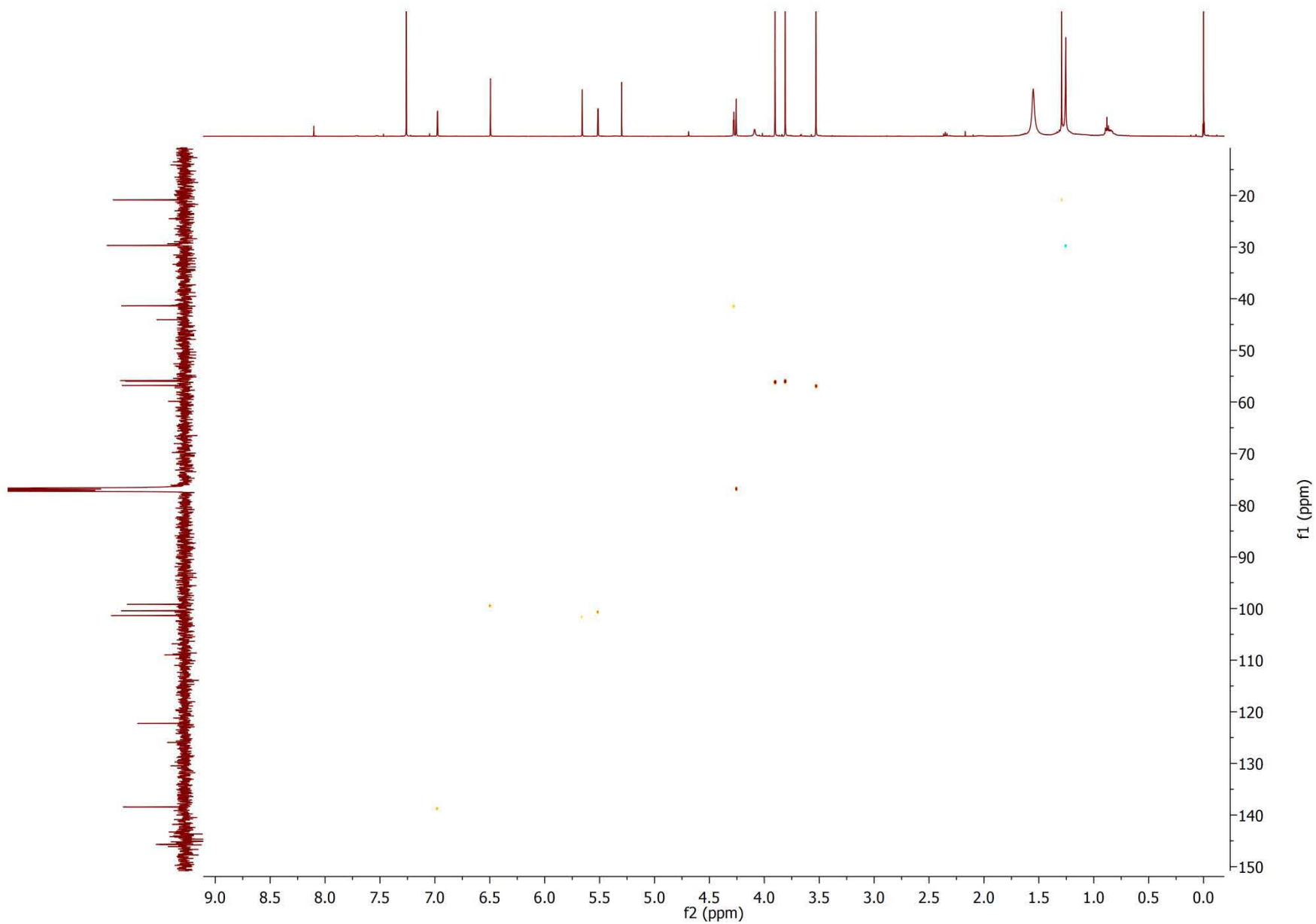


Figura S4. Espectro HSQC de la minimoidiona A (118) en  $\text{CDCl}_3$ .

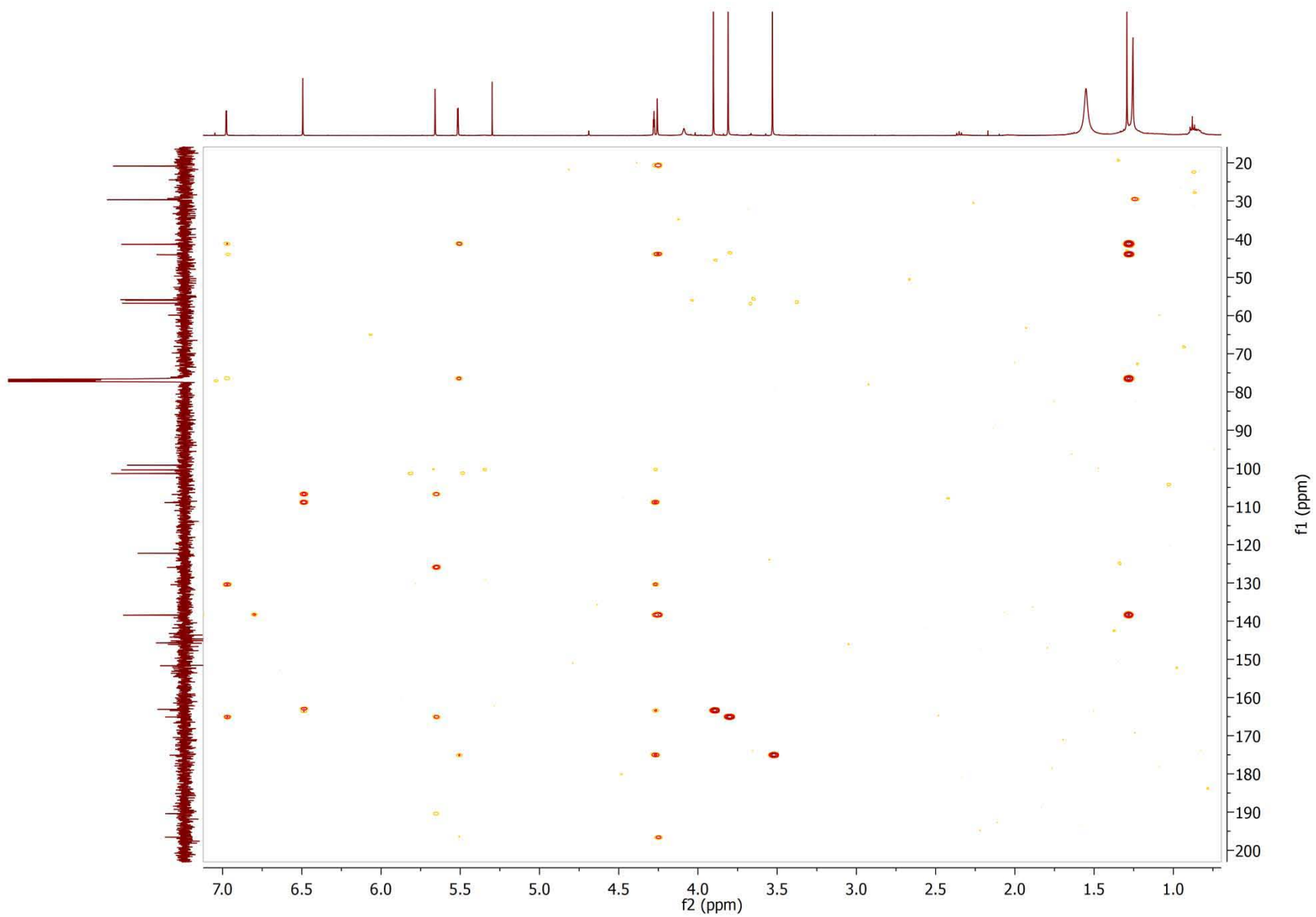
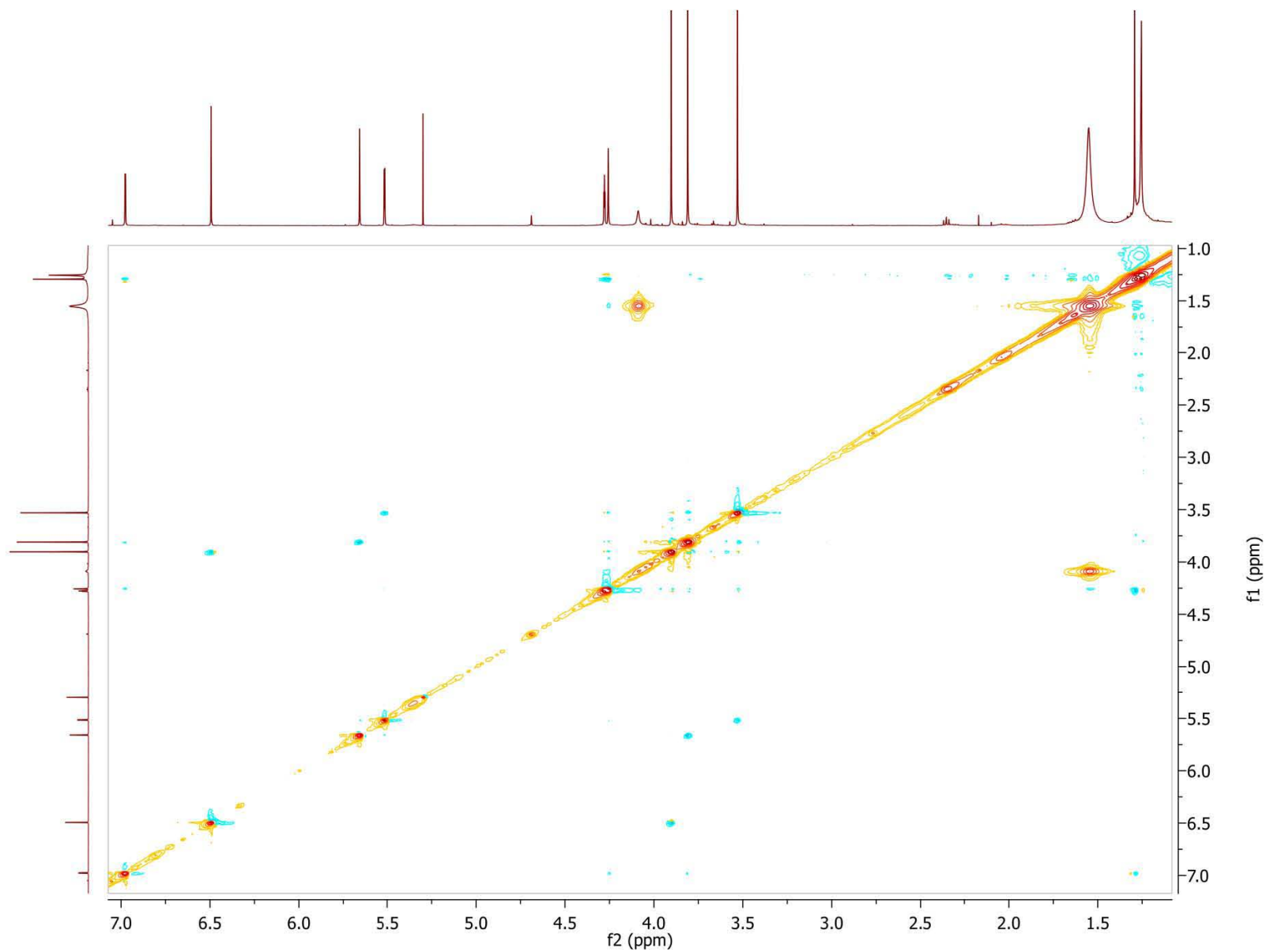
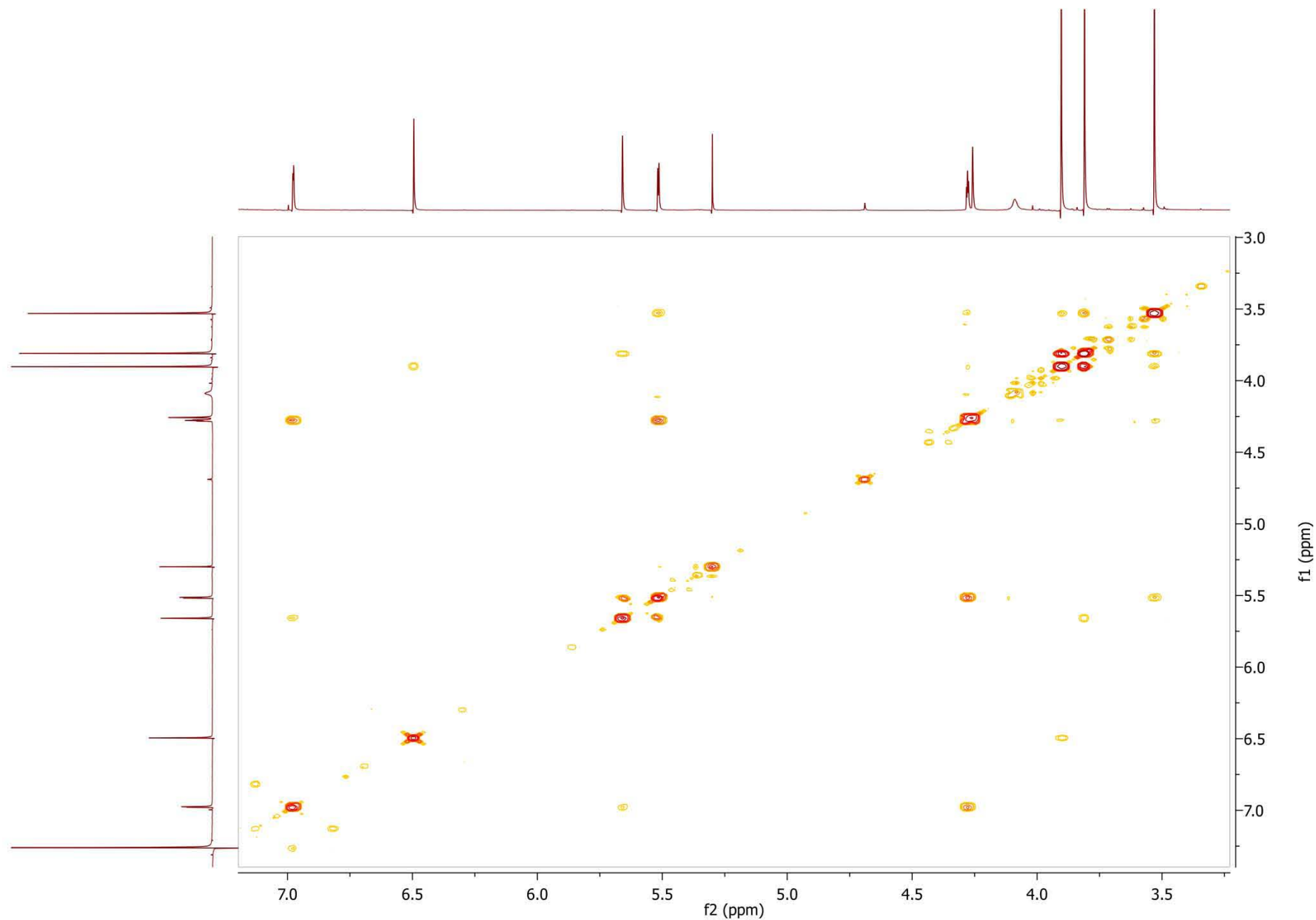


Figura S5. Espectro HMBC de la minimoidiona A (118) en  $\text{CDCl}_3$ .

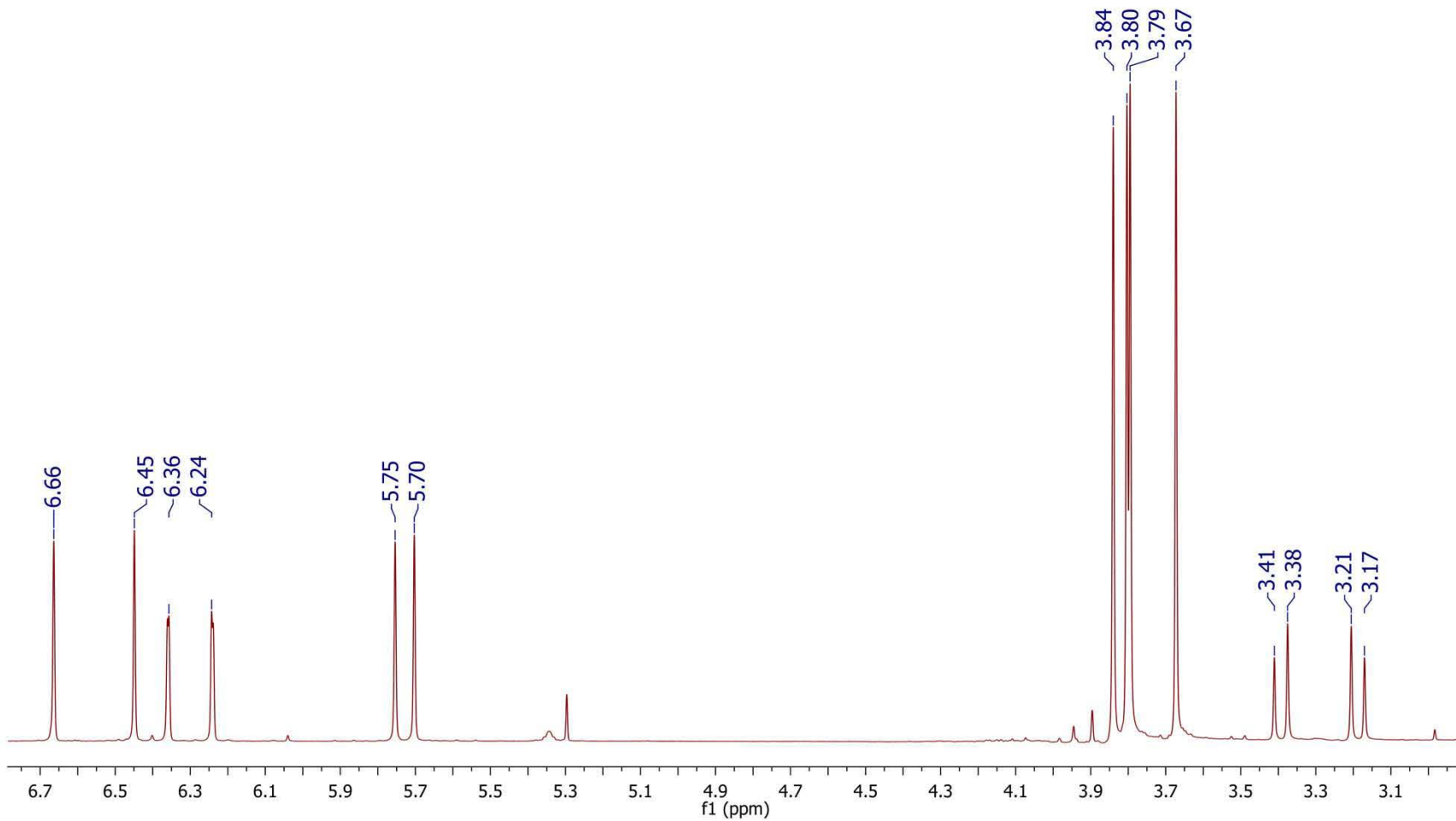


**Figura S6.** Espectro NOESY de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .





**Figura S7.** Espectro COSY de la minimoidiona A (**118**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S8.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la minimoidona B (119) en CDCl<sub>3</sub>.

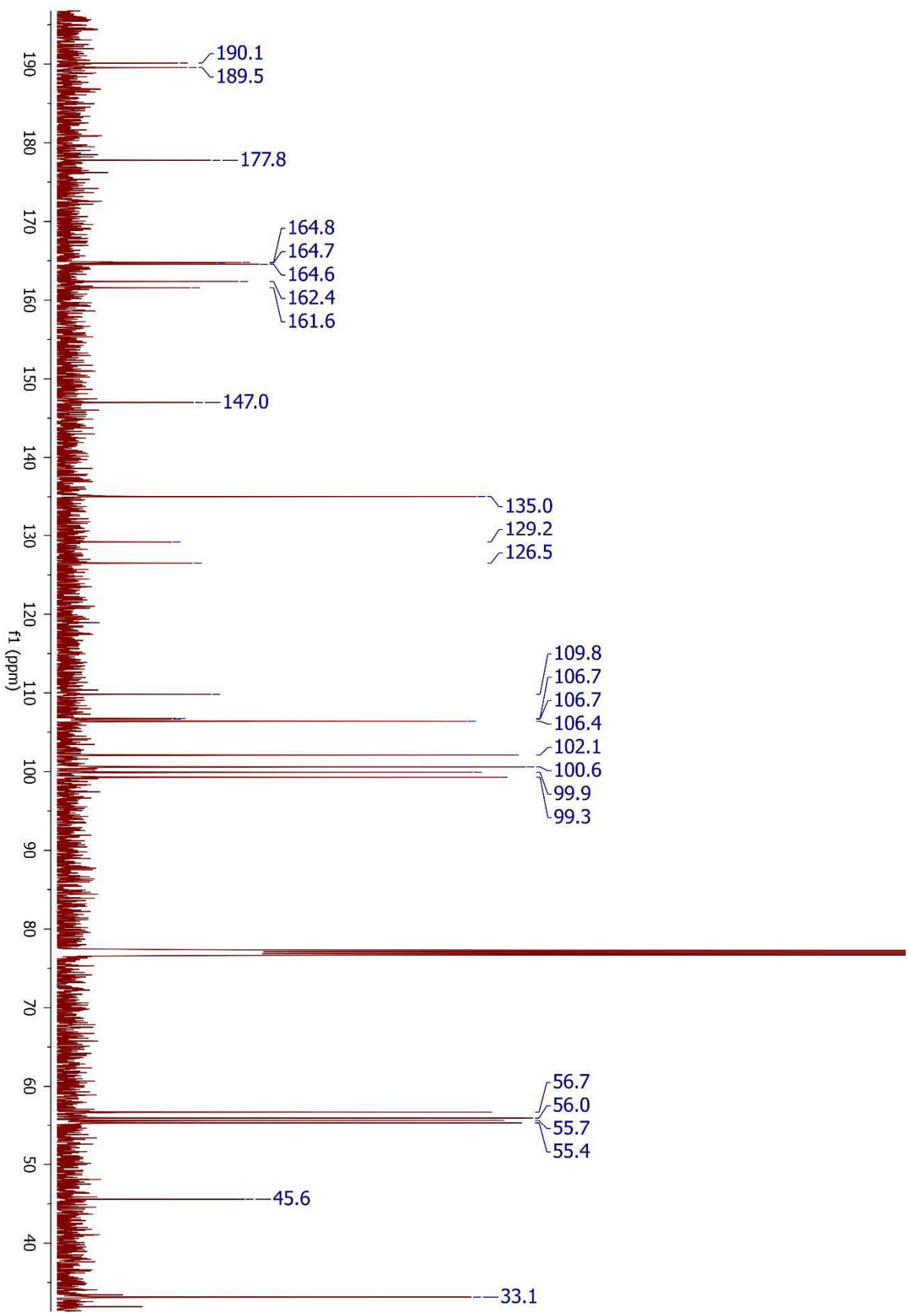


Figura S9. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la minimidiona B (119) en  $\text{CDCl}_3$ .

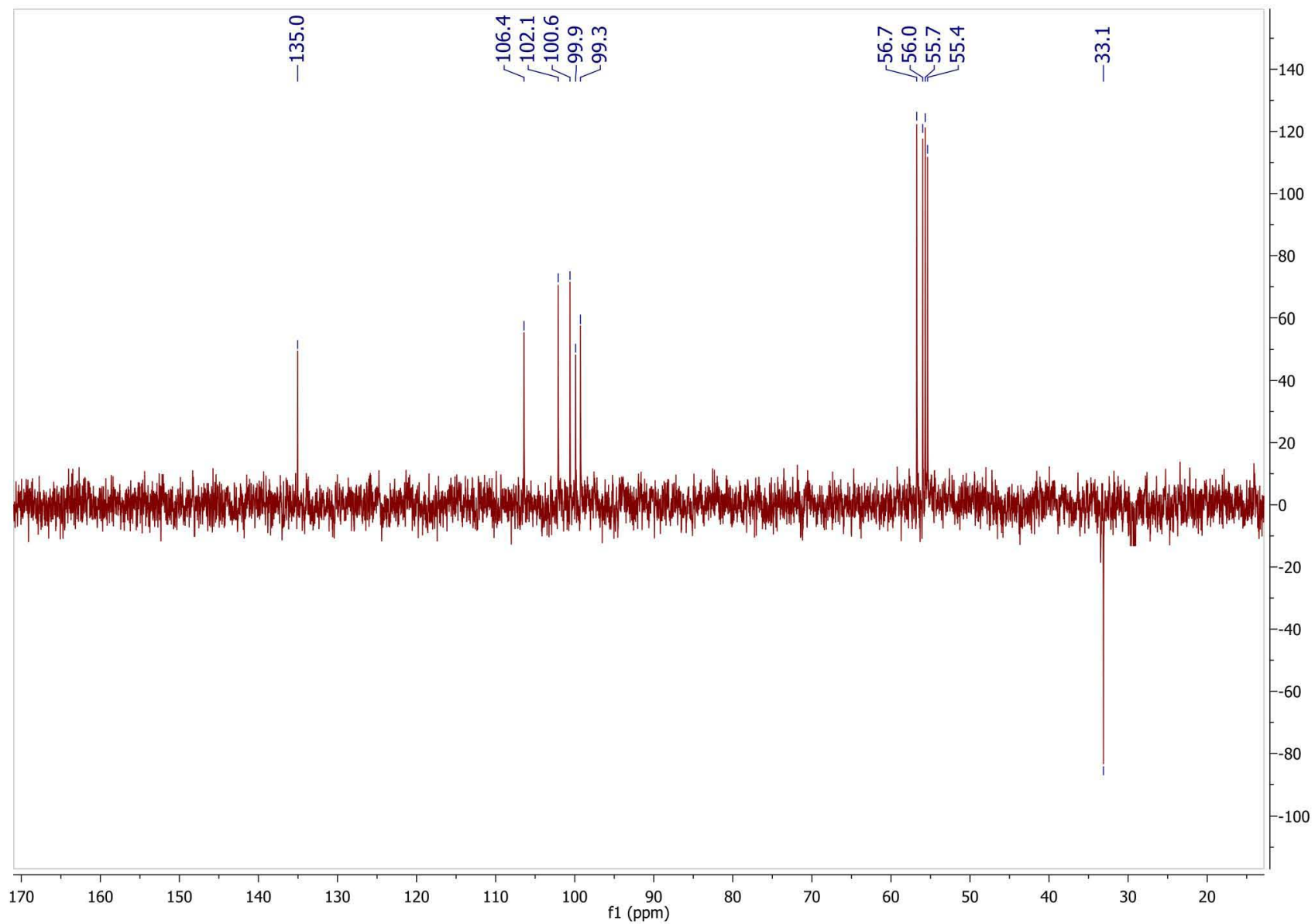


Figura S10. Espectro DEPT-135 de la minimoidona B (119) en CDCl<sub>3</sub>.

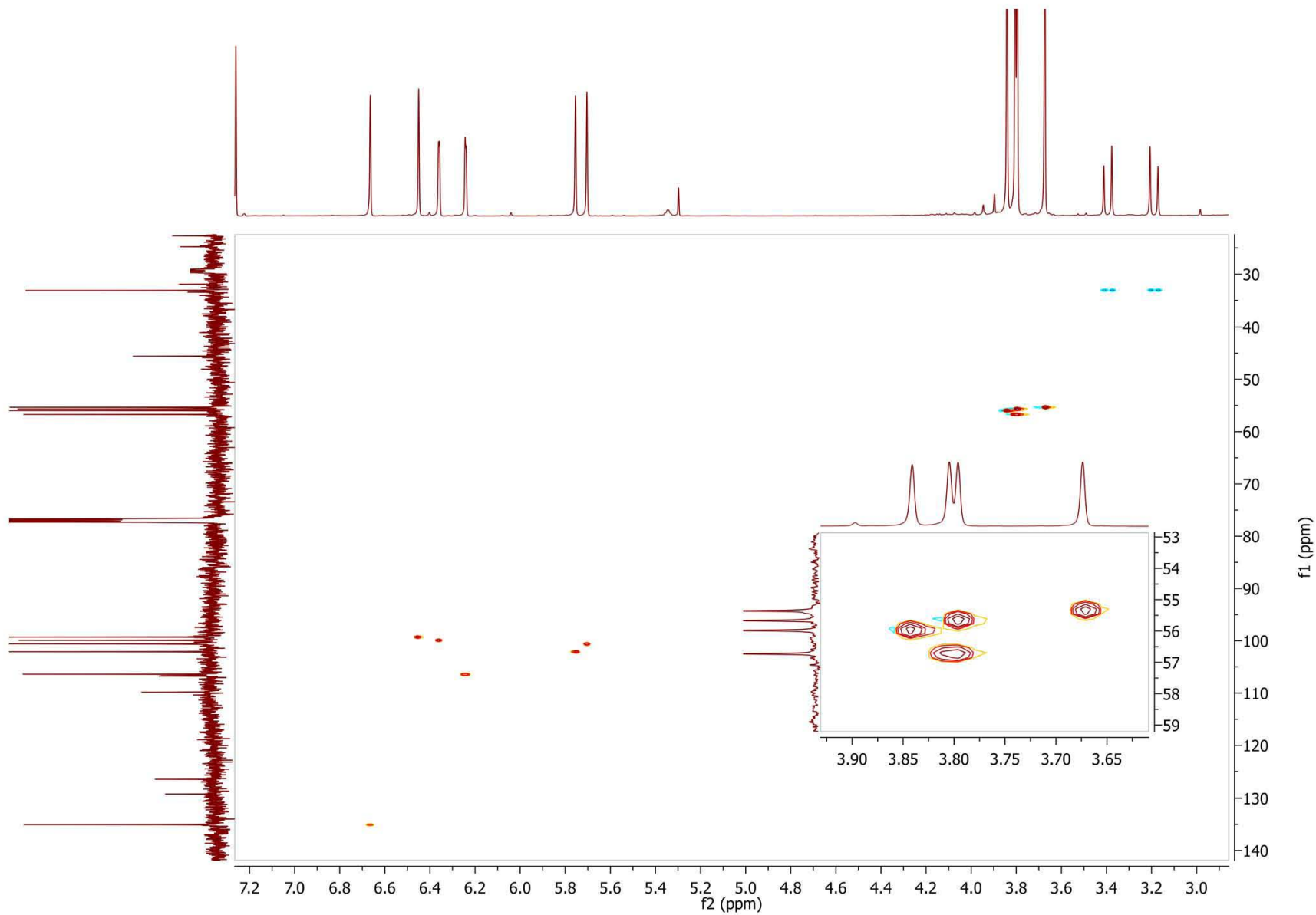


Figura S11. Espectro HSQC de la minimoidiona B (119) en  $\text{CDCl}_3$ .

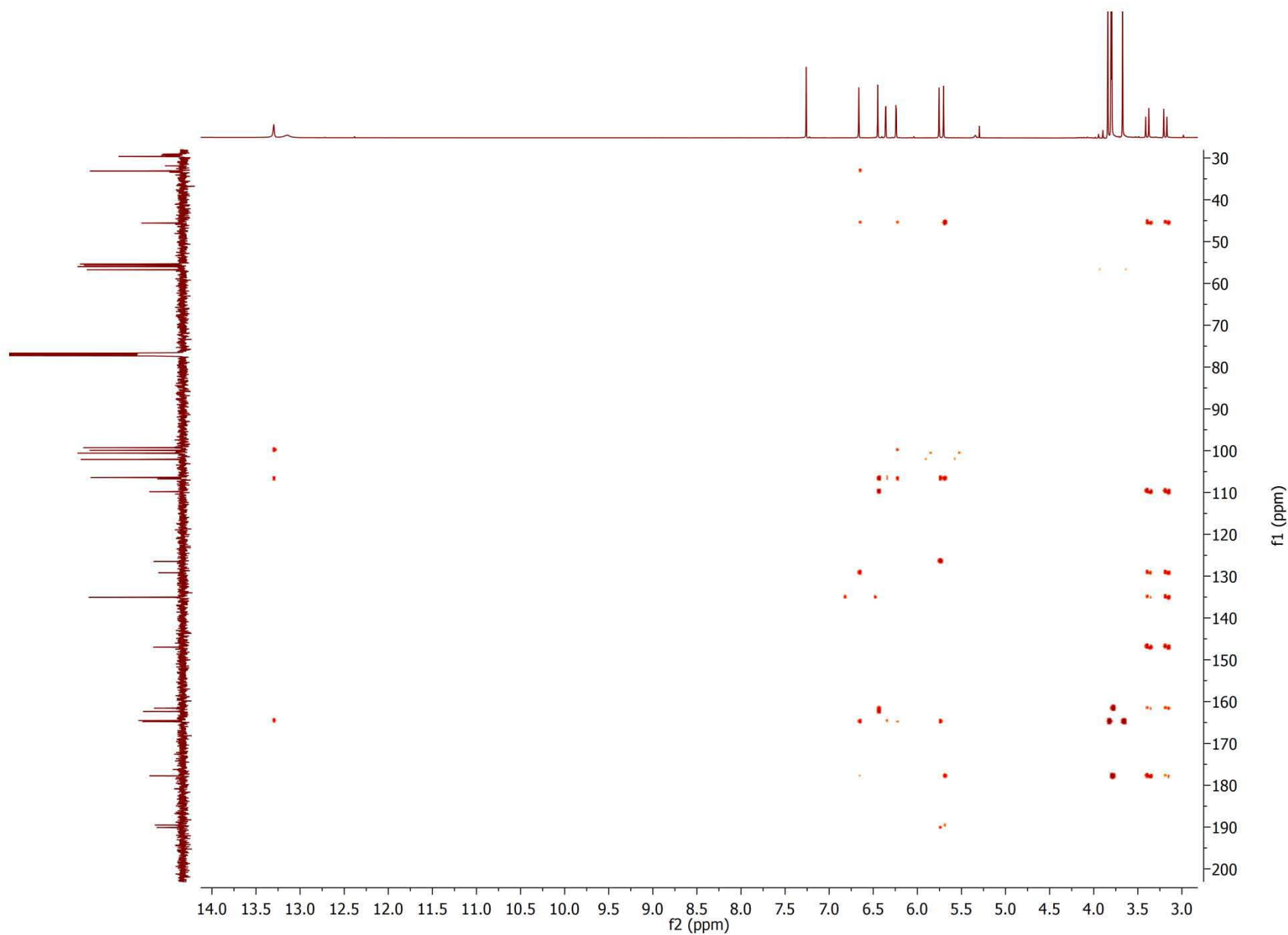
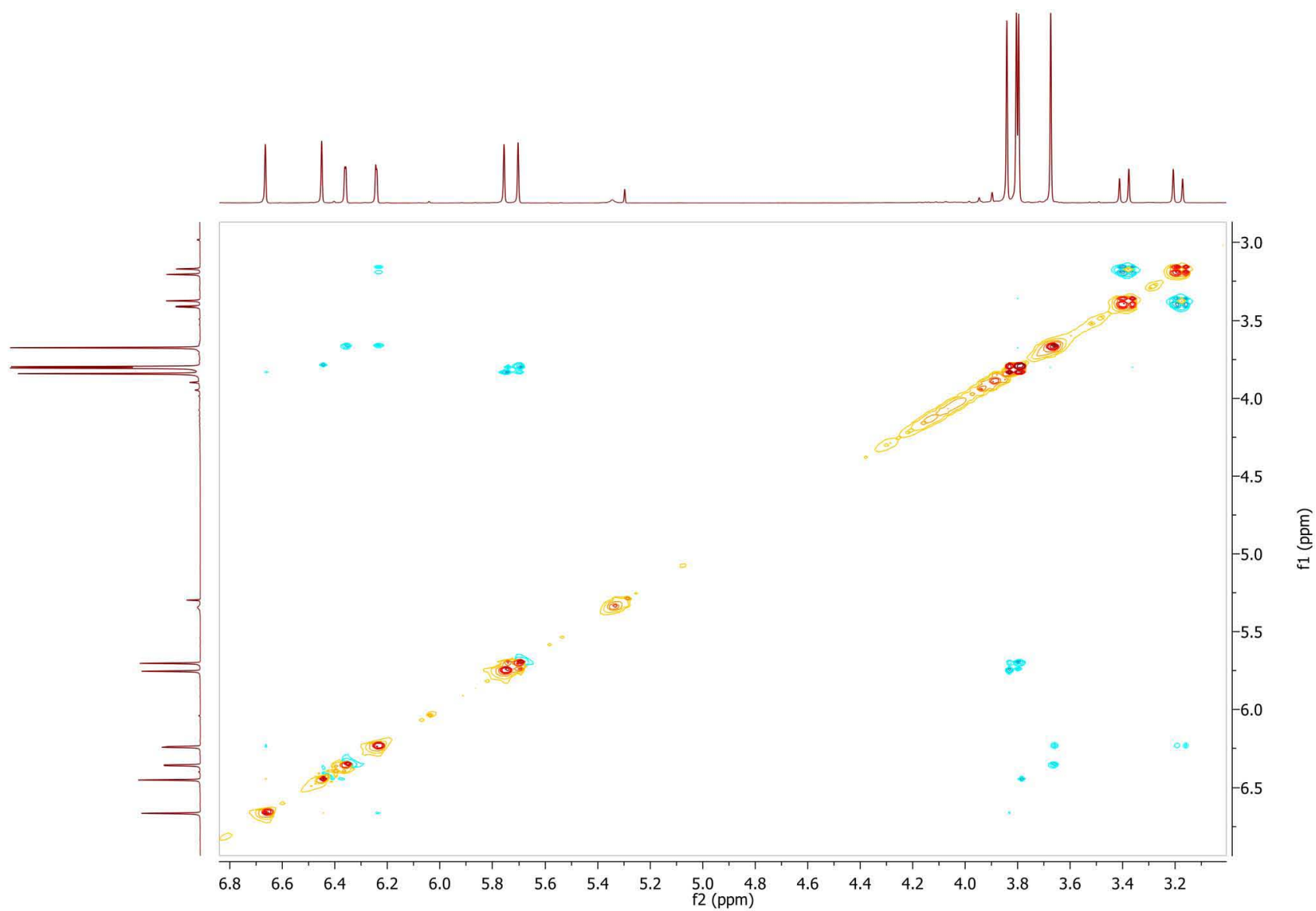


Figura S12. Espectro HMBC de la minimoidona B (119) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura S13.** Espectro NOESY de la minimoidiona B (**119**) en  $\text{CDCl}_3$ .

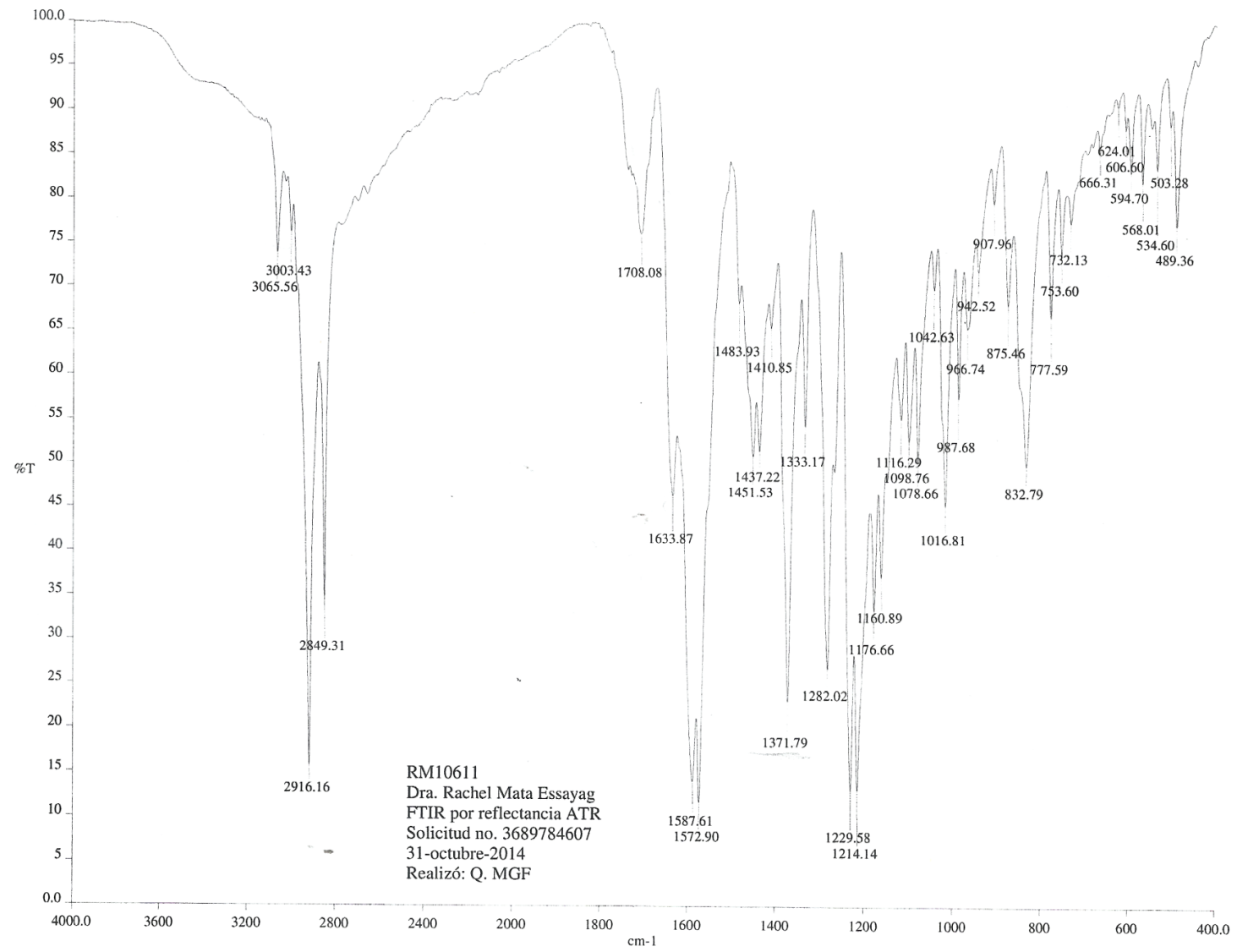


Figura S14. Espectro FTIR de la minimoidona B (119).



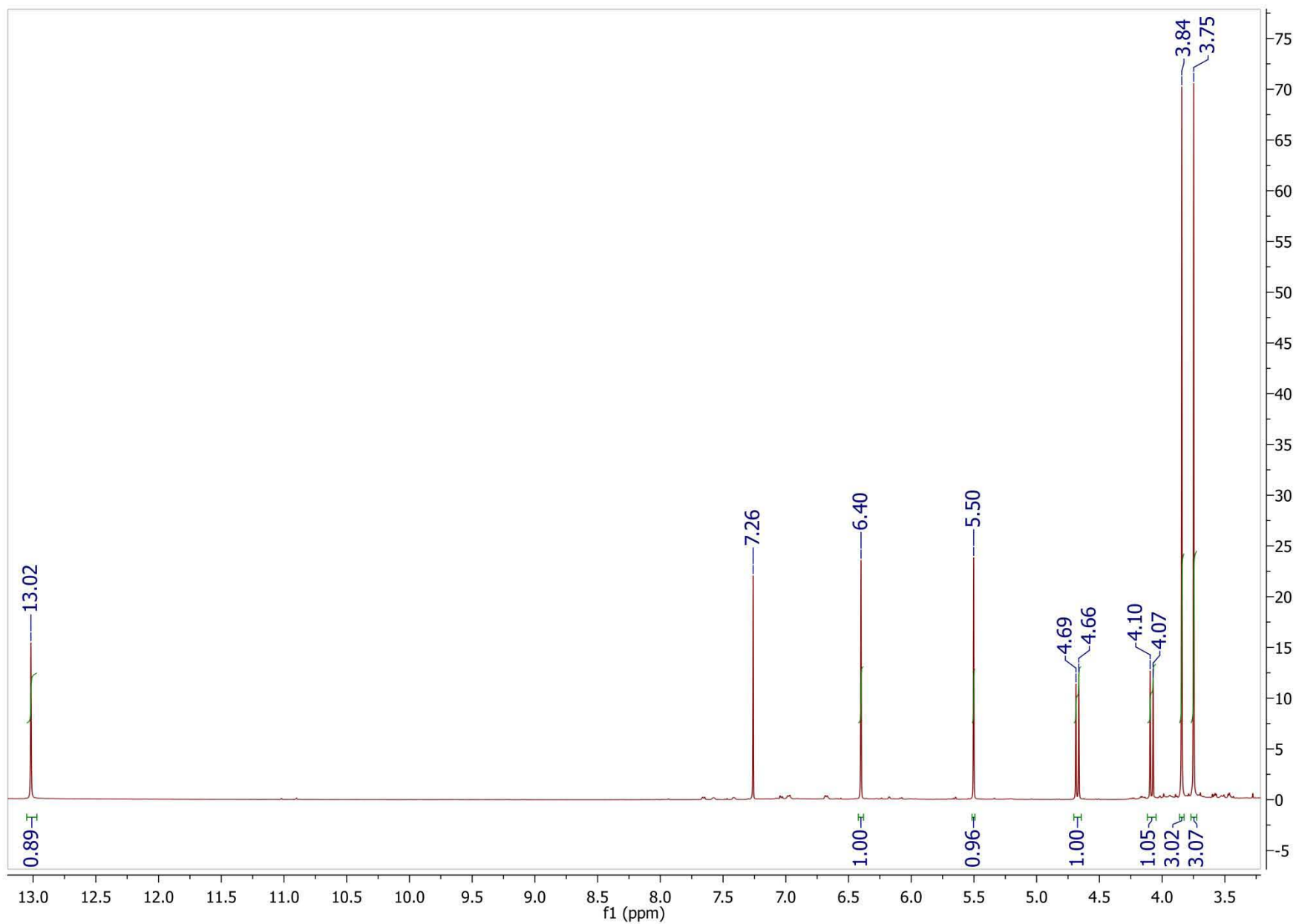
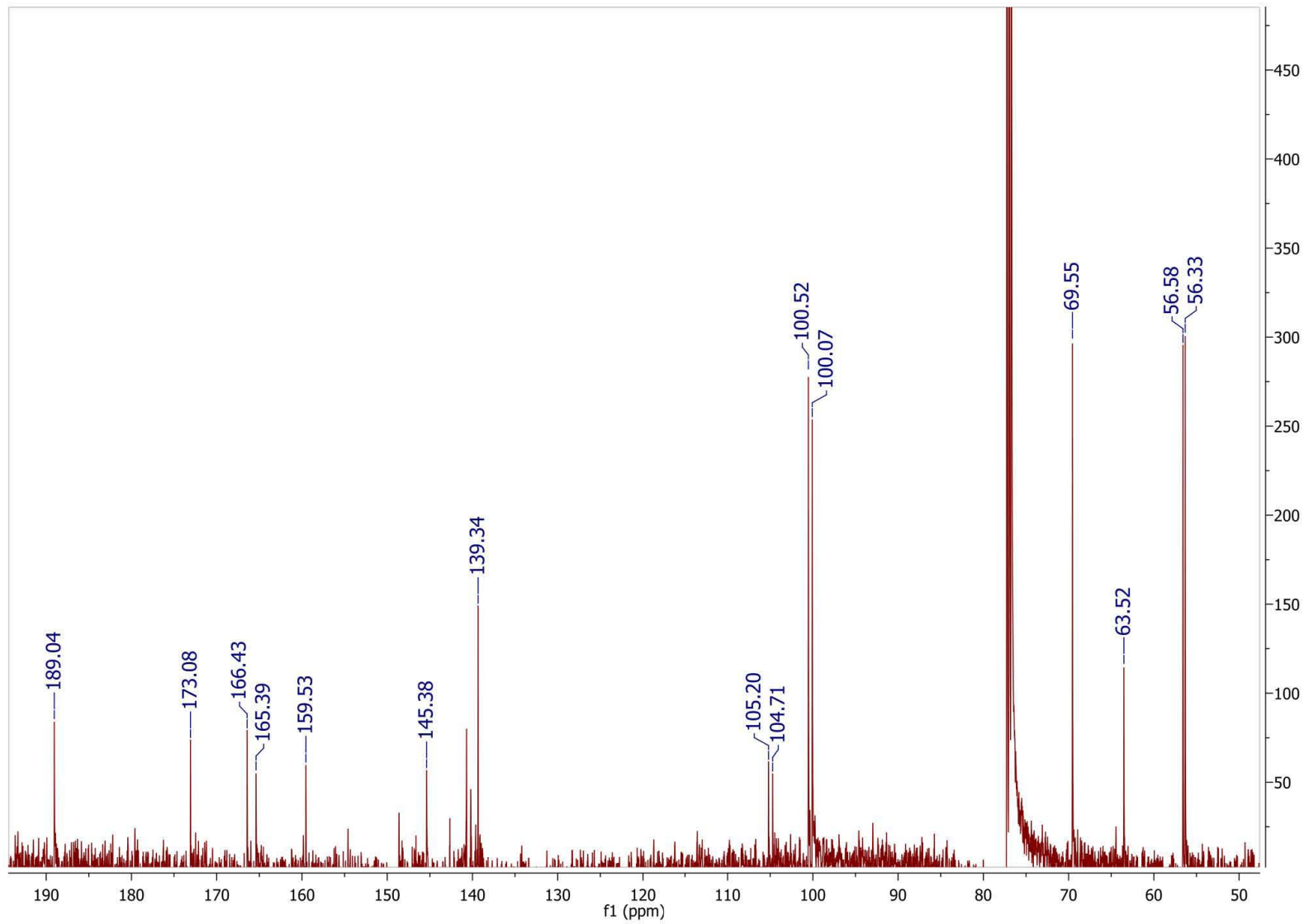
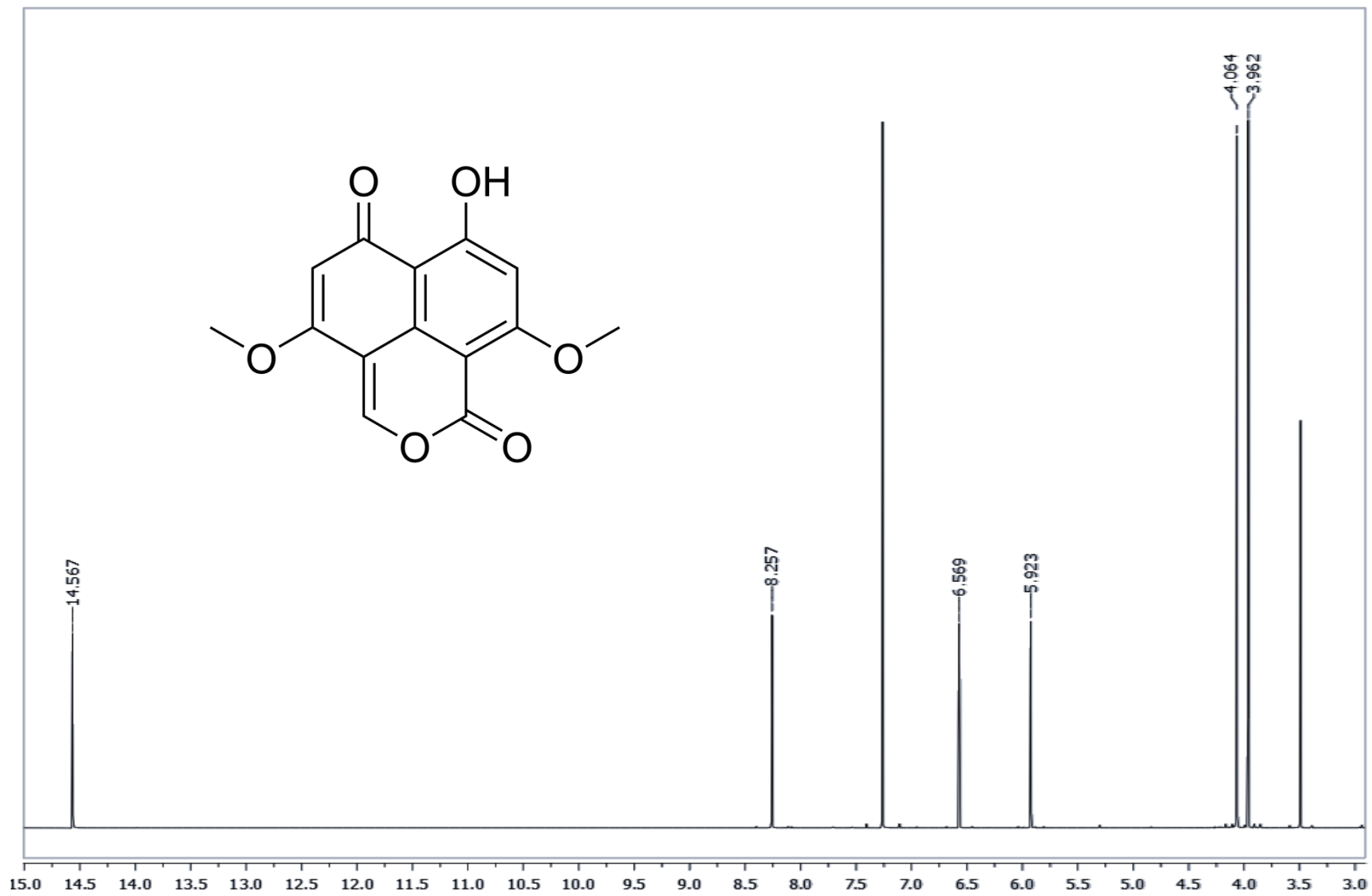


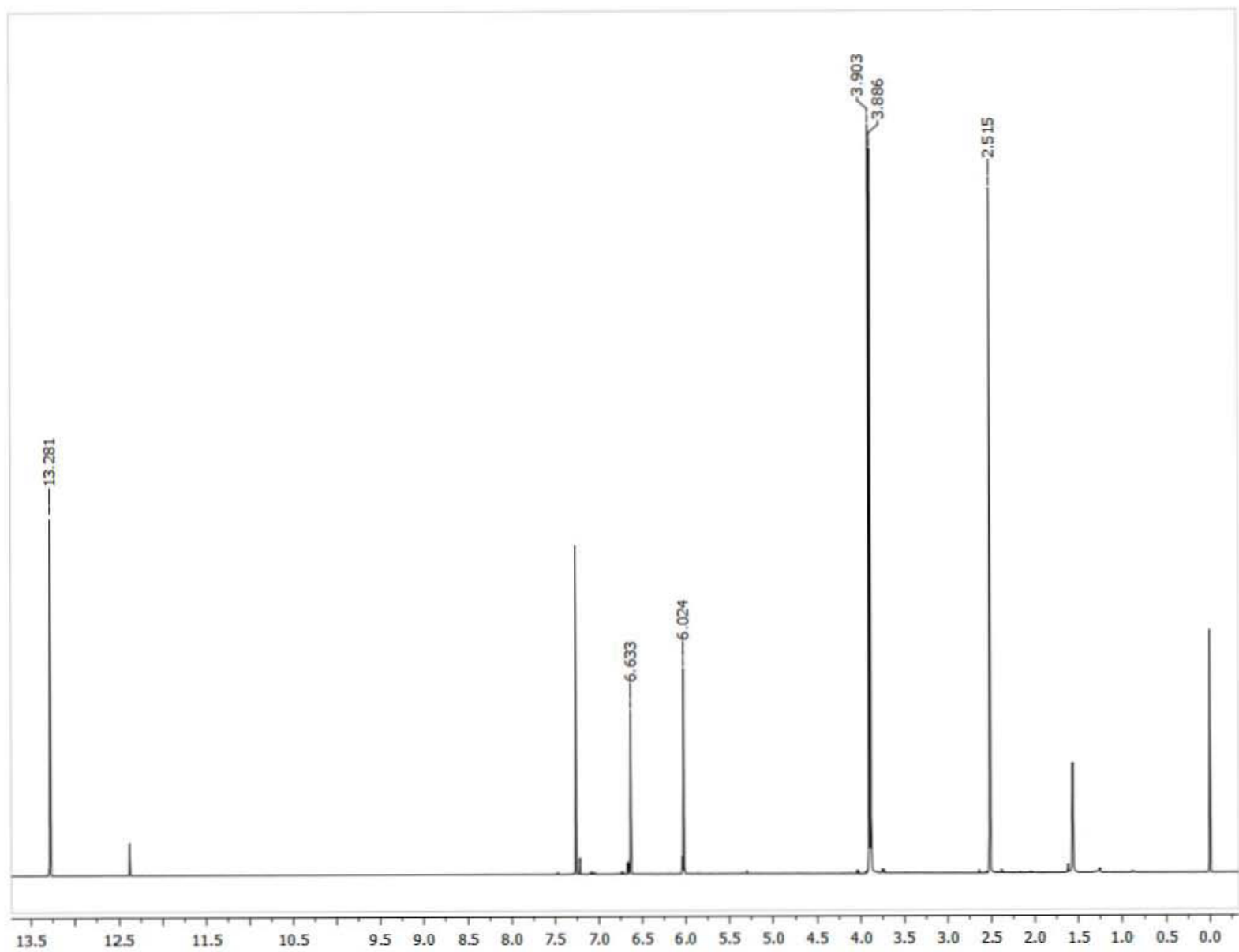
Figura S15. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la preussocromona C (44) en CDCl<sub>3</sub>.





**Figura S16.** Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la preusocromona C (**44**) en CDCl<sub>3</sub>

**Figura S17.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la corimbiferona (**57**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura S18.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de 5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (**63**) en  $\text{CDCl}_3$ .

**Minimoidiona A (118):** (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>) Agujas amarillas; pf: 230-232 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +27.17° (CHCl<sub>3</sub>); UV (MeOH, c 1.81)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 221 (-3.823), 243 (1.844), 258 (-0.121), 268 (0.295), 316 (-0.580) nm; IR (FTIR)  $\nu_{\max}$ : 3640, 3119, 1670, 1616, 1246 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN en **Tabla 2**. HRESIMS  $m/z$  385.1270 [M+H]<sup>+</sup>, calc. 385.1282.

**Minimoidiona B (119):** (C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>) Sólido naranja; p.f.: 280-281 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 0° (CHCl<sub>3</sub>); IR (FTIR)  $\nu_{\max}$ : 3065, 3916, 2956, 1633, 1587, 1572, 1229, 1214 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 13.30 (1H, s, OH-5), 13.14 (1H, s, OH-7'), 6.67 (1H, s, H-2'), 6.45 (1H, s, H-8'), 6.35 (1H, d,  $J$  = 2.5 Hz, H-6), 6.24 (1H, d,  $J$  = 2.5 Hz, H-8), 5.75 (1H, s, H-5'), 5.70 (1H, s, H-3), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 3.81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-2), 3.80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-9'), 3.66 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-7), 3.39 (1H, d,  $J$  = 18 Hz, CH<sub>2</sub>-1' $\alpha$ ), 3.19 (1H, d,  $J$  = 18 Hz, CH<sub>2</sub>-1' $\beta$ ); <sup>13</sup>C-RMN (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 190.1 (C-6'), 189.7 (C-4), 177.8 (C-2), 164.8 (C-4'), 164.7 (C-7), 164.6 (C-5), 162.4 (C-7'), 161.6 (C-9'), 147.0 (C-3a), 135.0 (C-2'), 129.2 (C-8a), 126.5 (C-3'), 109.8 (C-10'), 106.7 (C-4a), 106.7 (C-6a'), 106.4 (C-8), 102.1 (C-5'), 100.6 (C-3), 99.9 (C-6), 99.3 (C-8'), 56.7 (OCH<sub>3</sub>-9), 56.0 (OCH<sub>3</sub>-11'), 55.7 (OCH<sub>3</sub>-12'), 55.4 (OCH<sub>3</sub>-10), 45.6 (C-1), 33.1 (C-1');. HRESIMS  $m/z$  463.1375 [M+H]<sup>+</sup>, calc. 463.1387.

**Preusocromona C (44):** Sólido amarillo; p.f.: 243-245 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +151 (1 mg/mL, MeOH); DC (c 0.01 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 336 (+2.12), 296 (-0.14), 255 (+6.92); <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 13.15 (1H, s, OH-1), 6.53 (1H, s, H-2), 5.63 (1H, s, H-7), 4.81 (1H, d,  $J$  = 12 Hz, CH<sub>2</sub>-10a), 4.21 (1H, d,  $J$  = 12 Hz, CH<sub>2</sub>-10b), 3.97 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-12), 3.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-11); <sup>13</sup>C-RMN (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 189.1 (C-8), 173.1 (C-6), 166.4 (C-1), 165.4 (C-3), 159.5 (C-9), 145.4 (C-4a), 105.2 (C-8a), 104.7 (C-4), 100.5 (C-7), 100.1 (C-2), 69.5 (C-10), 63.5 (C-5), 56.6 (CH<sub>3</sub>O-12), 56.3 (CH<sub>3</sub>O-11); EM-ESI<sup>+</sup>  $m/z$  293 [M+H]<sup>+</sup> (calc. C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>, 292).

**Corimbiferona (57):** Sólido amarillo; p.f.: 255-257 °C; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ : 212, 245, 276, 364 nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3474, 3074, 2949, 1741, 1647, 1588, 1561, 1381  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 14.56 (1H, s, OH-8), 8.25 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-7), 5.92 (1H, s, H-2), 4.06 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -6), 3.96 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -3);  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 188.5 (C-1), 170.4 (C-8), 167.5 (C-6), 165.0 (C-3), 156.0 (C-9), 152.1 (C-10), 136.9 (C-4a), 107.9 (C-4), 105.0 (C-8a), 101.3 (C-2), 99.9 (C-7), 99.6 (C-5), 56.9 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -6), 56.3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -3); EM-FAB  $m/z$  275.0530  $[\text{M}+1]^+$  (calc.  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$ , 275.0550).

**5-hidroxi-2,7-dimetoxi-8-metilnaftoquinona (63):** Sólido naranja; p.f.: 165–167 °C; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 220 (4.51), 265 (4.09), 297 (3.96) nm; IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$ : 3067, 2929, 1678, 1632, 1600, 1434, 1373, 1237  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 13.28 (1H, s, OH-5), 6.63 (1H, s, H-6), 6.02 (1H, s, H-3), 3.90 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -7), 3.88 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -2), 2.52 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -8);  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 189.4 (C, C-4), 181.2 (C, C-1), 164.2 (C, C-7), 162.8 (C, C-5), 161.0 (C, C-2), 128.8 (C, C-8a), 126.8 (C, C-8), 108.4 (C, C-5a), 108.3 (CH, C-3), 104.2 (CH, C-6), 56.5 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ -2), 56.2 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ -7), 12.6 ( $\text{CH}_3$ , C-8); EM-ESI $^+$   $m/z$  249.0680  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , 248.0684).

**Tabla S1.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos de  $^1\text{H}$  NMR para la minimoidiona A (**118**; B3LYP/6-311 + G(2d, p)).

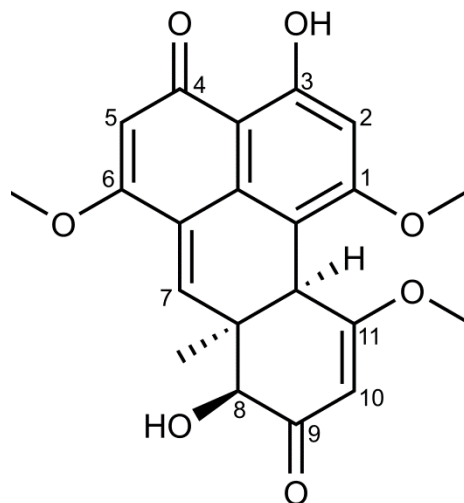
Confórmero	Energía Gauss	Energía (kcal/mol)	$\Delta G$	Fracción molar
01	-1338.917	-840183.58306	0.00000	0.499892
02	-1338.917	-840183.58306	0.00000	0.499892
04	-1338.91	-840178.58181	5.00125	1.08E-04
03	-1338.91	-840178.58055	5.00251	1.08E-04

Confórmero				Desplazamiento químico calculado ( $\delta$ )				$\delta_{\text{calc}}^*$	$\delta_{\text{exp}}$	$ \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}} $
01	02	03	04	$\delta_{01}$	$\delta_{02}$	$\delta_{03}$	$\delta_{04}$			
25.4184	25.4184	25.3457	25.3457	6.18624696	6.18624696	6.25435638	6.25435638	6.19	6.49	0.3037
26.234	26.234	25.6745	25.6746	5.42214727	5.42214727	5.94631816	5.94622447	5.42	5.65	0.2277
24.4064	24.4064	24.5921	24.5919	7.13434514	7.13434514	6.96037099	6.96055837	7.13	6.98	0.1543
27.491	27.491	27.4635	27.4634	4.24451939	4.24451939	4.27028293	4.27037662	4.24	4.28	0.0355
30.8896	30.8896	30.9113	30.9113	1.06052089	1.06052089	1.04019112	1.04019112	1.06	1.28	0.2195
30.8592	30.8591	30.9582	30.9581	1.08900131	1.089095	0.99625258	0.99634626	1.09	1.28	0.1910
30.3637	30.3637	30.3591	30.359	1.55321342	1.55321342	1.55752295	1.55761664	1.55	1.28	0.2732
27.481	27.481	27.4467	27.4466	4.25388795	4.25388795	4.28602211	4.2861198	4.25	4.25	0.0039
26.3332	26.3332	26.2392	26.2392	5.32921117	5.32921117	5.41727562	5.41727562	5.33	5.5	0.1708
27.9543	27.9543	27.9509	27.9508	3.81047405	3.81047405	3.81365936	3.81375304	3.81	5.30	1.4895
18.1785	18.1784	18.3402	18.3399	12.9689901	12.9690838	12.8175005	12.8177815	12.97	13.21	0.2410
28.1613	28.1613	28.2214	28.2217	3.61654488	3.61654488	3.56023984	3.55995878	3.62	3.80	0.1835
27.802	27.802	27.7555	27.7554	3.9531572	3.9531572	3.996721	3.99681469	3.95	3.80	0.1532
28.1716	28.1716	28.4389	28.4389	3.60689526	3.60689526	3.35647367	3.35647367	3.61	3.80	0.1932
28.0393	28.0718	28.0474	28.0478	3.7308413	3.70039348	3.72325276	3.72287802	3.72	3.90	0.1844
28.0718	27.7726	28.1222	28.122	3.70039348	3.98070077	3.65317594	3.65336331	3.84	3.90	0.0595
27.7726	28.0393	27.6663	27.6663	3.98070077	3.7308413	4.08028855	4.08028855	3.86	3.90	0.0442
28.1307	28.5082	28.1098	28.5549	3.64521267	3.29154956	3.66479295	3.24779839	3.47	3.53	0.0616
28.505	28.1307	28.4957	28.1099	3.2945475	3.64521267	3.30326026	3.66469927	3.47	3.53	0.0601
28.5082	28.505	28.5549	28.4957	3.29154956	3.2945475	3.24779839	3.30326026	3.29	3.53	0.2370

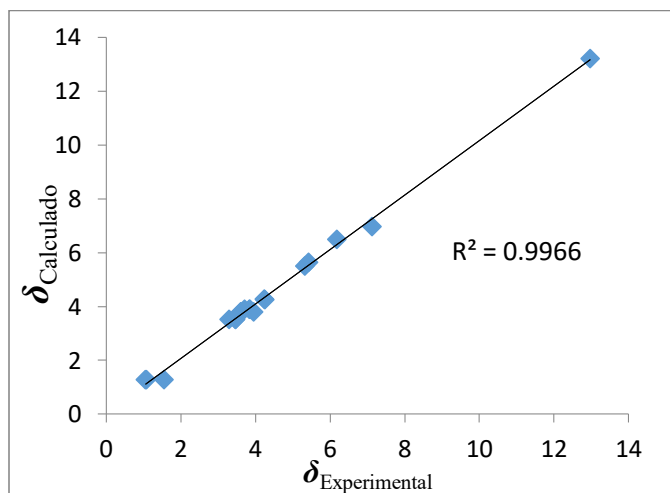
\*Calculado utilizando B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-311+G(2d,p).

**Tabla S2.** Comparación de datos de  $^1\text{H}$  RMN calculados y experimentales para **118**.

Posición	$\delta_{\text{H Exp}}$	$\delta_{\text{H Calc}}^*$
2	6.49	6.19
5	5.65	5.42
7	6.98	7.13
8	4.25	4.25
10	5.50	5.33
11a	4.28	4.24
1-OCH <sub>3</sub>	3.90	3.87
6-OCH <sub>3</sub>	3.80	3.72
11-OCH <sub>3</sub>	3.53	3.41
7a-CH <sub>3</sub>	1.28	1.23
3-OH	13.21	12.97
MAE	0.158	



\*Los desplazamientos químicos fueron calculados utilizando los factores de escalamiento (pendiente = -1.0674, intercepto = 32.0216) correspondientes a los tensores calculados para  $^1\text{H}$  RMN al nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p).



$$\text{MAE} = |\Delta\delta_{\text{ave}}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{\text{comp}} - \delta_i^{\text{exp}}|$$

Erros absoluto promedio (MAE ): 0.158



**Tabla S3.** Cálculos DCE para el enantiómero 7aS, 8S,11aS de **118**.

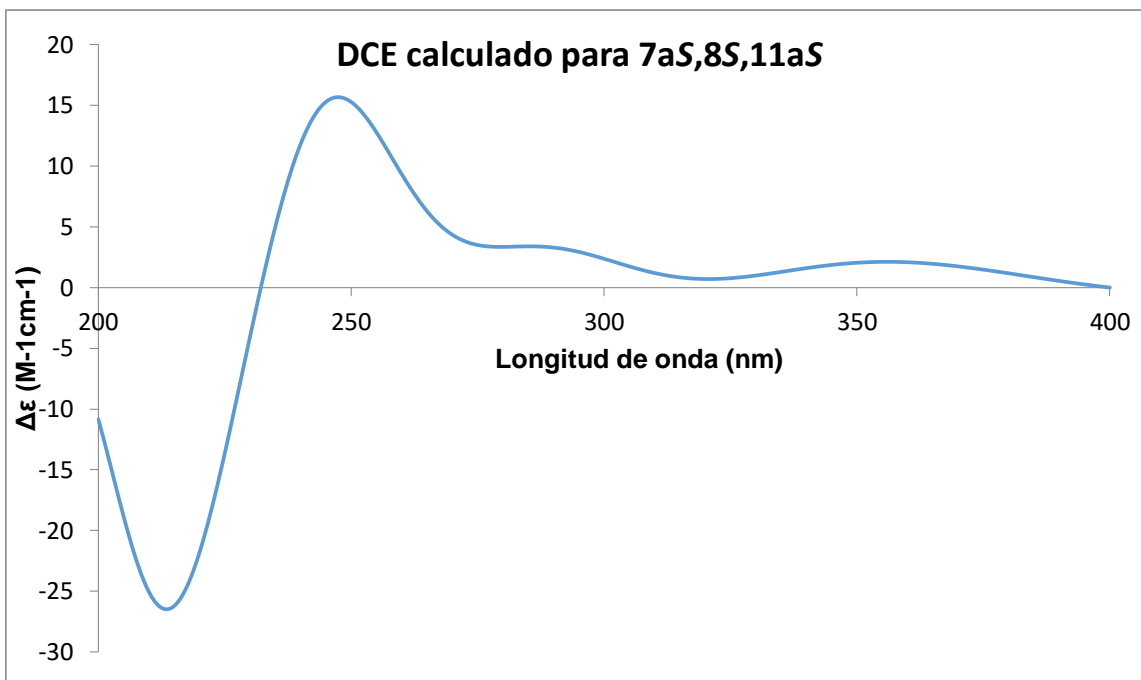
		Confórmero					
		1	2	3	4		
$\Delta G^a$		0	0	4.743	4.741	Valores ponderados <sup>d</sup>	$\lambda(\text{nm})^e$
P(%) <sup>b</sup>		49.98	49.98	0.02	0.02		
n-estados <sup>c</sup>	1	-5.711	-5.711	0.071	1.01	-5.709	415.564
	2	13.707	13.707	40.183	59.118	13.72	352.95
	3	-0.917	-0.917	-26.022	-41.551	-0.929	330.375
	4	-3.205	-3.204	1.58	0.993	-3.203	329.18
	5	2.871	2.871	-0.439	-0.363	2.87	318.324
	6	-31.171	-31.173	-45.596	-1.429	-31.169	300.221
	7	40.434	40.435	52.548	-15.149	40.426	292.981
	8	4.608	4.608	10.126	26.242	4.612	284.751
	9	-2.952	-2.952	-1.86	-2.16	-2.951	280.661
	10	10.116	10.116	-7.219	-2.32	10.11	267.994
	11	-45.18	-45.179	8.044	-4.275	-45.162	262.462
	12	7.836	7.835	-14.377	9.083	7.832	258.211
	13	22.316	22.317	-6.076	-4.665	22.306	256.3
	14	-15.158	-15.158	-29.079	-5.416	-15.159	252.68
	15	72.34	72.338	13.482	3.818	72.316	246.511
	16	26.981	26.983	92.552	-5.54	26.988	232.845
	17	-65.025	-65.027	-27.92	1.21	-65.007	231.851
	18	19.253	19.253	-9.582	77.071	19.259	229.23
	19	33.936	33.935	2.836	-1.8	33.923	226.67
	20	-28.349	-28.339	-7.36	-5.988	-28.336	224.53
	21	-15.015	-15.026	85.198	5.479	-14.999	224.119
	22	-1.86	-1.859	3.204	0.42	-1.858	221.339
	23	33.986	33.986	-18.418	-0.485	33.97	219.809
	24	-23.998	-24	5.157	-10.902	-23.991	216.28
	25	-42.527	-42.523	-83.157	-59.659	-42.535	214.97
	26	-10.63	-10.629	-0.483	-10.505	-10.628	214.539
	27	-2.357	-2.358	-10.299	-12.206	-2.361	211.6
	28	17.316	17.308	1.833	27.959	17.311	209.569
	29	-23.766	-23.758	-8.522	-1.45	-23.755	209.289
	30	-6.661	-6.662	2.304	0.439	-6.658	206.99

<sup>a</sup>DFT B3LYP/6-31+G(d) Energías libres de Gibbs en kcal mol<sup>-1</sup> relativas al valor absoluto global para el mínimo -840032.1537 kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>Porcentaje de los valores  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>DFT B3LYP/6-31+G(d) valores de fuerza rotatoria expresados en  $R(\text{len})$ . <sup>d</sup>Calculados con la ecuación  $\sum iR(\text{len})_i \times P_i$ , donde  $R(\text{len})_i$  es el valor teórico de  $R(\text{len})$  calculado para los estados de excitación  $n = 1-30$  y  $P_i$  es la población para el Confórmero  $i$ . <sup>e</sup>Estado de excitación promedio.

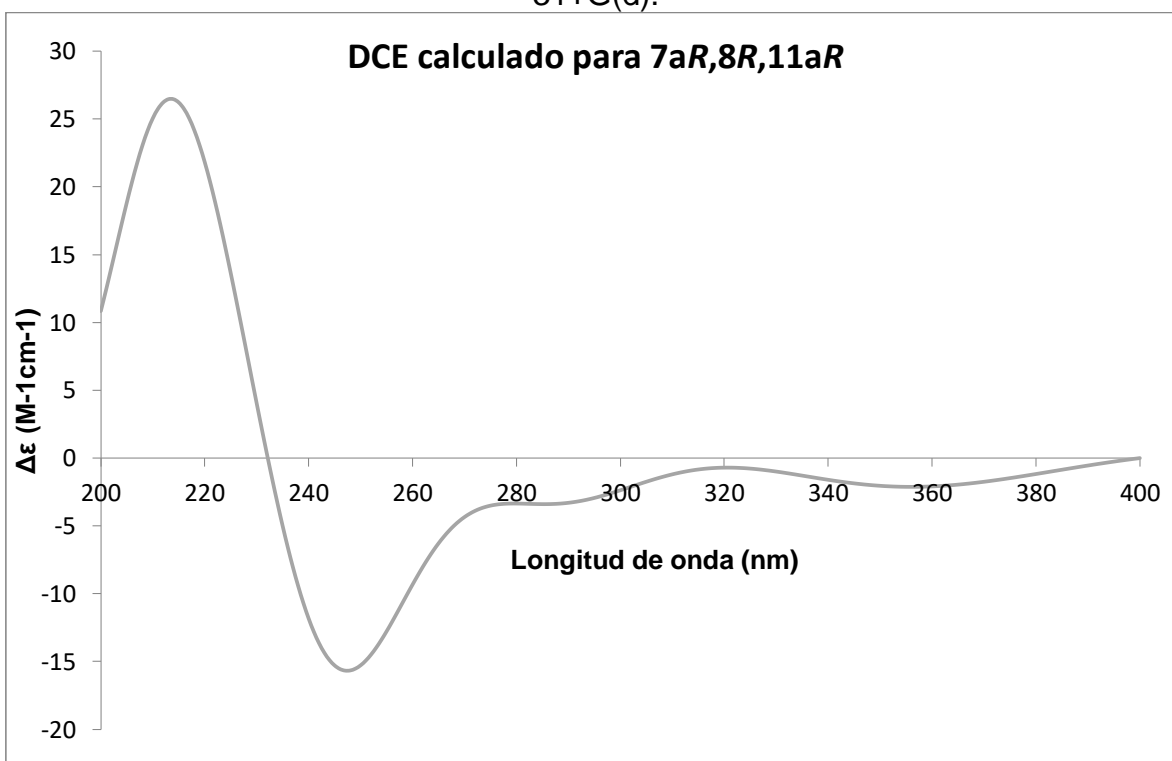
**Tabla S4.** Cálculos DCE para el enantiómero 7aR, 8R,11aR de 118.

		Confórmero					
		1	2	3	4		
$\Delta G^a$		0	0	4.743	4.741	Valores ponderados <sup>d</sup>	$\lambda(\text{nm})^e$
P(%) <sup>b</sup>		49.98	49.98	0.02	0.02		
n-estados <sup>c</sup>	1	5.711	5.711	-0.071	-1.010	5.709	415.564
	2	-13.707	-13.707	-40.183	-59.118	-13.720	352.95
	3	0.917	0.917	26.022	41.551	0.929	330.375
	4	3.205	3.204	-1.580	-0.993	3.203	329.18
	5	-2.871	-2.871	0.439	0.363	-2.870	318.324
	6	31.171	31.173	45.596	1.429	31.169	300.221
	7	-40.434	-40.435	-52.548	15.149	-40.426	292.981
	8	-4.608	-4.608	-10.126	-26.242	-4.612	284.751
	9	2.952	2.952	1.860	2.160	2.951	280.661
	10	-10.116	-10.116	7.219	2.320	-10.110	267.994
	11	45.180	45.179	-8.044	4.275	45.162	262.462
	12	-7.836	-7.835	14.377	-9.083	-7.832	258.211
	13	-22.316	-22.317	6.076	4.665	-22.306	256.3
	14	15.158	15.158	29.079	5.416	15.159	252.68
	15	-72.340	-72.338	-13.482	-3.818	-72.316	246.511
	16	-26.981	-26.983	-92.552	5.540	-26.988	232.845
	17	65.025	65.027	27.920	-1.210	65.007	231.851
	18	-19.253	-19.253	9.582	-77.071	-19.259	229.23
	19	-33.936	-33.935	-2.836	1.800	-33.923	226.67
	20	28.349	28.339	7.360	5.988	28.336	224.53
	21	15.015	15.026	-85.198	-5.479	14.999	224.119
	22	1.860	1.859	-3.204	-0.420	1.858	221.339
	23	-33.986	-33.986	18.418	0.485	-33.970	219.809
	24	23.998	24.000	-5.157	10.902	23.991	216.28
	25	42.527	42.523	83.157	59.659	42.535	214.97
	26	10.630	10.629	0.483	10.505	10.628	214.539
	27	2.357	2.358	10.299	12.206	2.361	211.6
	28	-17.316	-17.308	-1.833	-27.959	-17.311	209.569
	29	23.766	23.758	8.522	1.450	23.755	209.289
	30	6.661	6.662	-2.304	-0.439	6.658	206.99

<sup>a</sup>DFT B3LYP/6-31+G(d) Energías libres de Gibbs en kcal mol<sup>-1</sup> relativas al valor absoluto global para el mínimo -840032.1537 kcal mol<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>Porcentaje de los valores  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>DFT B3LYP/6-31+G(d) valores de fuerza rotatoria expresados en  $R(\text{len})$ . <sup>d</sup>Calculados con la ecuación  $\sum iR(\text{len})_i \times P_i$ , donde  $R(\text{len})_i$  es el valor teórico de  $R(\text{len})$  calculado para los estados de excitación  $n = 1-30$  y  $P_i$  es la población para el Confórmero  $i$ . <sup>e</sup>Estado de excitación promedio.



**Figura S21.** DCE calculado para el enantiómero 7a*S*,8*S*,11a*S* de **118** (B3LYP/ 6-31+G(d)).



**Figura S22.** DCE calculado para el enantiómero 7a*R*,8*R*,11a*R* de **118** (B3LYP/ 6-31+G(d)).

**Tabla S5.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos de  $^1\text{H}$  NMR para el enantiómero *R* de minimoidiona B (**119**; B3LYP/6-311 + G(2d, p)).

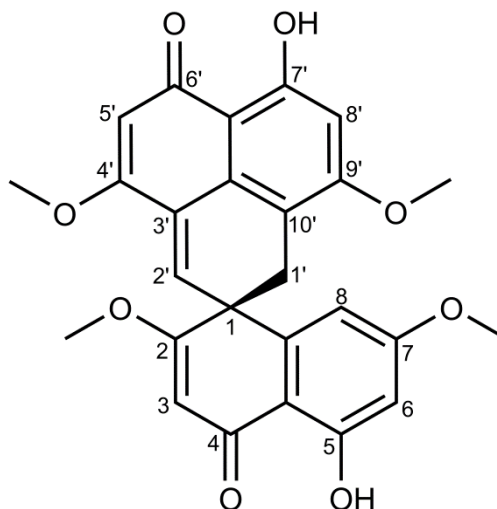
Confórmeros	Energía Gauss	Energía (kcal/mol)	$\Delta G$	Fracción molar
1	-1605.912417	-1007725.47	0.00	0.3679715
2	-1605.912298	-1007725.40	0.07	0.2979745
4	-1605.911725	-1007725.04	0.43	0.1758294
3	-1605.911618	-1007724.97	0.50	0.1582246

Confórmeros				Desplazamientos químicos calculados ( $\delta$ )				$\delta_{\text{calc}}^*$	$\delta_{\text{exp}}$	$ \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}} $
01	02	03	04	$\delta_{01}$	$\delta_{02}$	$\delta_{03}$	$\delta_{04}$			
25.3947	25.5191	25.3794	25.2929	6.20845044	6.09190556	6.22278434	6.30382237	6.19	6.36	0.1641
25.3519	25.7241	25.6406	25.4295	6.24854787	5.8998501	5.97807757	6.17584785	6.09	6.24	0.1537
26.3886	26.0781	25.9862	26.389	5.27730935	5.56820311	5.65430017	5.27693461	5.42	5.70	0.2792
28.7284	28.7656	28.7277	28.7055	3.08525389	3.05040285	3.08590969	3.10670789	3.08	3.19	0.1101
28.3736	28.6768	28.5449	28.3813	3.41765037	3.13359565	3.25716695	3.41043657	3.31	3.39	0.0875
25.134	24.7947	24.8138	25.1162	6.45268878	6.77056399	6.75267004	6.46936481	6.60	6.66	0.0659
26.1652	26.1359	26.0287	26.1343	5.48660296	5.51405284	5.61448379	5.51555181	5.52	5.75	0.2338
25.3816	25.4171	25.3712	25.3549	6.22072325	6.18746487	6.23046655	6.24573731	6.22	6.45	0.2321
17.9757	17.9201	18.3085	18.302	13.1589844	13.2110736	12.8471988	12.8532884	13.07	13.30	0.2272
28.0671	28.1252	28.179	28.0594	3.7047967	3.65036537	3.59996253	3.71201049	3.67	3.79	0.1216
28.0592	28.1645	28.2656	28.0511	3.71219786	3.61354694	3.5188308	3.7197864	3.65	3.79	0.1414
27.7667	27.8719	27.9628	27.7495	3.98622822	3.88767098	3.80251077	4.00234214	3.93	3.79	0.1357
27.8571	27.7599	27.7791	27.851	3.90153644	3.99259884	3.9746112	3.90725126	3.94	3.84	0.1013
28.2354	28.1669	28.1137	28.2188	3.54712385	3.61129848	3.66113922	3.56267566	3.59	3.84	0.2529
28.2343	28.2205	27.95	28.2187	3.54815439	3.56108301	3.81450253	3.56276935	3.60	3.84	0.2432
28.1235	28.3524	28.7544	28.2259	3.65195803	3.43751171	3.06089563	3.55602398	3.48	3.67	0.1949
28.1085	28.3526	28.5618	28.2609	3.66601087	3.43732434	3.24133408	3.52323403	3.51	3.67	0.1670
27.8766	28.0052	28.1685	27.9317	3.88326775	3.76278808	3.60979951	3.83164699	3.80	3.67	0.1224
28.3915	28.0663	28.1732	28.3765	3.40088064	3.70554619	3.60539629	3.41493348	3.53	3.80	0.2770
28.2079	27.7904	27.7235	28.1835	3.57288739	3.96402473	4.02670039	3.59574667	3.77	3.80	0.0382
28.4171	28.1349	28.2778	28.3821	3.37689713	3.64127787	3.50740116	3.40968709	3.48	3.80	0.3214
18.2267	18.1742	18.1985	18.1953	12.9238336	12.9730185	12.950253	12.9532509	12.95	13.14	0.1954

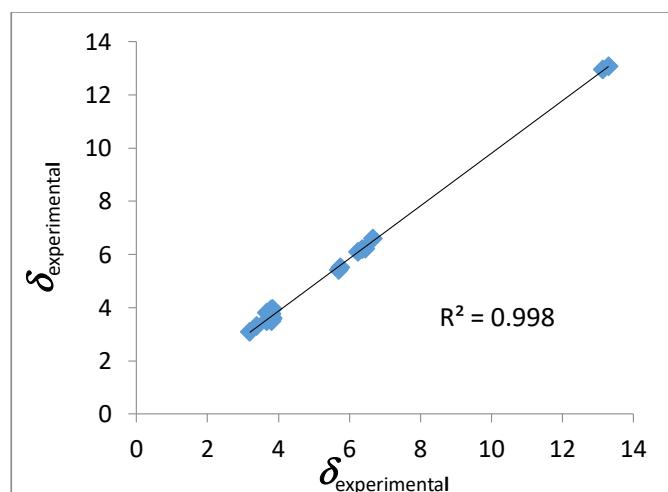
\*Calculados con B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-311+G(2d,p).

**Tabla S6.** Comparación de los datos de  $^1\text{H}$  RMN calculados y experimentales para el enantiómero *R* de **119**.

Posición	$\delta_{\text{H Exp}}$	$\delta_{\text{H Calc}}^*$
3	5.70	5.42
6	6.36	6.19
9	3.80	3.59
10	3.67	3.59
1'	3.19	3.08
	3.39	3.31
2'	6.66	6.60
5'	5.75	5.52
8'	6.45	6.22
11'	3.84	3.71
12'	3.79	3.75
5-OH	13.30	13.07
7'-OH	13.14	12.95
MAE	0.166	



\*Los desplazamientos químicos fueron calculados utilizando los factores de escalamiento (pendiente = -1.0674, intercepto = 32.0216) correspondientes a los tensores calculados para  $^1\text{H}$  RMN al nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p).



$$\text{MAE} = |\Delta\delta_{\text{ave}}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{\text{comp}} - \delta_i^{\text{exp}}|$$

Error absoluto promedio (MAE): 0.166

**Tabla S7.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos de  $^1\text{H}$  NMR para el enantiómero S de la minimoidiona B (**119**; B3LYP/6-311 + G(2d, p)).

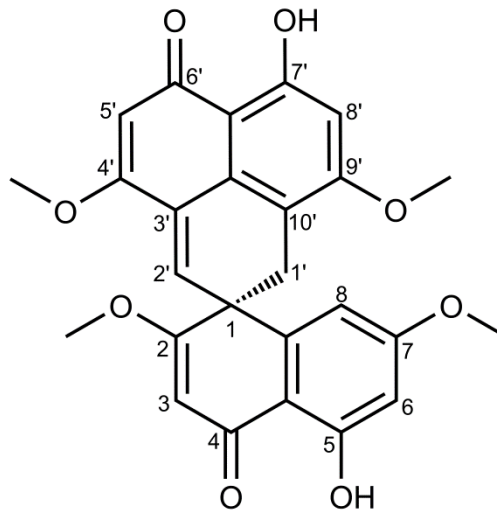
Confórmeros	Energía Gauss	Energía (kcal/mol)	$\Delta G$	Fracción molar
1	-1605.912417	-1007725.471	0.00	0.5
3	-1605.912417	-1007725.471	0.00	0.5
2	-1605.911725	-1007725.037	0.43	0

Confórmeros			Desplazamientos químicos calculados ( $\delta$ )					
01	02	03	$\delta_{01}$	$\delta_{02}$	$\delta_{03}$	$\delta_{\text{calc}}^*$	$\delta_{\text{exp}}$	$ \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}} $
25.3816	25.3549	25.3816	6.22072325	6.24573731	6.22072325	6.22	6.45	0.2282
26.1652	26.1343	26.1653	5.48660296	5.51555181	5.48650927	5.49	5.75	0.2673
25.134	25.1162	25.134	6.45268878	6.46936481	6.45268878	6.45	6.66	0.2110
28.7284	28.7055	28.7284	3.08525389	3.10670789	3.08525389	3.09	3.19	0.1036
28.3736	28.3813	28.3736	3.41765037	3.41043657	3.41765037	3.42	3.39	0.0239
25.3519	25.4295	25.3519	6.24854787	6.17584785	6.24854787	6.25	6.24	0.0057
25.3947	25.293	25.3947	6.20845044	6.30372869	6.20845044	6.21	6.36	0.1484
26.3886	26.389	26.3886	5.27730935	5.27693461	5.27730935	5.28	5.70	0.4255
17.9758	18.302	17.9758	13.1588908	12.8532884	13.1588908	13.16	13.30	0.1397
18.2268	18.1954	18.2266	12.9237399	12.9531572	12.9239273	12.92	13.14	0.2194
28.0592	28.0511	28.0592	3.71219786	3.7197864	3.71219786	3.71	3.79	0.0827
28.0671	28.0594	28.0671	3.7047967	3.71201049	3.7047967	3.70	3.79	0.0901
27.7667	27.7495	27.7667	3.98622822	4.00234214	3.98622822	3.99	3.79	0.1913
28.2354	28.2188	28.2354	3.54712385	3.56267566	3.54712385	3.55	3.84	0.2928
27.8571	27.8511	27.8571	3.90153644	3.90715758	3.90153644	3.90	3.84	0.0616
28.2343	28.2188	28.2343	3.54815439	3.56267566	3.54815439	3.55	3.84	0.2917
28.3916	28.3765	28.3916	3.40078696	3.41493348	3.40078696	3.40	3.80	0.4027
28.4171	28.3821	28.4171	3.37689713	3.40968709	3.37689713	3.38	3.80	0.4266
28.2079	28.1835	28.2079	3.57288739	3.59574667	3.57288739	3.57	3.80	0.2306
27.8766	27.9316	27.8766	3.88326775	3.83174068	3.88326775	3.88	3.67	0.2107
28.1085	28.2608	28.1085	3.66601087	3.52332771	3.66601087	3.67	3.67	0.0066
28.1235	28.2259	28.1235	3.65195803	3.55602398	3.65195803	3.65	3.67	0.0206

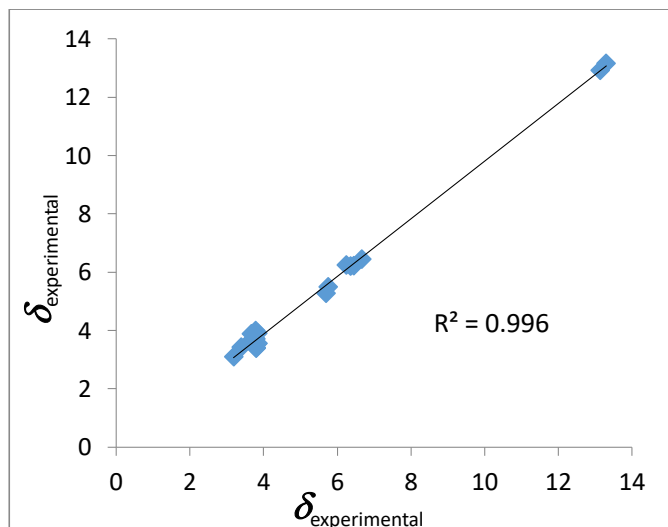
\*Calculados con B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-311+G(2d,p).

**Tabla S8.** Comparación de los datos de  $^1\text{H}$  RMN calculados y experimentales para el enantiómero S de **119**.

Posición	$\delta_{\text{H Exp}}$	$\delta_{\text{H Calc}}^*$
3	5.70	5.28
6	6.36	6.21
8	6.24	6.25
9	3.80	3.45
10	3.67	3.73
1'	3.19	3.09
	3.39	3.42
2'	6.66	6.45
5'	5.75	5.49
8'	6.45	6.22
11'	3.84	3.67
12'	3.79	3.80
5-OH	13.30	13.16
7'-OH	13.14	12.92
MAE	0.169	



\*Los desplazamientos químicos fueron calculados utilizando los factores de escalamiento (pendiente = -1.0674, intercepto = 32.0216) correspondientes a los tensores calculados para  $^1\text{H}$  RMN al nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p).



$$\text{MAE} = |\Delta\delta_{\text{ave}}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{\text{comp}} - \delta_i^{\text{exp}}|$$

Erros absoluto promedio (MAE): 0.169

**Tabla S10.** Datos del cristal y refinamiento de la estructura de la Minimoidiona A (**119**).

Codigo de identificación	072XYZ16	
Formula empírica	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	
Formula (masa)	384.37	
Temperatura	150(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínica	
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> /n	
Dimensiones de la celda unitaria	a = 9.1302(13) Å	α = 90°.
	b = 15.476(2) Å	β = 109.085(3)°.
	c = 13.420(2) Å	γ = 90°.
Volumen	1792.0(4) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.425 Mg/m <sup>3</sup>	
Coeficiente de absorción	0.107 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	808	
Tamaño del cristal	0.273 x 0.118 x 0.076 mm <sup>3</sup>	
Rango Theta para colección de datos	2.382 to 25.193°.	
Rangos de índice	-10<=h<=10, -18<=k<=18, -16<=l<=15	
Reflexiones colectadas	10832	
Reflexiones independientes	3193 [R(int) = 0.1193]	
Integridad de theta = 25.193°	99.0 %	
Método de afinamiento	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Datos / restricciones / parámetros	3193 / 2 / 263	
Calidad de ajuste en F <sup>2</sup>	0.970	
Indices finales de R [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0568, wR2 = 0.1138	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1021, wR2 = 0.1404	
Dif.pico y agujero más grandes	0.354 and -0.426 e.Å <sup>-3</sup>	

Coordenadas atómicas ( $\times 10^4$ ) y parámetros equivalentes de desplazamiento isotrópico ( $\text{Å}^2 \times 10^3$ ) para la minimoidiona A (**118**).  $U(\text{eq})$  se define como un tercio de la traza del tensor como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado  $U^j$ .



	x	y	z	U(eq)
O(1)	7495(2)	6098(1)	10434(1)	32(1)
O(2)	8813(2)	6064(1)	8998(2)	32(1)
O(3)	5736(2)	3495(1)	11925(1)	31(1)
O(4)	4343(2)	1091(1)	8919(2)	45(1)
O(5)	6836(2)	339(1)	10311(2)	47(1)
O(6)	10245(2)	2321(1)	9545(1)	27(1)
O(7)	9226(2)	3315(1)	7507(1)	27(1)
C(1)	7281(3)	5297(2)	10344(2)	24(1)
C(2)	6659(3)	4834(2)	11052(2)	25(1)
C(3)	6323(3)	3982(2)	10913(2)	23(1)
C(4)	6529(3)	3503(2)	10030(2)	22(1)
C(5)	5844(3)	2736(2)	9712(2)	26(1)
C(6)	5965(3)	2275(2)	8759(2)	26(1)
C(7)	7564(3)	2464(2)	8642(2)	22(1)
C(8)	7888(3)	3430(2)	8720(2)	21(1)
C(9)	8726(3)	3839(2)	8145(2)	21(1)
C(10)	9024(3)	4723(2)	8243(2)	23(1)
C(11)	8505(3)	5204(2)	8928(2)	22(1)
C(12)	7707(3)	4812(2)	9545(2)	21(1)
C(13)	7403(3)	3918(2)	9420(2)	20(1)
C(14)	5825(3)	1295(2)	8870(2)	30(1)
C(15)	7113(3)	928(2)	9780(2)	31(1)
C(16)	8634(3)	1272(2)	9969(2)	31(1)
C(17)	8860(3)	1974(2)	9447(2)	25(1)
C(18)	5482(3)	3904(2)	12418(2)	36(1)
C(19)	4662(3)	2584(2)	7775(2)	36(1)
C(20)	11615(3)	1905(2)	10227(2)	37(1)
C(21)	10226(3)	3676(2)	6986(2)	36(1)

Tamaño de enlaces [Å] y ángulos [°] para la minimoidiona A (**118**).

O(1)-C(1)	1.254(3)	C(7)-H(7)	1.0000
O(2)-C(11)	1.358(3)	C(8)-C(13)	1.385(3)
O(2)-H(2A)	0.859(10)	C(8)-C(9)	1.403(3)
O(3)-C(3)	1.349(3)	C(9)-C(10)	1.393(3)
O(3)-C(18)	1.439(3)	C(10)-C(11)	1.381(3)
O(4)-C(14)	1.412(3)	C(10)-H(10)	0.9500
O(4)-H(4)	0.860(10)	C(11)-C(12)	1.407(3)
O(5)-C(15)	1.233(3)	C(12)-C(13)	1.409(3)
O(6)-C(17)	1.340(3)	C(14)-C(15)	1.503(4)
O(6)-C(20)	1.438(3)	C(14)-H(14)	1.0000
O(7)-C(9)	1.361(3)	C(15)-C(16)	1.430(4)
O(7)-C(21)	1.433(3)	C(16)-C(17)	1.345(3)
C(1)-C(2)	1.446(4)	C(16)-H(16)	0.9500
C(1)-C(12)	1.461(3)	C(18)-H(18A)	0.9800
C(2)-C(3)	1.354(3)	C(18)-H(18B)	0.9800
C(2)-H(2)	0.9500	C(18)-H(18C)	0.9800
C(3)-C(4)	1.461(3)	C(19)-H(19A)	0.9800
C(4)-C(5)	1.343(3)	C(19)-H(19B)	0.9800
C(4)-C(13)	1.466(3)	C(19)-H(19C)	0.9800
C(5)-C(6)	1.501(4)	C(20)-H(20A)	0.9800
C(5)-H(5)	0.9500	C(20)-H(20B)	0.9800
C(6)-C(14)	1.533(3)	C(20)-H(20C)	0.9800
C(6)-C(19)	1.536(4)	C(21)-H(21A)	0.9800
C(6)-C(7)	1.547(4)	C(21)-H(21B)	0.9800
C(7)-C(17)	1.519(3)	C(21)-H(21C)	0.9800
C(7)-C(8)	1.521(3)		
C(11)-O(2)-H(2A)	104(2)	C(3)-C(2)-C(1)	120.8(2)
C(3)-O(3)-C(18)	117.8(2)	C(3)-C(2)-H(2)	119.6
C(14)-O(4)-H(4)	105(2)	C(1)-C(2)-H(2)	119.6
C(17)-O(6)-C(20)	118.6(2)	O(3)-C(3)-C(2)	125.3(2)
C(9)-O(7)-C(21)	118.2(2)	O(3)-C(3)-C(4)	113.2(2)
O(1)-C(1)-C(2)	120.5(2)	C(2)-C(3)-C(4)	121.5(2)
O(1)-C(1)-C(12)	120.5(2)	C(5)-C(4)-C(3)	122.3(2)
C(2)-C(1)-C(12)	118.9(2)	C(5)-C(4)-C(13)	119.5(2)

C(3)-C(4)-C(13)	117.9(2)	O(4)-C(14)-H(14)	107.2
C(4)-C(5)-C(6)	122.3(2)	C(15)-C(14)-H(14)	107.2
C(4)-C(5)-H(5)	118.9	C(6)-C(14)-H(14)	107.2
C(6)-C(5)-H(5)	118.9	O(5)-C(15)-C(16)	122.9(3)
C(5)-C(6)-C(14)	110.9(2)	O(5)-C(15)-C(14)	119.7(2)
C(5)-C(6)-C(19)	109.4(2)	C(16)-C(15)-C(14)	117.4(2)
C(14)-C(6)-C(19)	109.0(2)	C(17)-C(16)-C(15)	120.9(3)
C(5)-C(6)-C(7)	109.3(2)	C(17)-C(16)-H(16)	119.6
C(14)-C(6)-C(7)	108.0(2)	C(15)-C(16)-H(16)	119.6
C(19)-C(6)-C(7)	110.2(2)	O(6)-C(17)-C(16)	125.0(2)
C(17)-C(7)-C(8)	110.69(19)	O(6)-C(17)-C(7)	111.1(2)
C(17)-C(7)-C(6)	112.0(2)	C(16)-C(17)-C(7)	123.9(2)
C(8)-C(7)-C(6)	110.4(2)	O(3)-C(18)-H(18A)	109.5
C(17)-C(7)-H(7)	107.9	O(3)-C(18)-H(18B)	109.5
C(8)-C(7)-H(7)	107.9	H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
C(6)-C(7)-H(7)	107.9	O(3)-C(18)-H(18C)	109.5
C(13)-C(8)-C(9)	118.7(2)	H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
C(13)-C(8)-C(7)	119.0(2)	H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(9)-C(8)-C(7)	122.2(2)	C(6)-C(19)-H(19A)	109.5
O(7)-C(9)-C(10)	123.3(2)	C(6)-C(19)-H(19B)	109.5
O(7)-C(9)-C(8)	119.7(2)	H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5
C(10)-C(9)-C(8)	121.0(2)	C(6)-C(19)-H(19C)	109.5
C(11)-C(10)-C(9)	119.6(2)	H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5
C(11)-C(10)-H(10)	120.2	H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5
C(9)-C(10)-H(10)	120.2	O(6)-C(20)-H(20A)	109.5
O(2)-C(11)-C(10)	117.7(2)	O(6)-C(20)-H(20B)	109.5
O(2)-C(11)-C(12)	121.2(2)	H(20A)-C(20)-H(20B)	109.5
C(10)-C(11)-C(12)	121.0(2)	O(6)-C(20)-H(20C)	109.5
C(11)-C(12)-C(13)	118.2(2)	H(20A)-C(20)-H(20C)	109.5
C(11)-C(12)-C(1)	121.6(2)	H(20B)-C(20)-H(20C)	109.5
C(13)-C(12)-C(1)	120.2(2)	O(7)-C(21)-H(21A)	109.5
C(8)-C(13)-C(12)	121.5(2)	O(7)-C(21)-H(21B)	109.5
C(8)-C(13)-C(4)	119.5(2)	H(21A)-C(21)-H(21B)	109.5
C(12)-C(13)-C(4)	119.0(2)	O(7)-C(21)-H(21C)	109.5
O(4)-C(14)-C(15)	112.6(2)	H(21A)-C(21)-H(21C)	109.5
O(4)-C(14)-C(6)	109.7(2)	H(21B)-C(21)-H(21C)	109.5
C(15)-C(14)-C(6)	112.6(2)		

Parámetros de desplazamiento anisotrópico ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) para la minimoidiona A (**118**). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma:  $-2\pi^2 [h^2 a^{*2}U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
O(1)	32(1)	22(1)	41(1)	-3(1)	13(1)	0(1)
O(2)	38(1)	19(1)	41(1)	2(1)	17(1)	-2(1)
O(3)	34(1)	35(1)	27(1)	1(1)	16(1)	-5(1)
O(4)	29(1)	41(1)	59(2)	13(1)	7(1)	-14(1)
O(5)	40(1)	35(1)	67(2)	22(1)	19(1)	-5(1)
O(6)	22(1)	25(1)	34(1)	2(1)	7(1)	-1(1)
O(7)	35(1)	26(1)	25(1)	-3(1)	16(1)	-5(1)
C(1)	17(1)	23(1)	29(2)	0(1)	3(1)	2(1)
C(2)	22(1)	29(2)	23(1)	-2(1)	7(1)	2(1)
C(3)	16(1)	32(2)	22(1)	3(1)	6(1)	2(1)
C(4)	20(1)	23(1)	24(1)	3(1)	7(1)	0(1)
C(5)	21(1)	25(1)	31(2)	6(1)	8(1)	-4(1)
C(6)	24(2)	23(1)	28(2)	-2(1)	5(1)	-7(1)
C(7)	24(1)	21(1)	19(1)	-1(1)	6(1)	-4(1)
C(8)	17(1)	21(1)	20(1)	2(1)	1(1)	-1(1)
C(9)	21(1)	24(1)	16(1)	1(1)	3(1)	-2(1)
C(10)	24(2)	24(1)	21(1)	4(1)	7(1)	-4(1)
C(11)	19(1)	17(1)	26(1)	4(1)	3(1)	-2(1)
C(12)	18(1)	20(1)	23(1)	2(1)	3(1)	0(1)
C(13)	16(1)	23(1)	18(1)	2(1)	1(1)	0(1)
C(14)	31(2)	24(2)	35(2)	-5(1)	10(1)	-10(1)
C(15)	31(2)	20(1)	44(2)	-1(1)	14(2)	-4(1)
C(16)	28(2)	26(2)	38(2)	7(1)	10(1)	1(1)
C(17)	25(2)	22(1)	26(2)	-5(1)	8(1)	-4(1)
C(18)	33(2)	49(2)	26(2)	-2(1)	12(1)	-3(1)
C(19)	29(2)	37(2)	36(2)	5(1)	3(1)	-8(1)
C(20)	24(2)	35(2)	49(2)	8(1)	6(1)	2(1)
C(21)	44(2)	38(2)	33(2)	-6(1)	22(2)	-11(1)

Coordenadas de hidrógeno ( $\times 10^4$ ) y parámetros de desplazamiento isotrópico ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$  para la minimoidiona A (**118**).

	x	y	z	U(eq)
H(2A)	8440(30)	6238(18)	9473(17)	38
H(4)	4500(40)	651(13)	9330(20)	54
H(2)	6485	5132	11622	30
H(5)	5264	2478	10105	31
H(7)	7530	2270	7924	26
H(10)	9580	4993	7842	28
H(14)	5905	1025	8213	36
H(16)	9497	1000	10470	37
H(18A)	6460	4147	12880	53
H(18B)	5097	3475	12810	53
H(18C)	4717	4367	12173	53
H(19A)	3661	2516	7887	54
H(19B)	4671	2240	7164	54
H(19C)	4824	3195	7646	54
H(20A)	11985	1901	10950	56
H(20B)	12534	2221	10206	56
H(20C)	11658	1310	9989	56
H(21A)	9661	4119	6480	54
H(21B)	10576	3217	6613	54
H(21C)	11126	3942	7509	54

Enlaces de hidrógeno para la minimoidiona A (**118**) [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle$ (DHA)
O(2)-H(2A)...O(1)	0.859(10)	1.784(16)	2.585(3)	154(3)
O(4)-H(4)...O(5)	0.860(10)	2.17(3)	2.692(3)	119(3)
O(4)-H(4)...O(5)#1	0.860(10)	2.11(2)	2.802(3)	138(3)

Transformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes: #1 -x+1,-y,-z+2

## ANEXO 2

### *Malbranchea circinata*

- Figura A1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (700 MHz).
- Figura A2.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (175 MHz).
- Figura A3.** Espectro HSQC de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A4.** Espectro HMBC de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A5.** Espectro COSY de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A6.** Espectro NOESY de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A7.** Espectro de HRESIMS de **120**.
- Figura A8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (700 MHz).
- Figura A9.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (175 MHz).
- Figura A10.** Espectro HSQC de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A11.** Espectro HMBC de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A12.** Espectro COSY de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A13.** Espectro NOESY de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A14.** Espectro de HRESIMS de **121**.
- Figura A15.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **122** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).
- Figura A16.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  (175 MHz).
- Figura A17.** Espectro HSQC de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CDCl}_3$ .
- Figura A18.** Espectro HMBC de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A19.** Espectro COSY de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A20.** Espectro NOESY de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ .
- Figura A21.** Espectro de HRESIMS de **122**.
- Figura A22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **123** en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).
- Figura A23.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **123** en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).
- Figura A24.** Espectro HSQC de **123** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A25.** Espectro HMBC de **123** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A26.** Espectro COSY de **123** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A27.** Espectro NOESY de **123** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A28.** Espectro de HRESIMS de **123**.
- Figura A29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **124** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).
- Figura A30.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **124** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).
- Figura A31.** Espectro HSQC de **124** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A32.** Espectro HMBC de **124** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A33.** Espectro COSY de **124** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A34.** Espectro NOESY de **124** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A35.** Espectro de HRESIMS de **124**.
- Figura A36.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **125** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).
- Figura A37.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **125** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).
- Figura A38.** Espectro HSQC de **125** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A39.** Espectro HMBC de **125** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A40.** Espectro COSY de **125** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A41.** Espectro NOESY de **125** en  $\text{CDCl}_3$ .
- Figura A42.** Espectro HRESIMS de **125**.

**Figura A43.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **126** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).  
**Figura A44.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **126** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).  
**Figura A45.** Espectro HSQC de **126** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A46.** Espectro HMBC de **126** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A47.** Espectro COSY de **126** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A48.** Espectro NOESY de **126** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A49.** Espectro de HRESIMS de **126**.  
**Figura A50.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **127** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).  
**Figura A51.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **127** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).  
**Figura A52.** Espectro HSQC de **127** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A53.** Espectro HMBC de **127** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A54.** Espectro COSY de **127** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A55.** Espectro NOESY de **127** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A56.** Espectro de HRESIMS de **128**.  
**Figura A57.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **128** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).  
**Figura A58.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **128** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).  
**Figura A59.** Espectro HSQC de **128** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A60.** Espectro HMBC de **128** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A61.** Espectro COSY de **128** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A62.** Espectro NOESY de **128** en  $\text{CDCl}_3$ .  
**Figura A63.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **72** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (700 MHz).  
**Figura A64.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **89** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (700 MHz).  
**Figura A65.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **129** y **130** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).  
**Figura A66.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **131** en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).  
**Figura A67.** Filograma *Malbranchea circinata* (ATCC: 34526)  
**Figura A68.** Análisis Región LSU *Malbranchea circinata* (ATCC: 34526).  
**Tabla A1.** Optimización geométrica y cálculos de RMN del compuesto **120**.  
**Tabla A2.** Optimización geométrica y cálculos RMN del compuesto **121**.  
**Tabla A3.** Tensores isotrópicos de RMN para el compuesto **120**.  
**Tabla A4.** Tensores isotrópicos de RMN para el compuesto **121**.

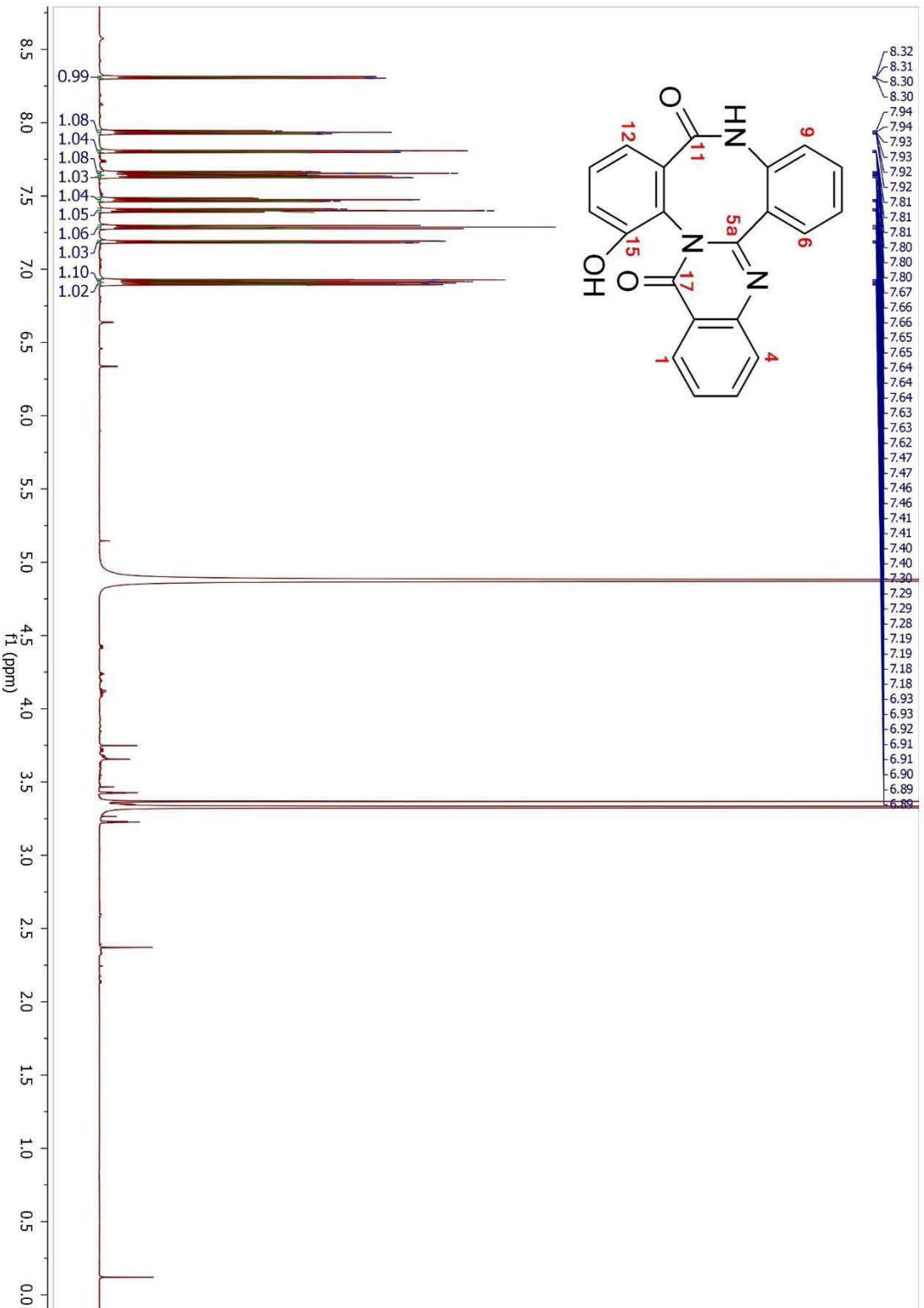


Figura A1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **120** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (700 MHz).



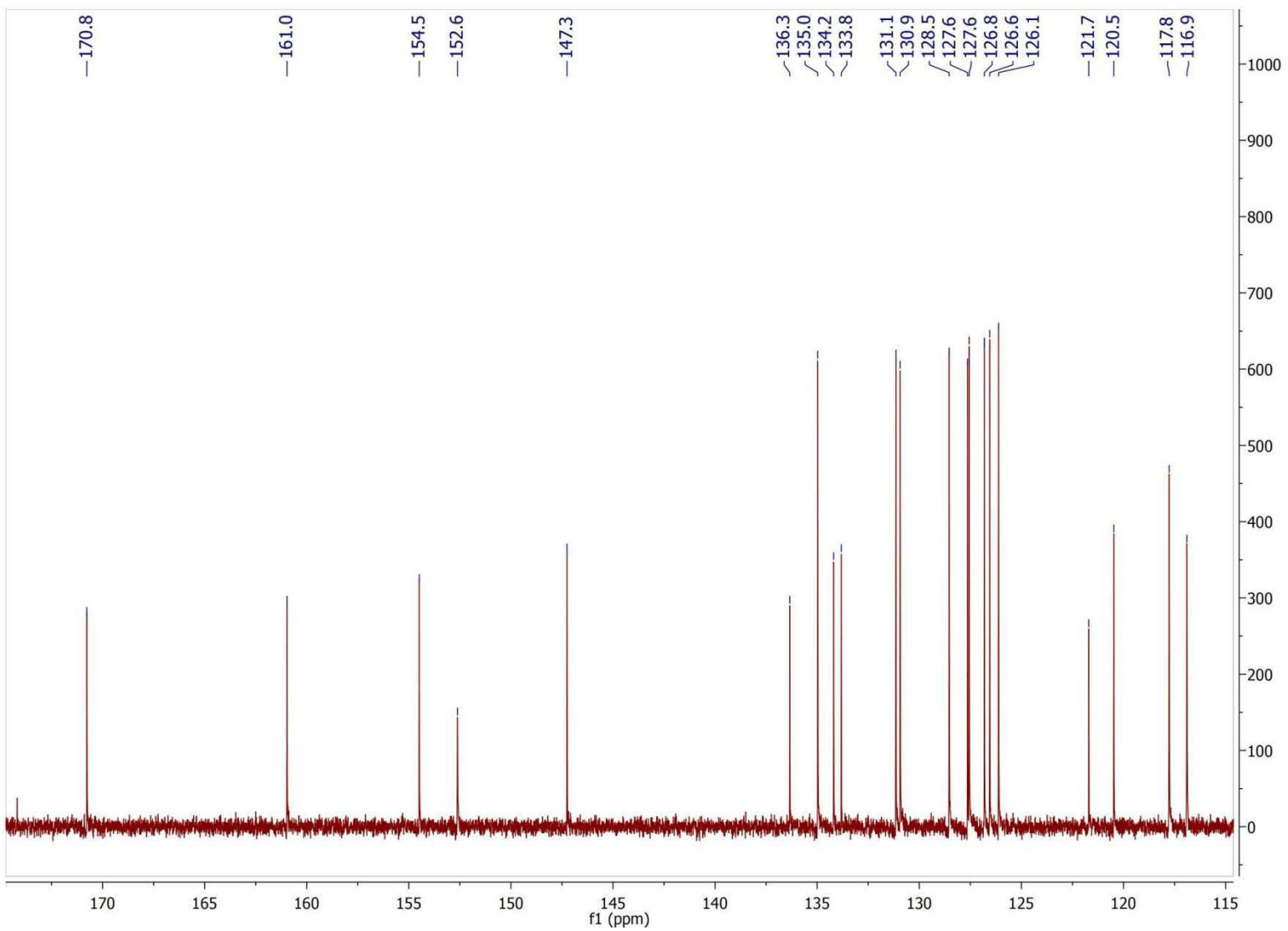


Figura A2. Espectro de <sup>13</sup>C NMR de 120 en CD<sub>3</sub>OD (175 MHz).

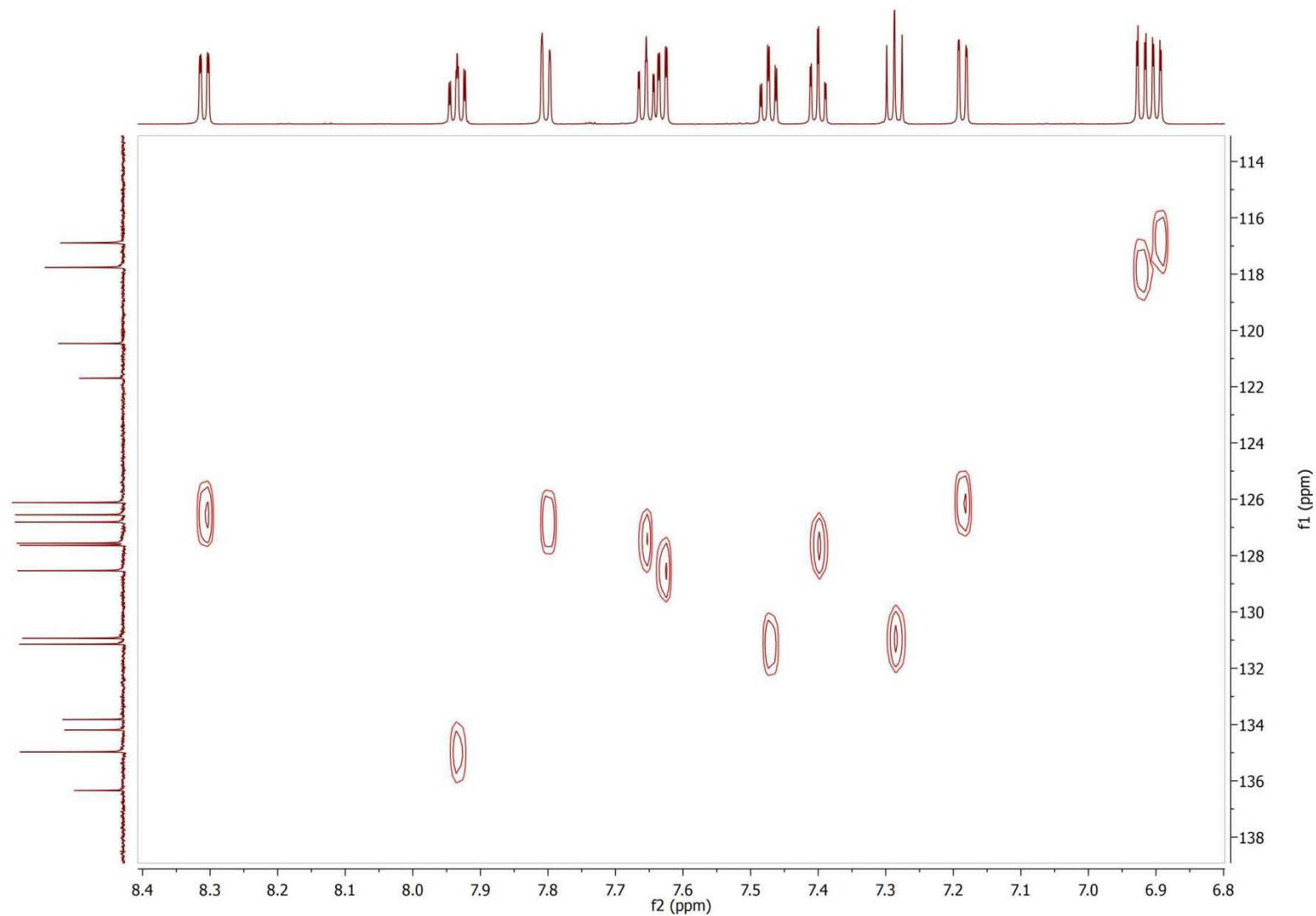
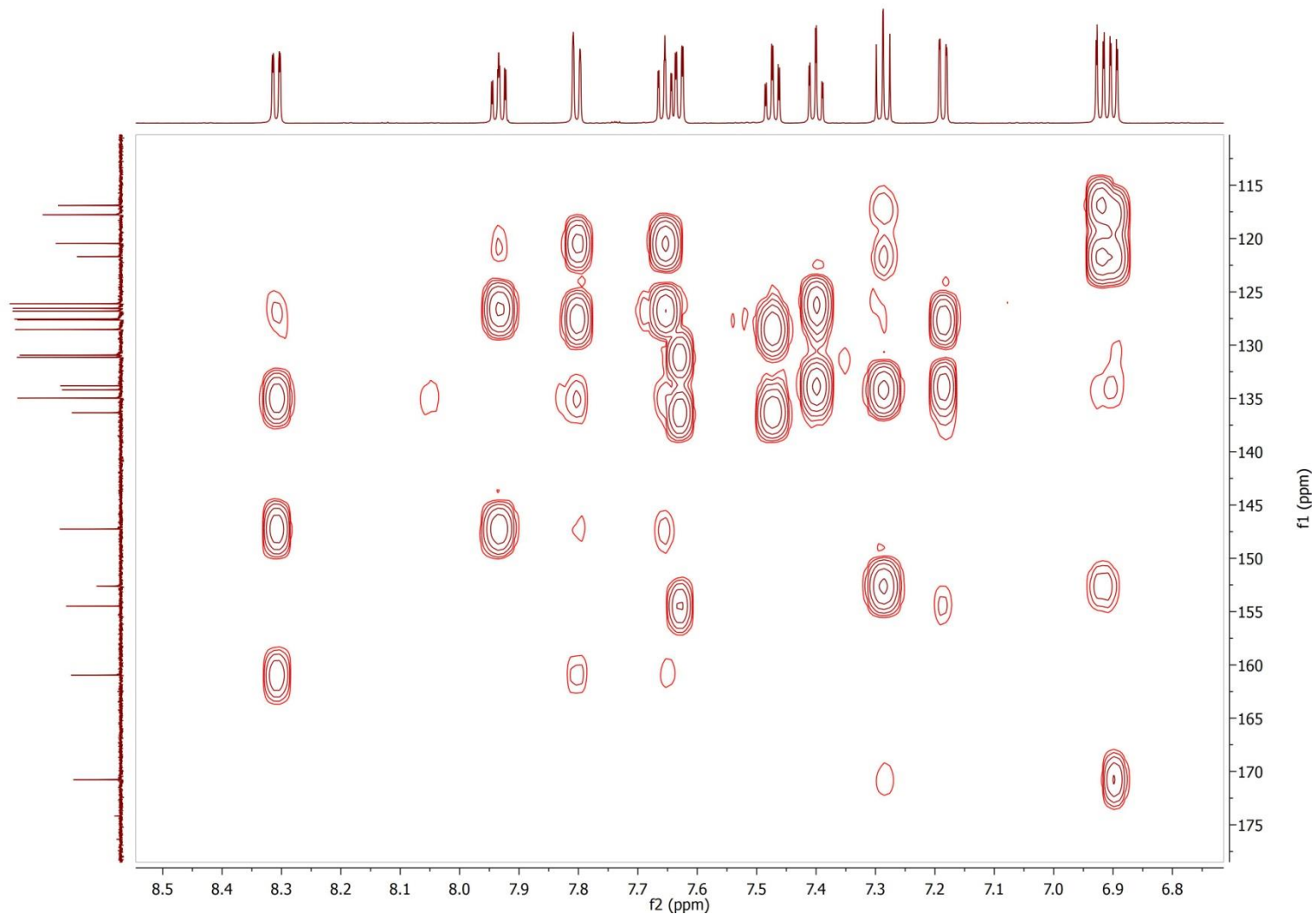
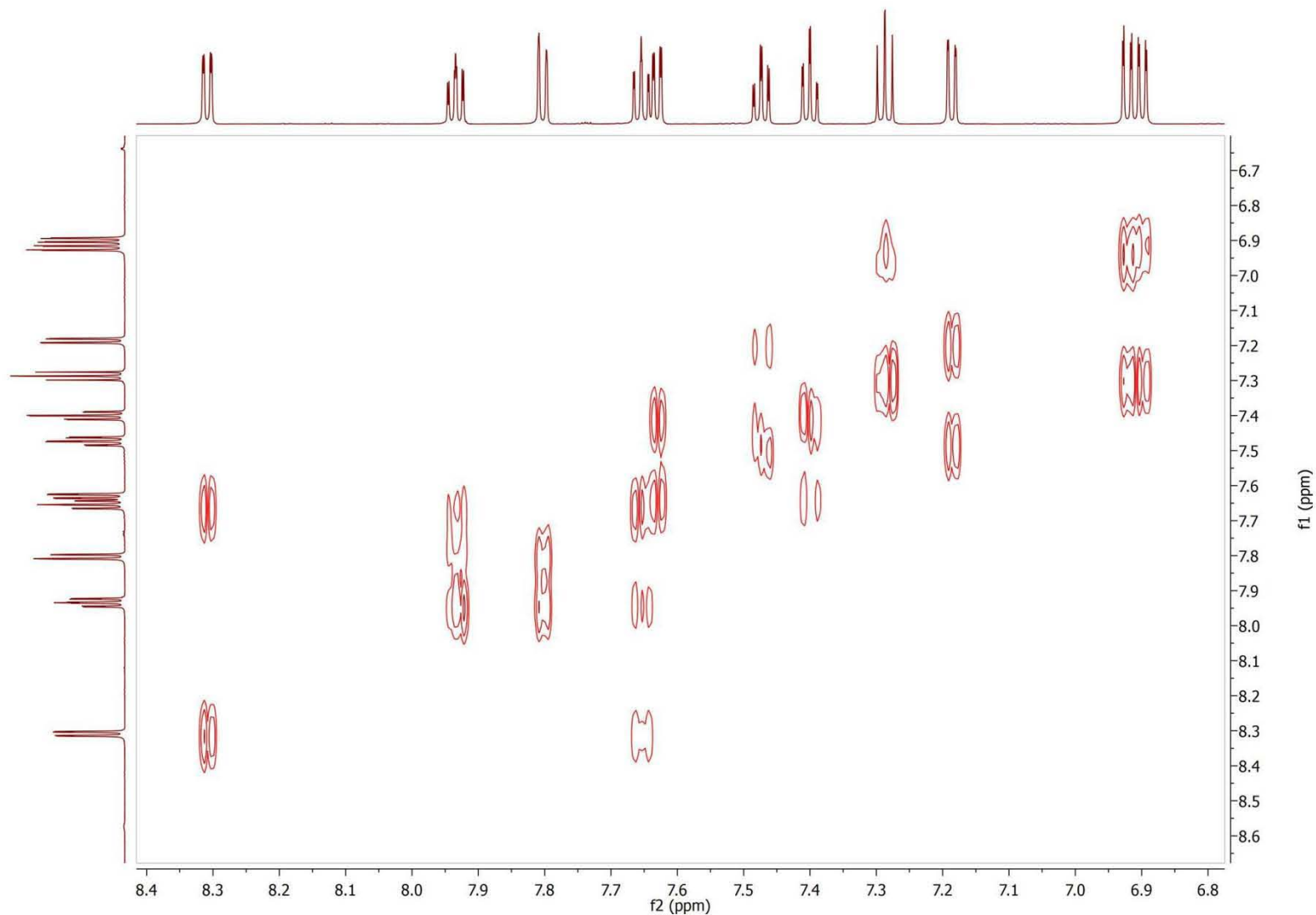


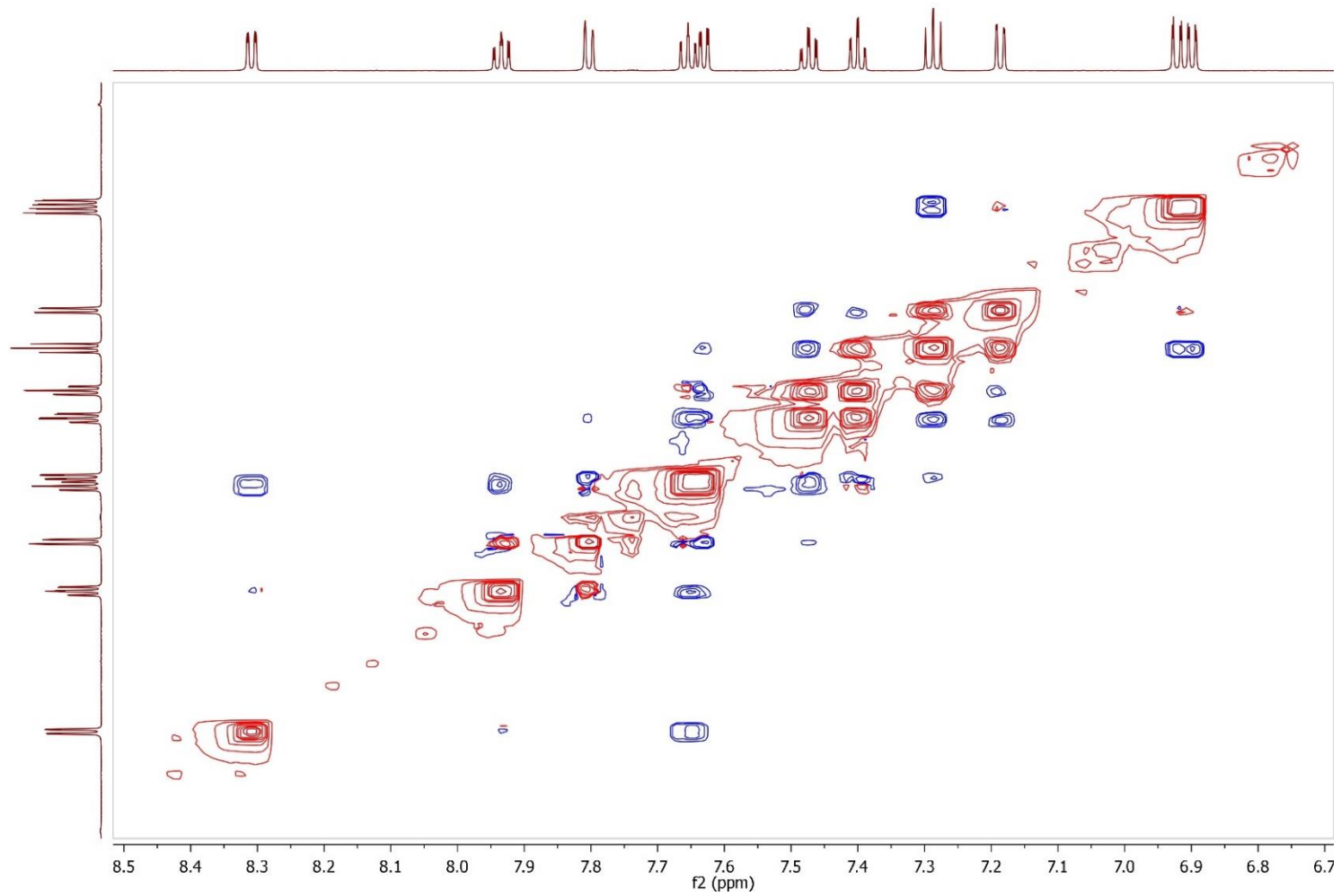
Figura A3. Espectro HSQC de 120 en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figura A4.** Espectro HMBC de **120** en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura A5.** Espectro COSY de **120** en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura A6.** Espectro NOESY de 120 en CD<sub>3</sub>OD.

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:2346 MR14-C5

Sample Name:Dra Macias Martha- Operador: Carmen Gar cia

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area] ;Correct Base[1.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1..1)

Acquired:10/29/2018 2:45:32 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:11/8/2018 7:41:48 AM

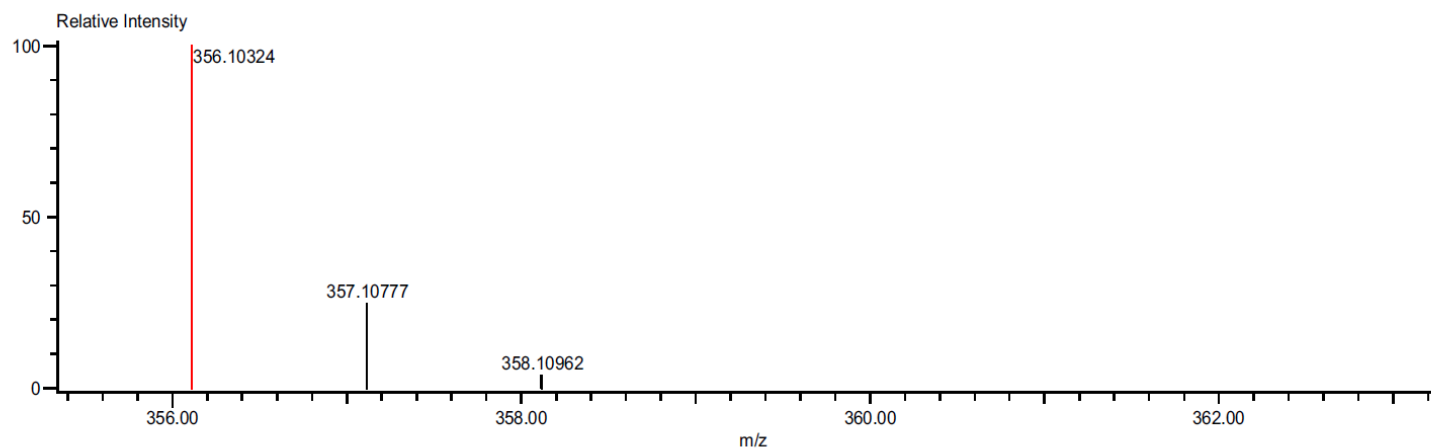
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 20.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 30, <sup>14</sup>N:0 .. 3, <sup>16</sup>O:0 .. 3



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
356.10324	95128.54	356.10352	0.28	0.78	<sup>12</sup> C <sub>21</sub> <sup>1</sup> H <sub>14</sub> <sup>14</sup> N <sub>3</sub> <sup>16</sup> O <sub>3</sub>	16.5

**Figura A7. Espectro de HRESIMS de 120.**

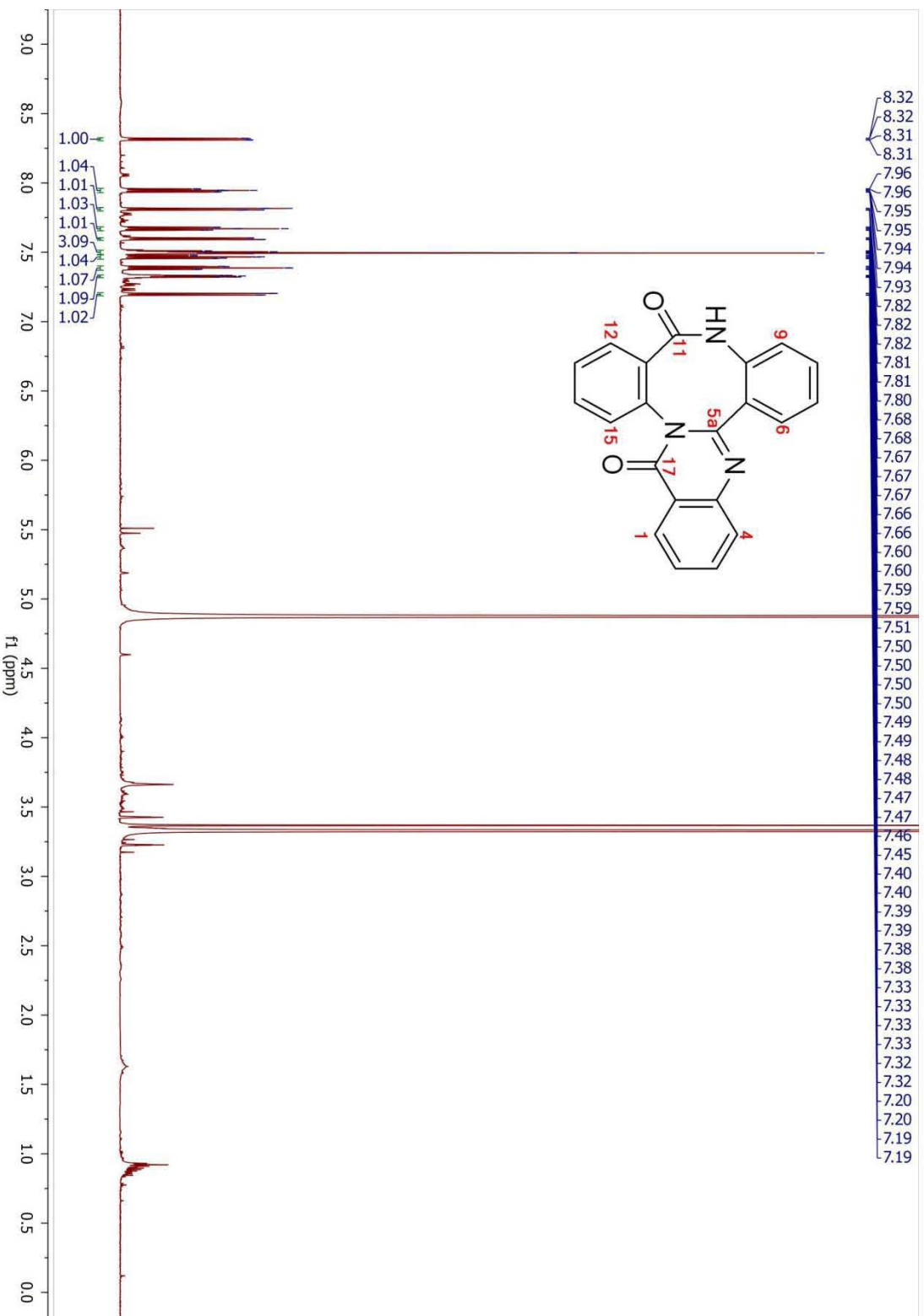
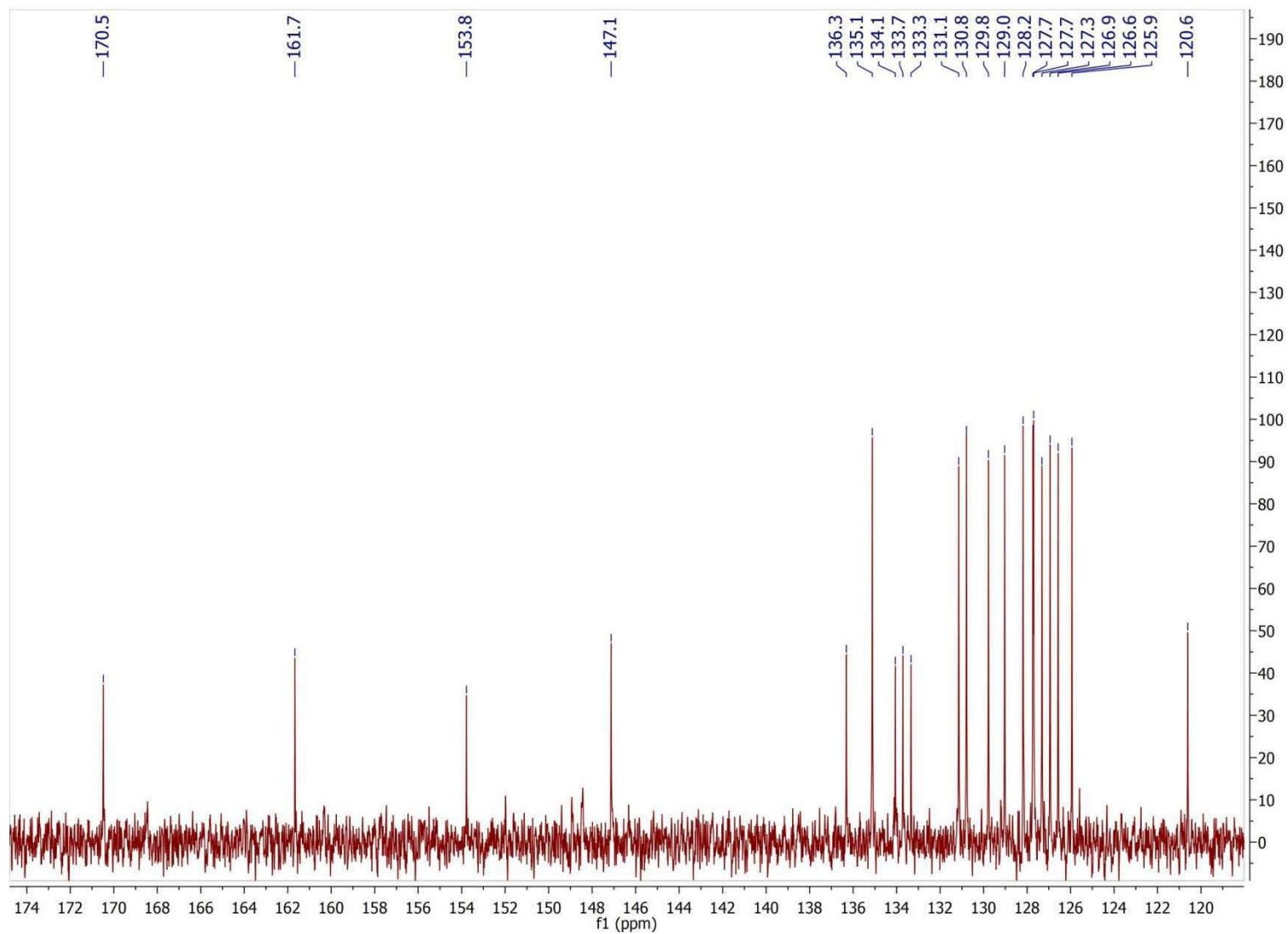
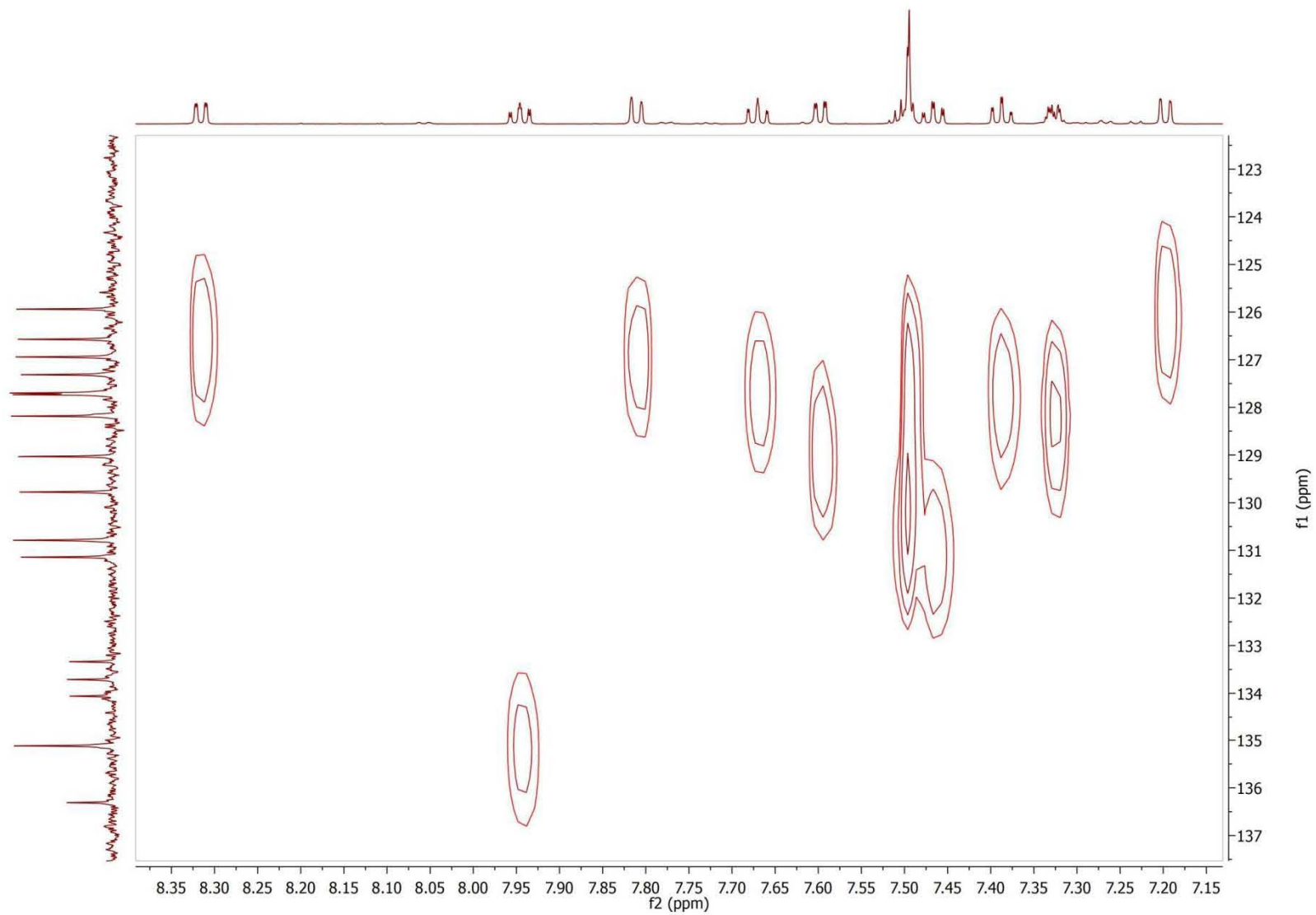


Figura A8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 121 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (700 MHz).



**Figura A9.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **121** en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (175 MHz).





**Figura A10.** Espectro HSQC de **121** en CD<sub>3</sub>OD.

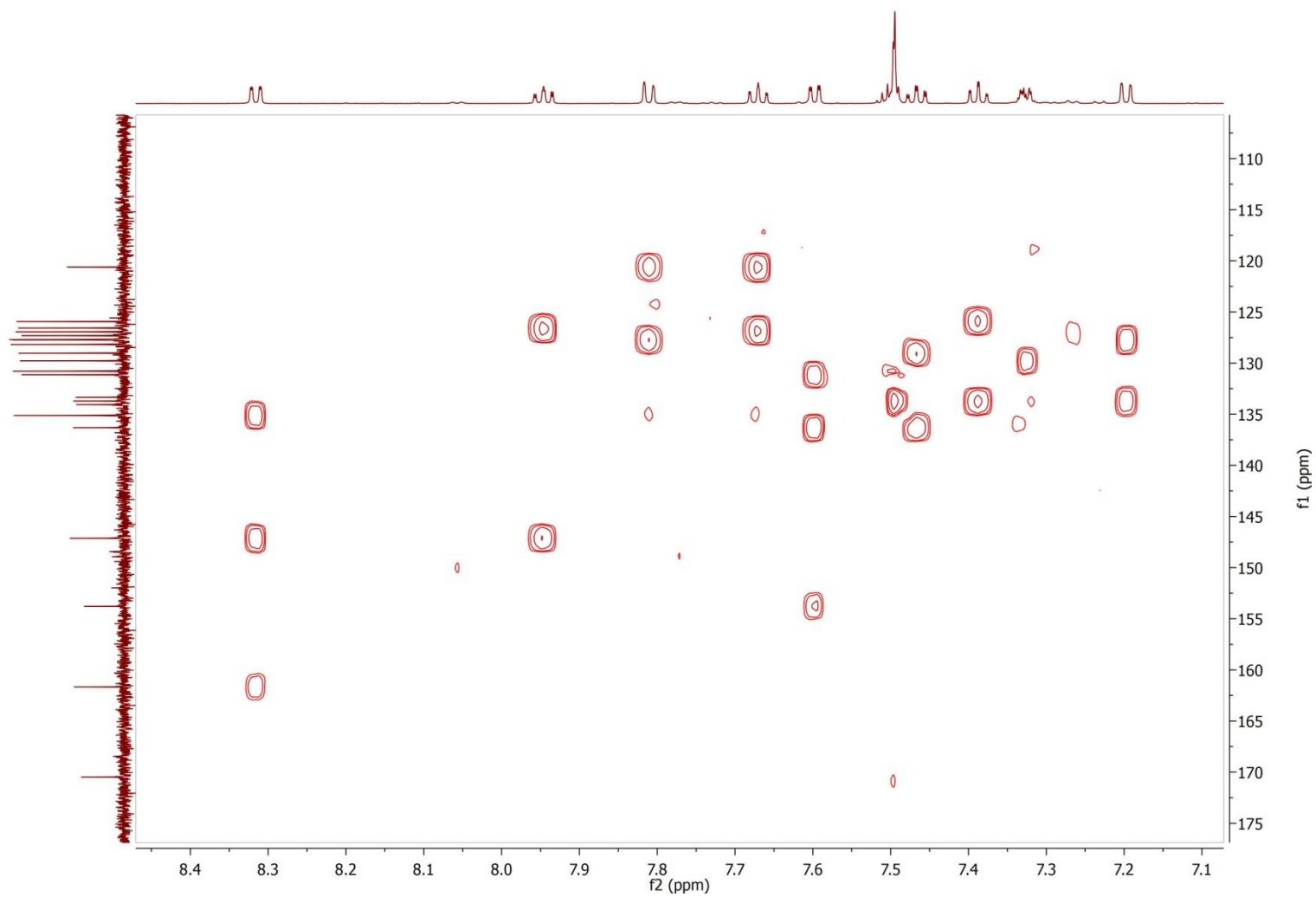
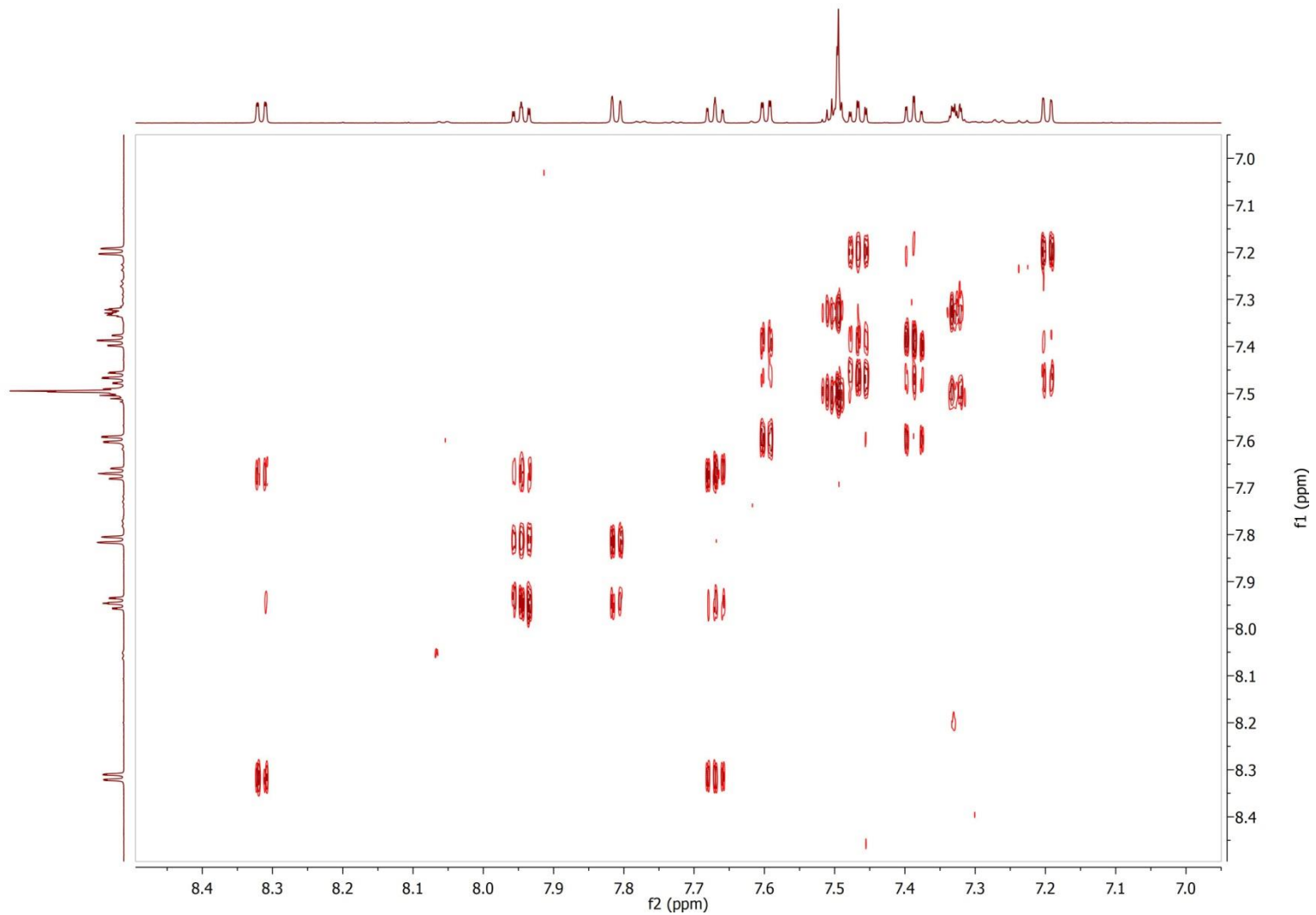


Figura A11. Espectro HMBC de 121 en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura A12.** Espectro COSY de **121** en CD<sub>3</sub>OD.

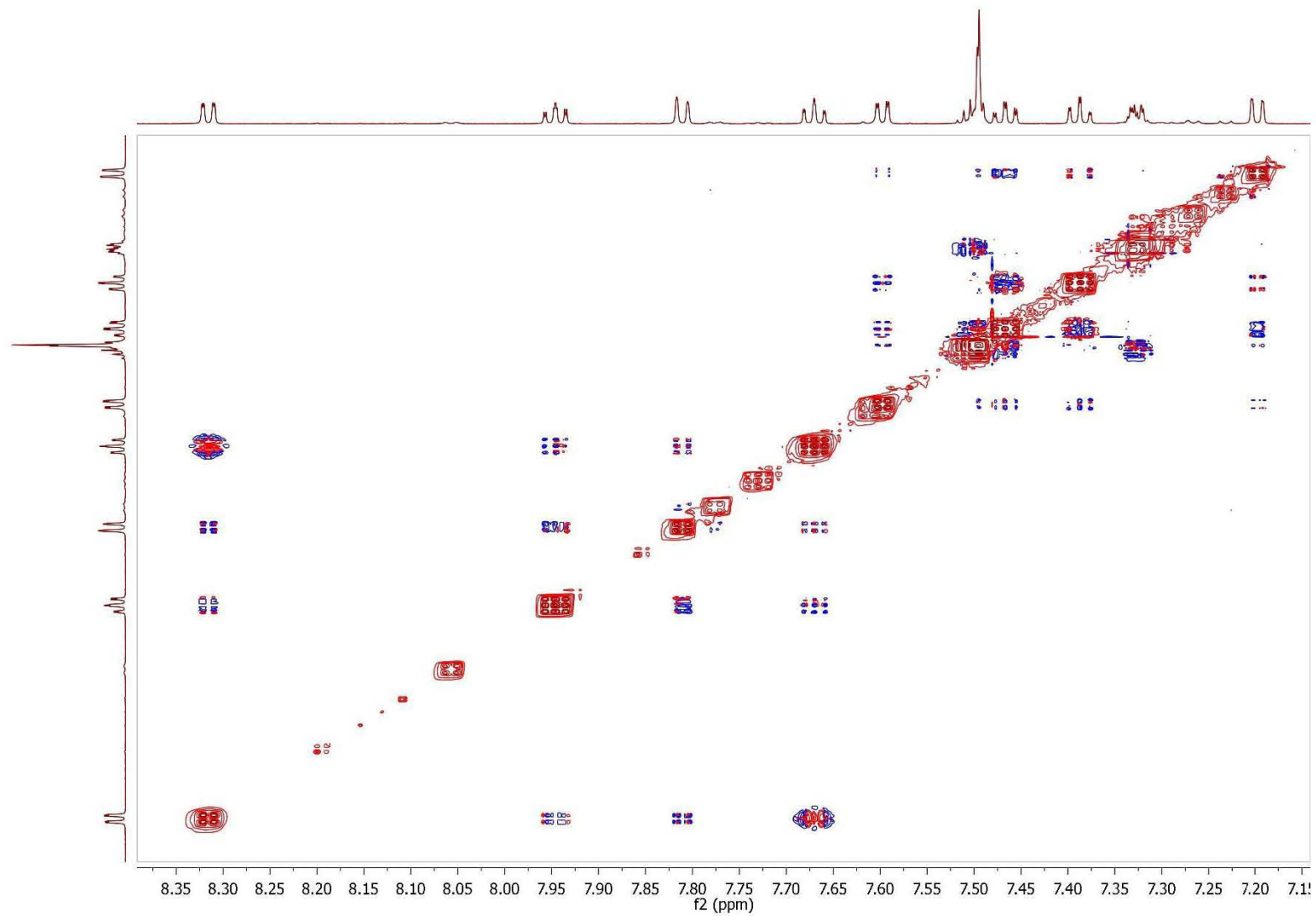


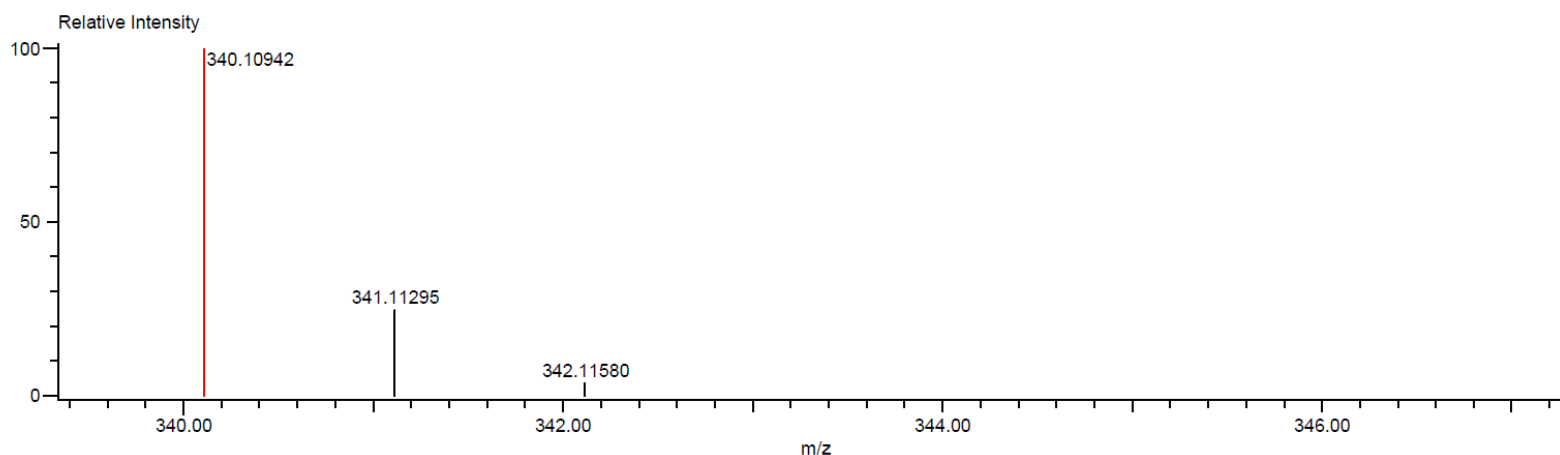
Figura A13. Espectro NOESY de **121** en CD<sub>3</sub>OD.

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:2345 MR14-A5  
 Sample Name:Dra Macias Martha- Operador: Carmen Garcia  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[1.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1..1)

Acquired:10/29/2018 3:41:26 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal Peg 600  
 Created:11/9/2018 7:41:48 AM  
 Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 20.0 (Fraction:Both)  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 30, <sup>14</sup>N:0 .. 3, <sup>16</sup>O:0 .. 2



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
340.10942	181128.63	340.10860	0.82	2.40	<sup>12</sup> C <sub>21</sub> <sup>1</sup> H <sub>14</sub> <sup>14</sup> N <sub>3</sub> <sup>16</sup> O <sub>2</sub>	16.5

**Figura A14. Espectro de HRESIMS de 121.**

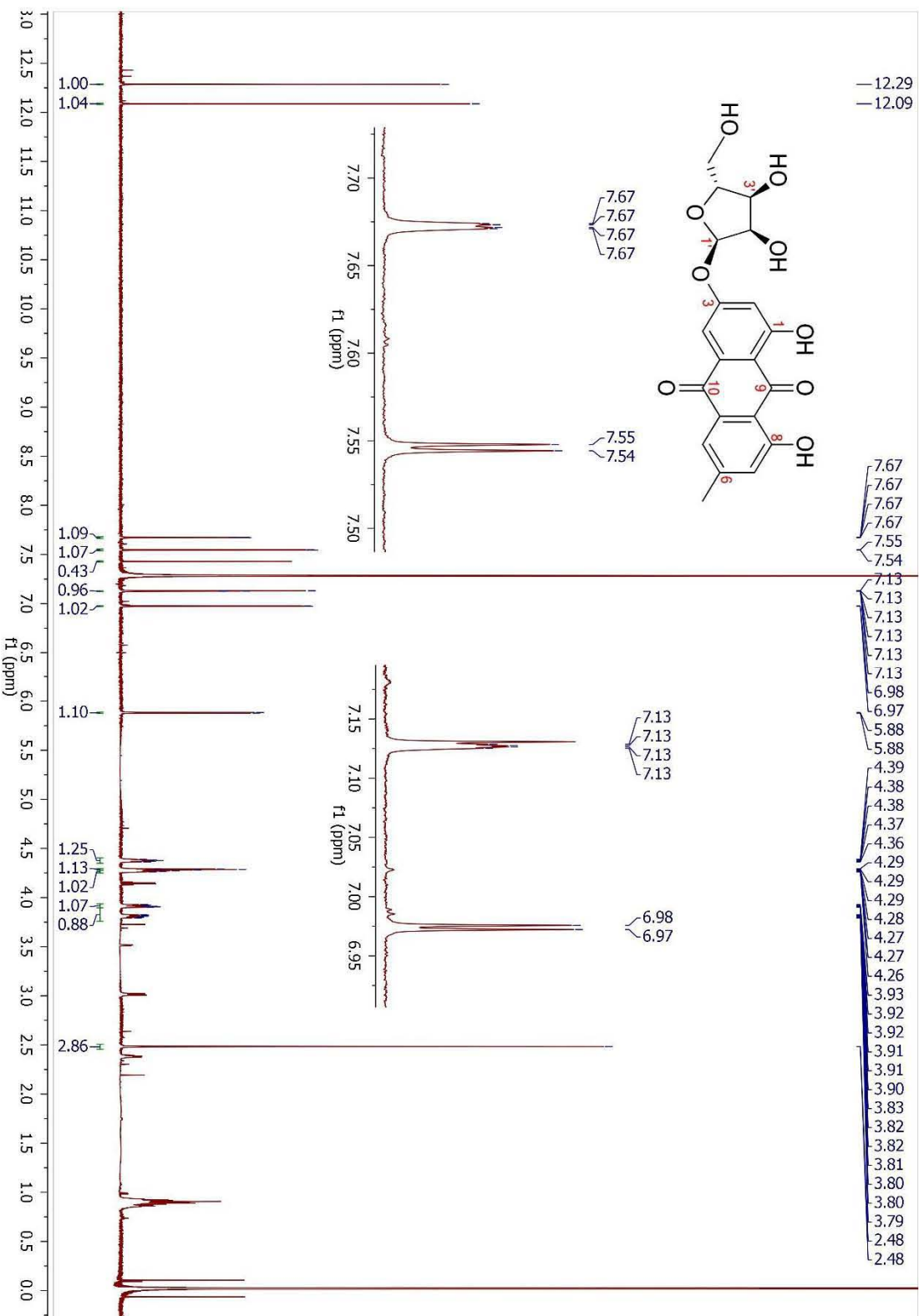


Figura A15. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 122 en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).

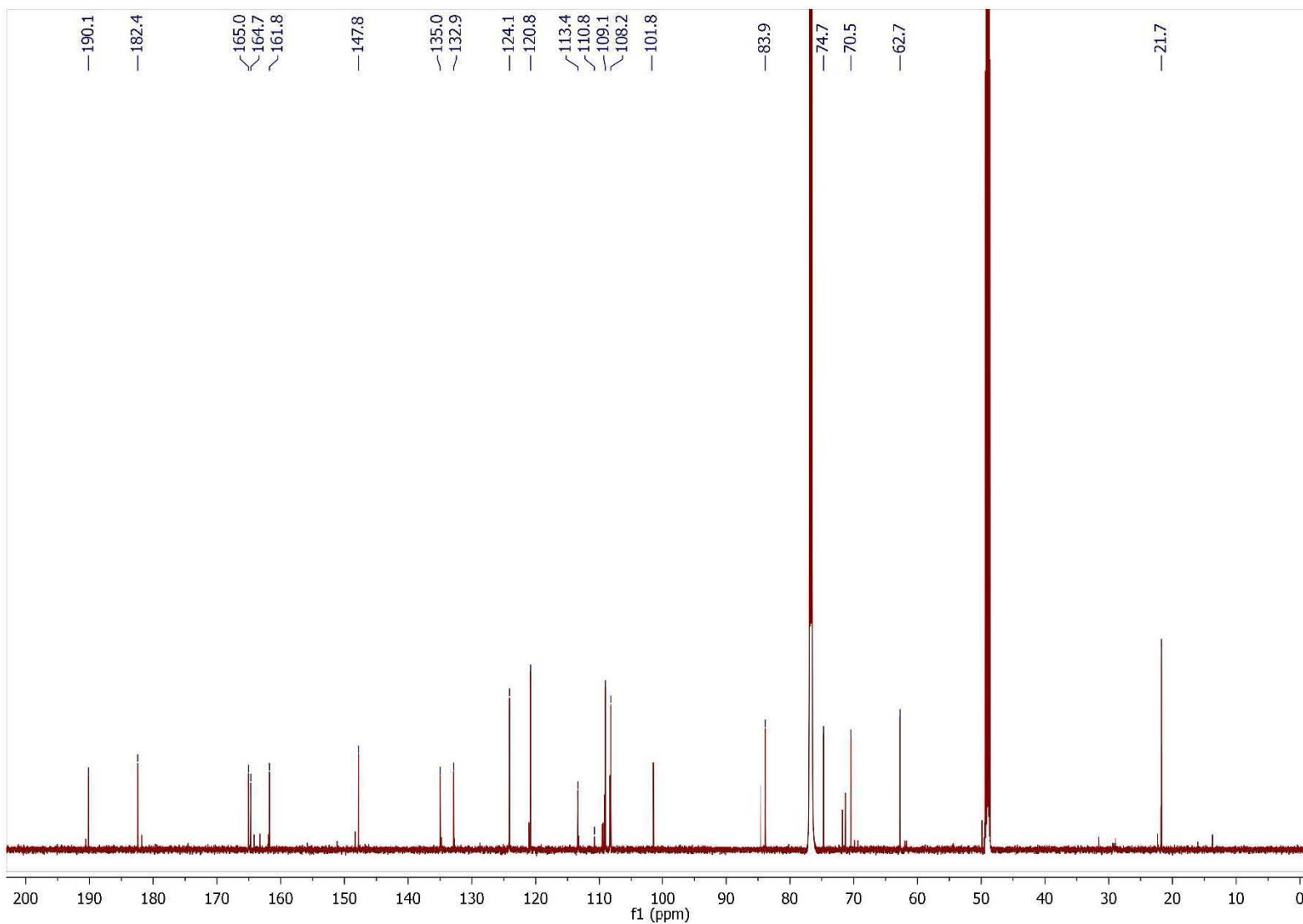


Figura A16. Espectro de <sup>13</sup>C NMR de **122** en CDCl<sub>3</sub>+ CD<sub>3</sub>OD (175 MHz).

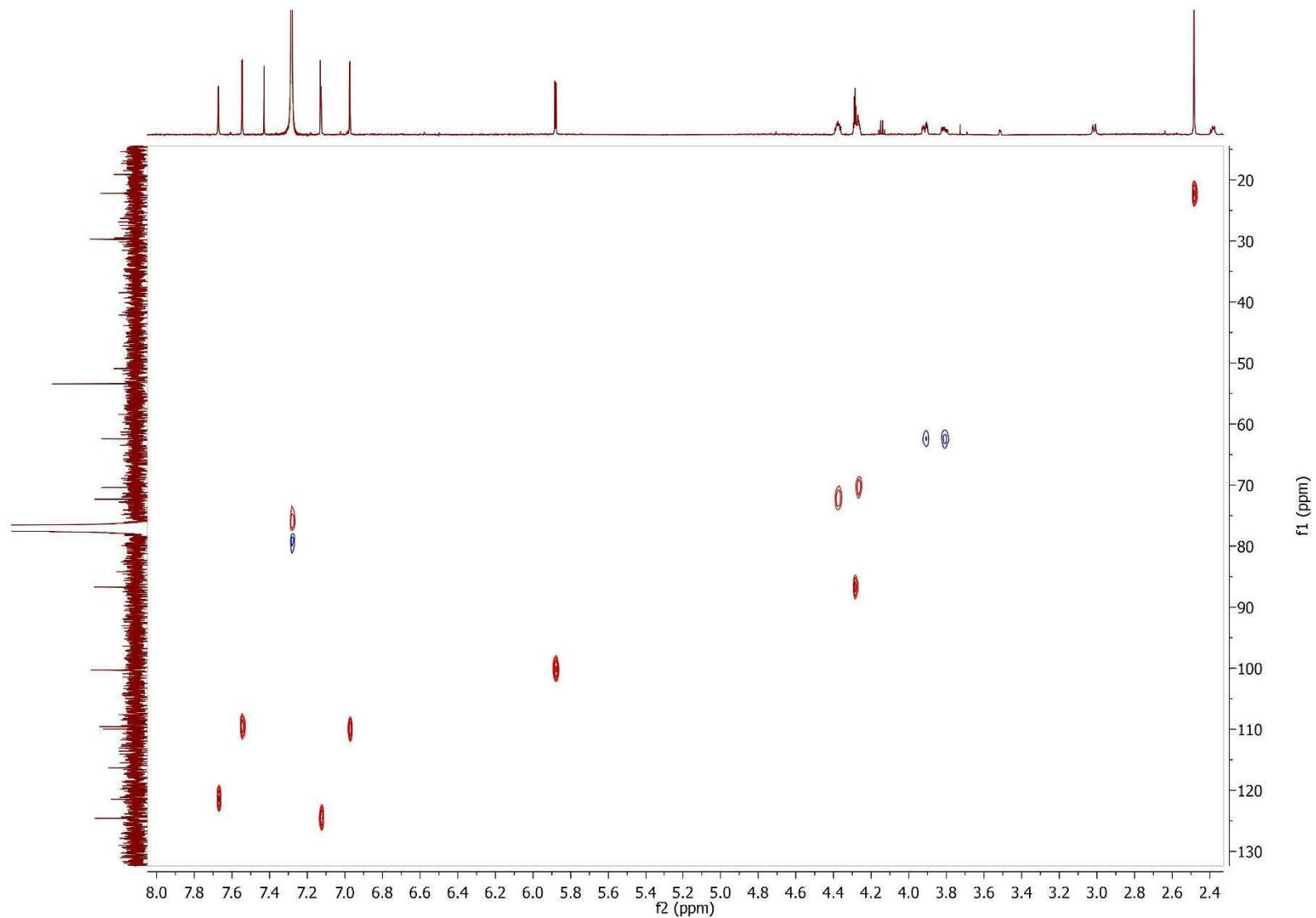
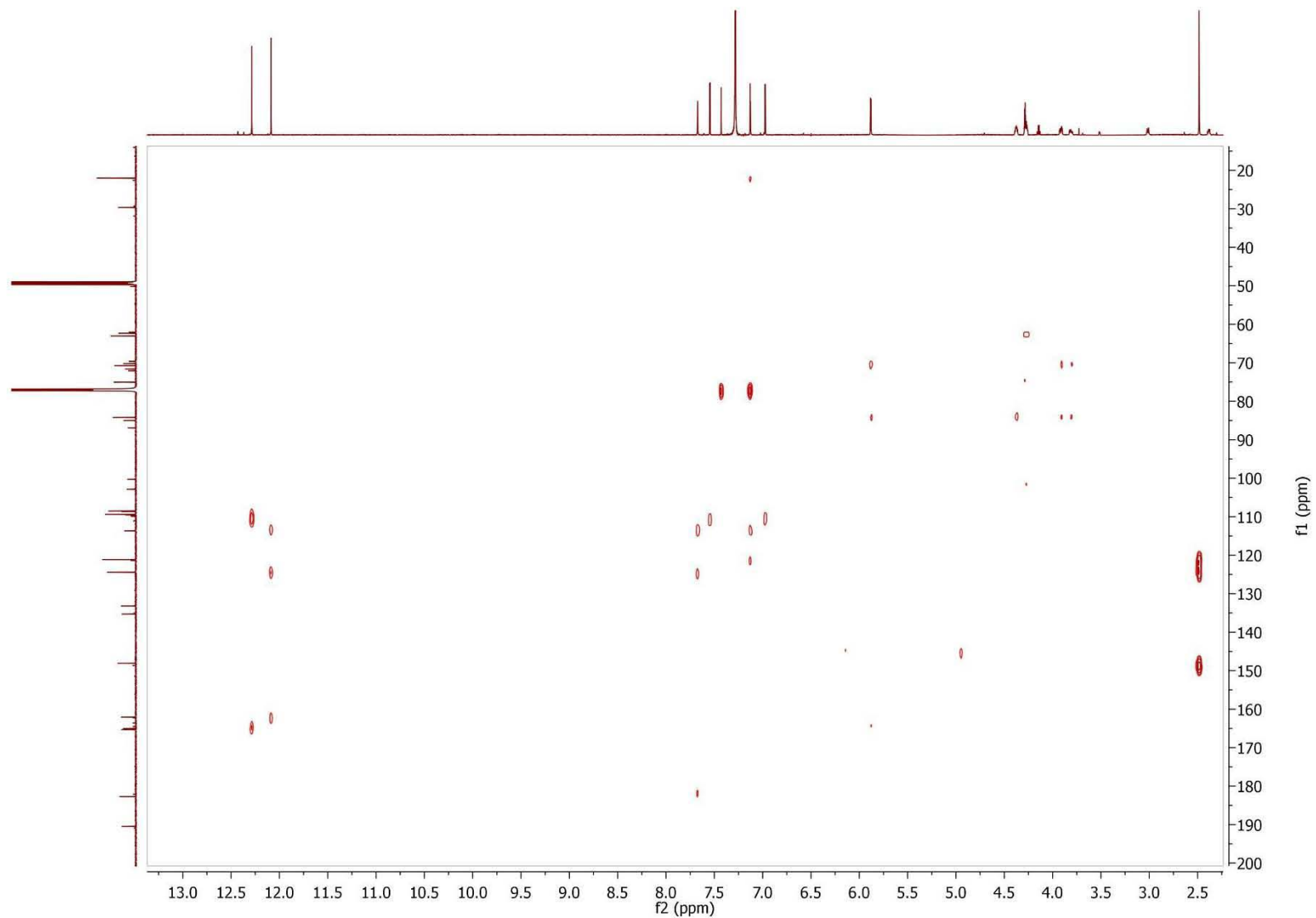
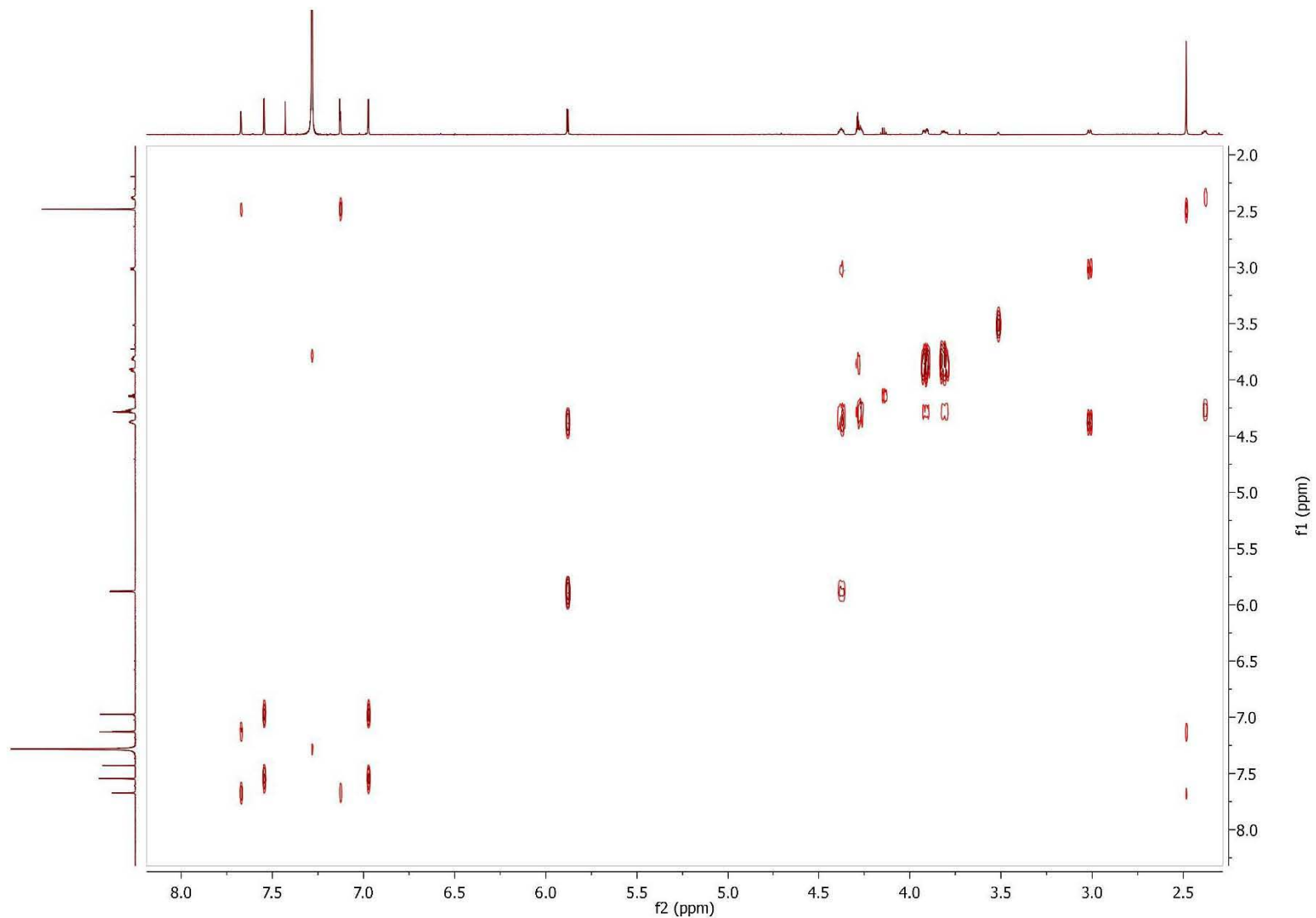


Figura A17. Espectro HSQC de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CDCl}_3$ .





**Figura A18.** Espectro HMBC de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figura A19.** Espectro COSY de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ .

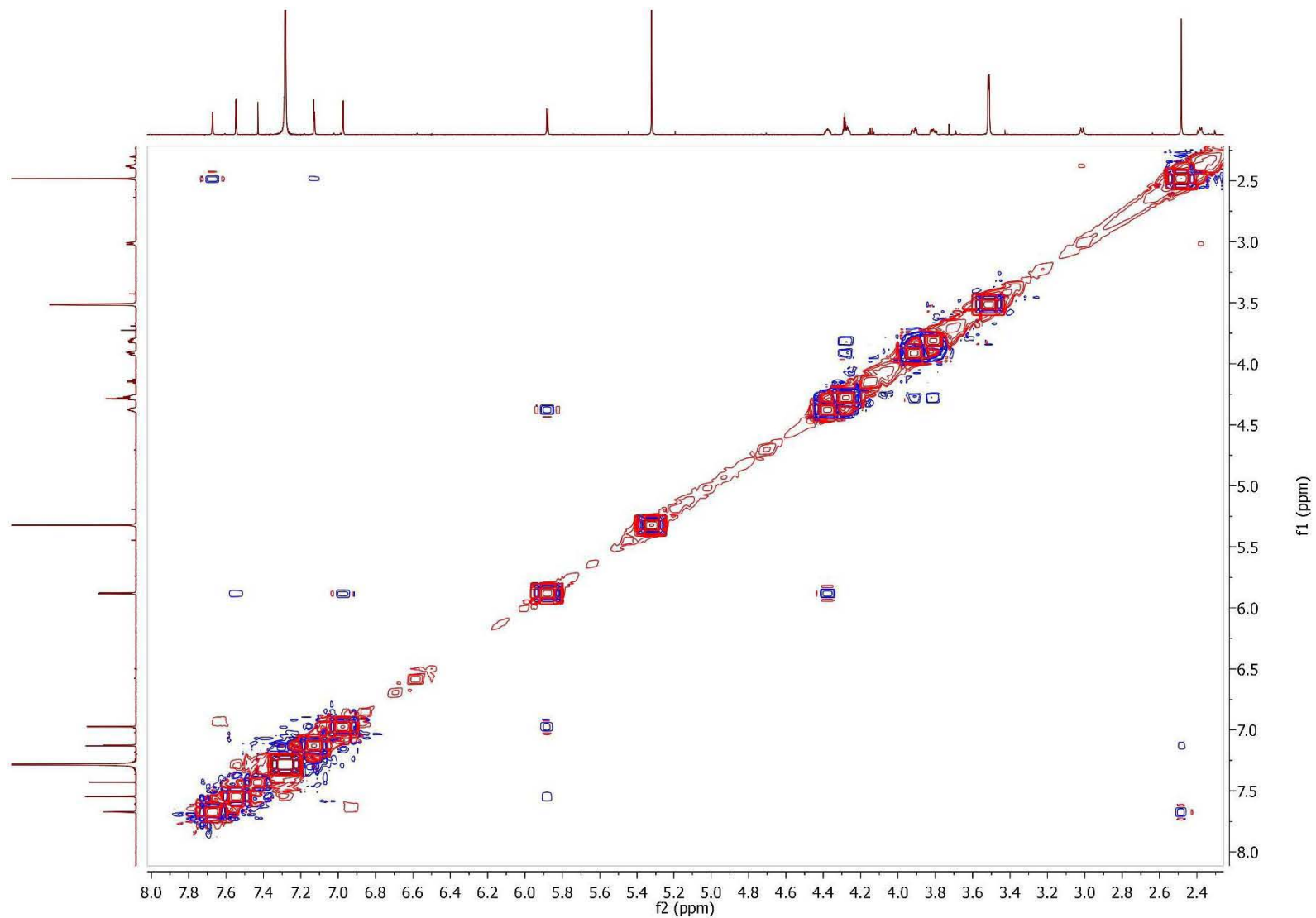


Figura A20. Espectro NOESY de **122** en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ .

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:924 MR15-Ma-C5

Sample Name:Dra Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average(MS[...

Acquired:5/22/2019 11:55:21 AM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:5/31/2019 12:35:24 PM

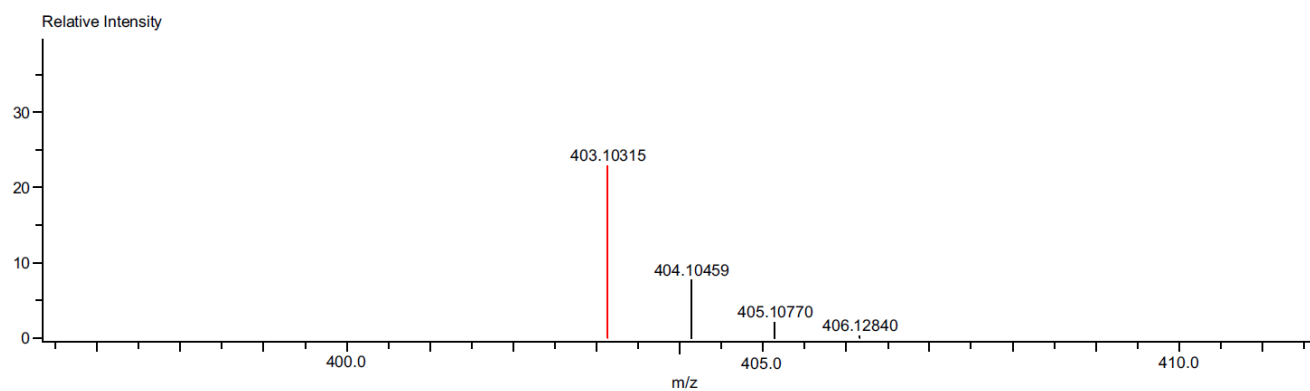
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:5.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 50, <sup>16</sup>O:0 .. 15



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
403.10315	11465.52	403.10291	0.95	2.35	<sup>12</sup> C <sub>20</sub> <sup>1</sup> H <sub>19</sub> <sup>16</sup> O <sub>9</sub>	11.5

**Figura A21. Espectro de HRESIMS de 122.**

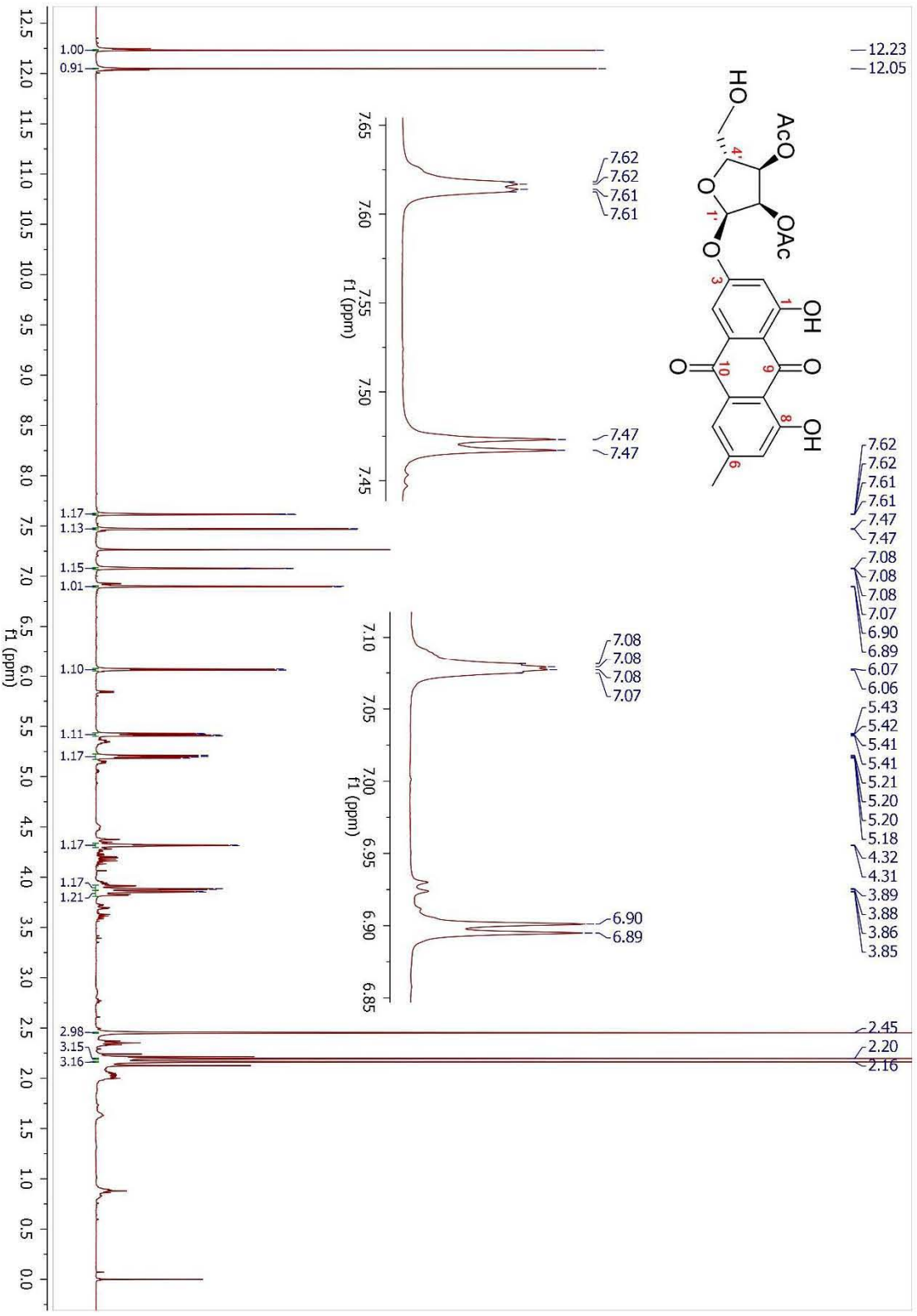


Figura A22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 123 en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).

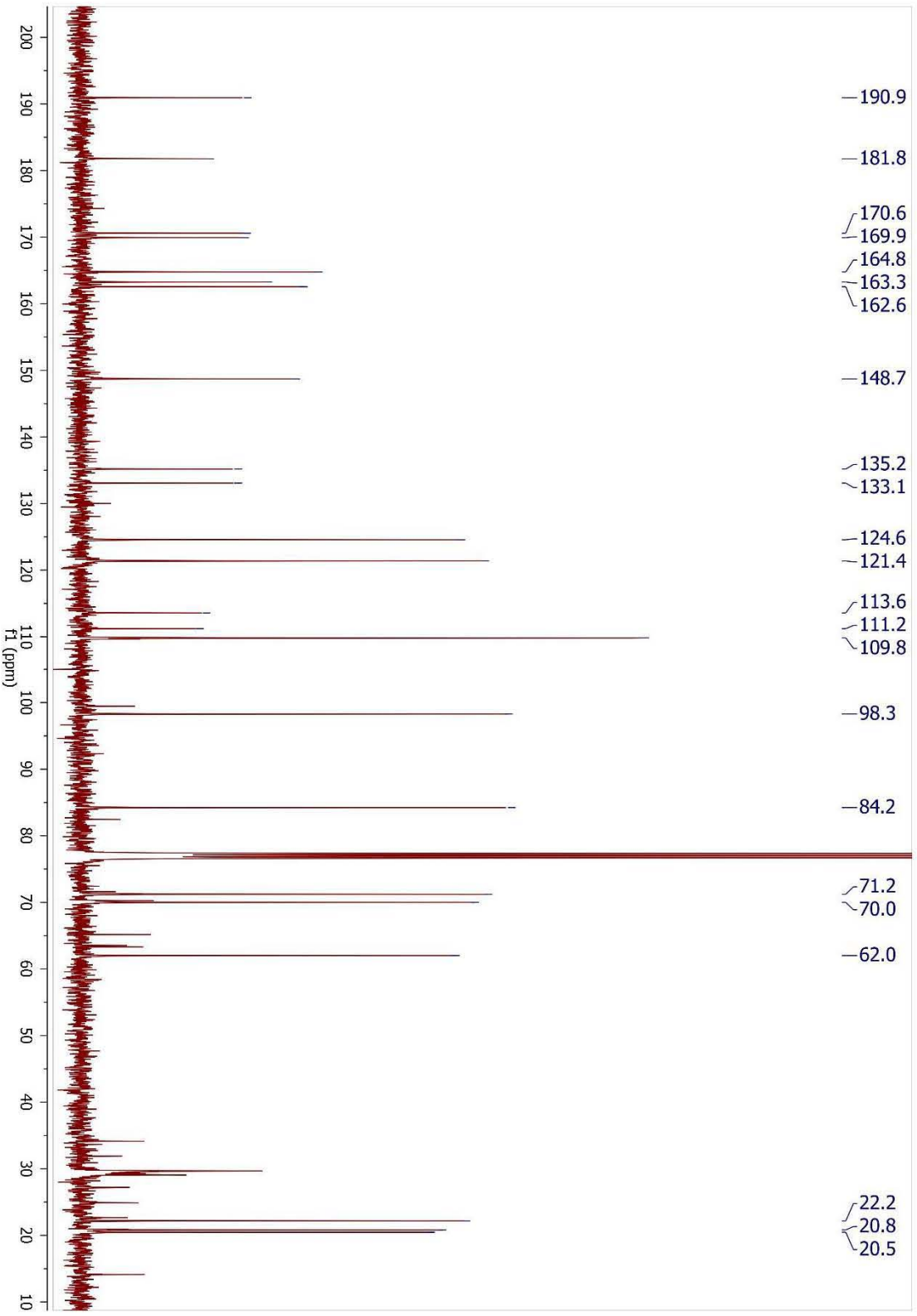


Figura A23. Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de 123 en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).

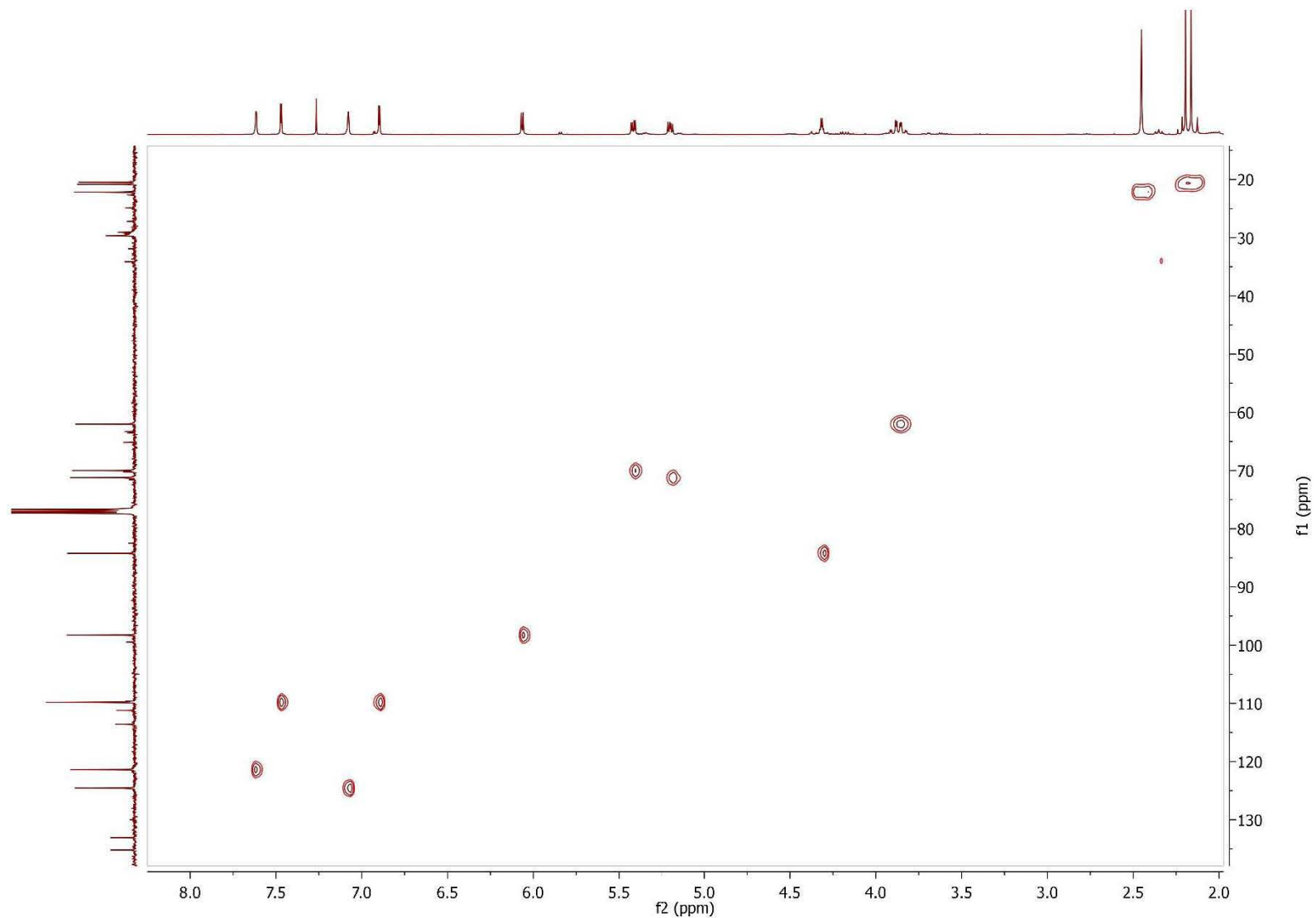


Figura A24. Espectro HSQC de **123** en CDCl<sub>3</sub>.

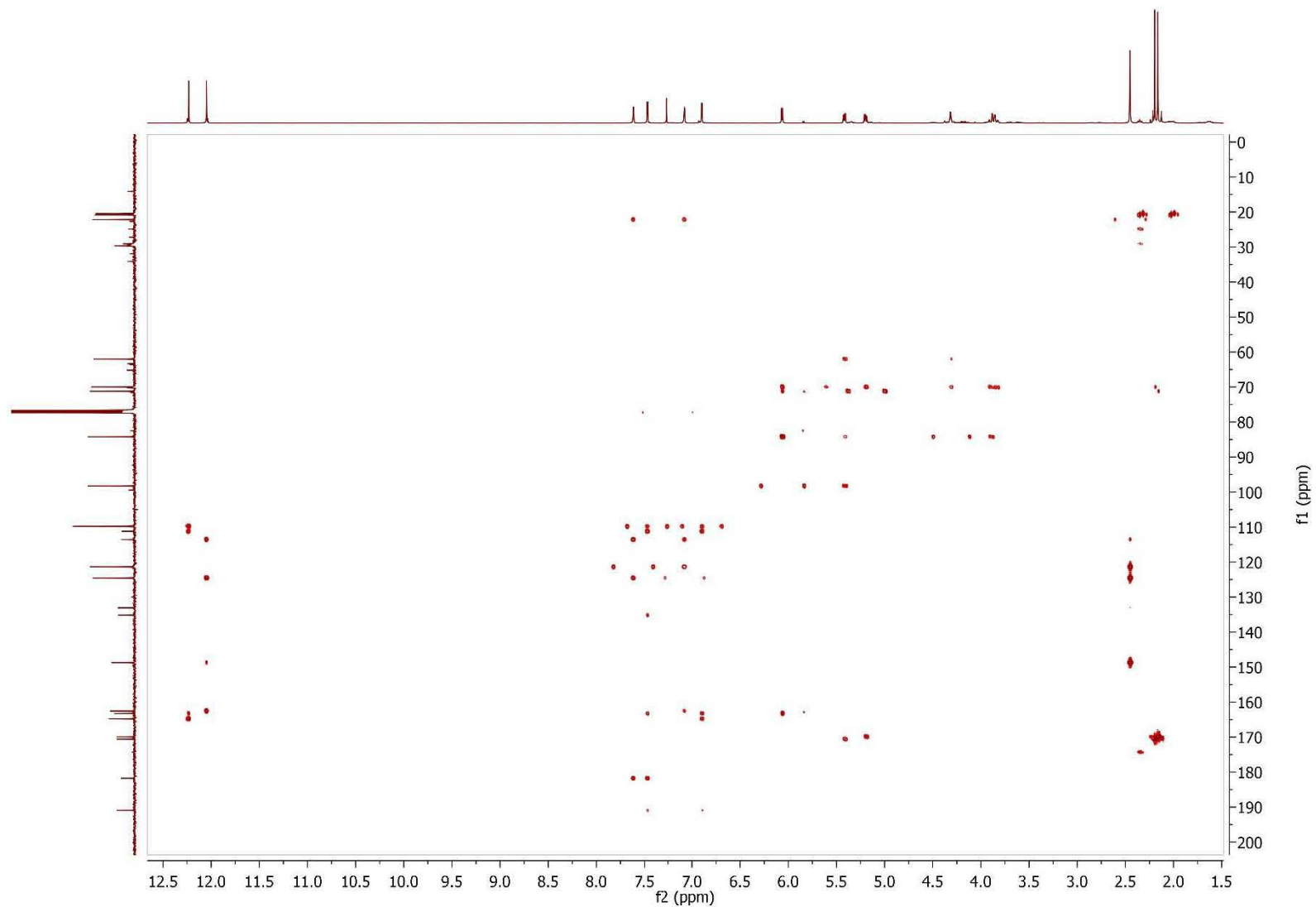


Figura A25. Espectro HMBC de 123 en CDCl<sub>3</sub>.



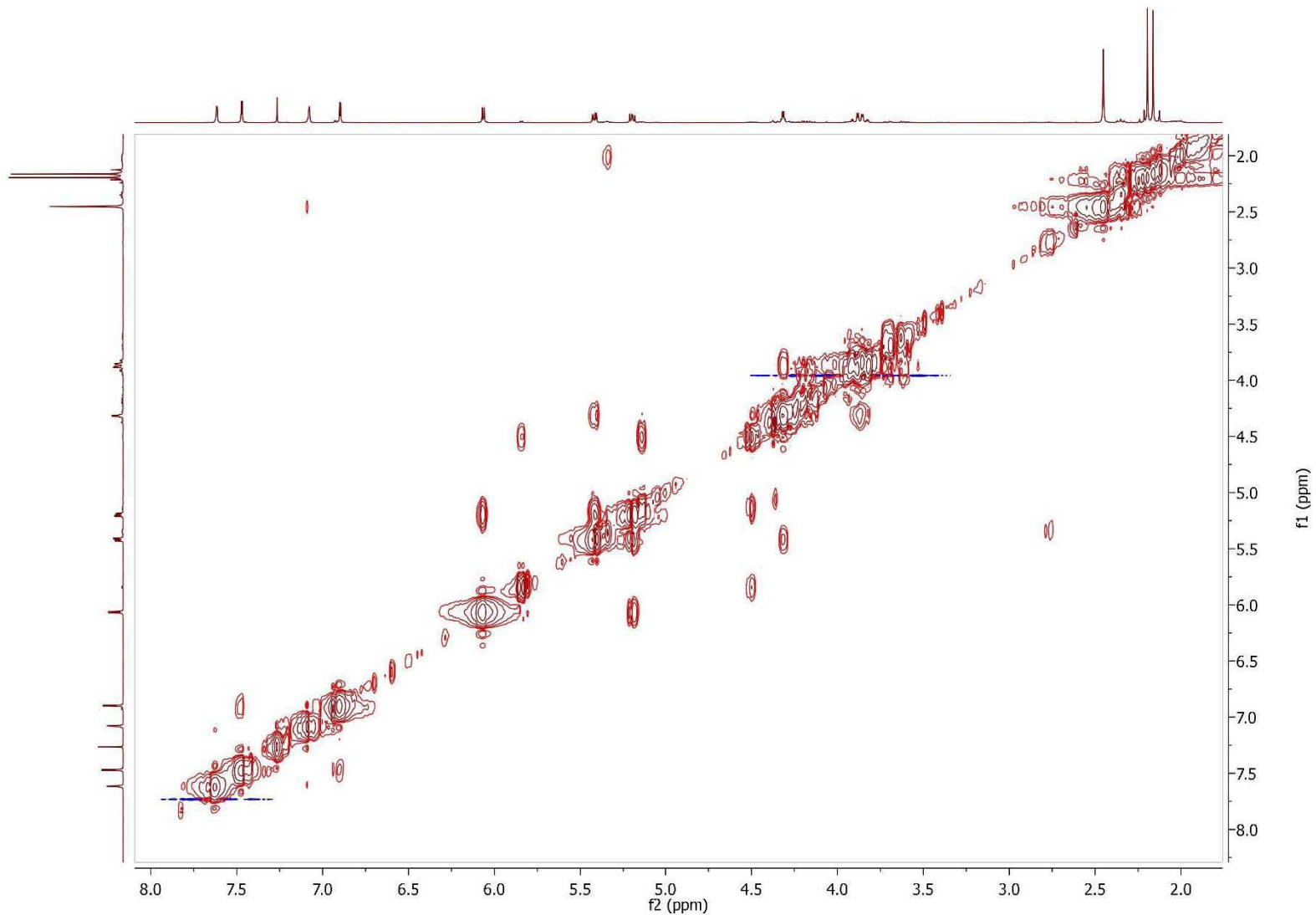


Figura A26. Espectro COSY de 123 en  $\text{CDCl}_3$ .

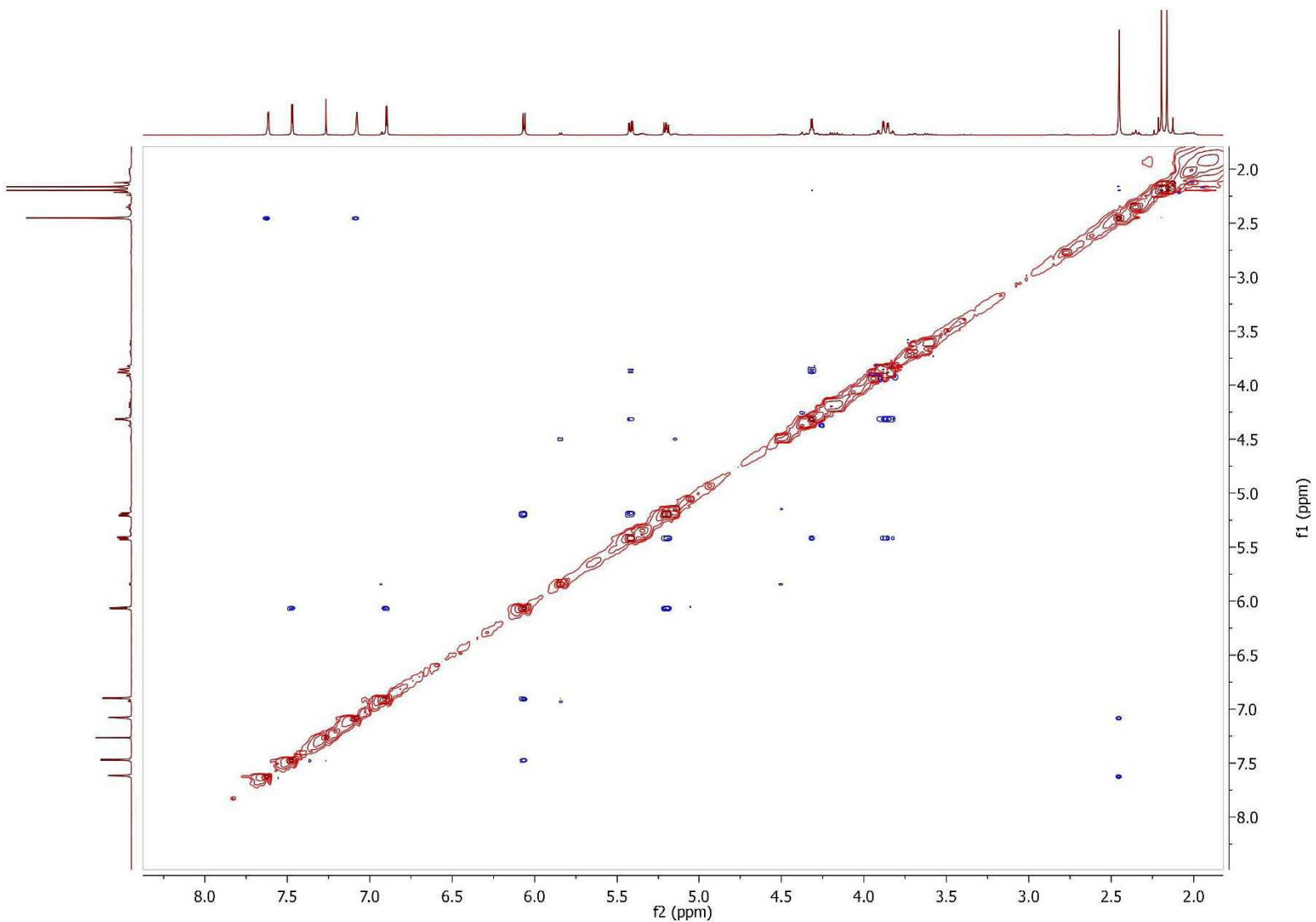


Figura A27. Espectro NOESY de **123** en  $\text{CDCl}_3$ .

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

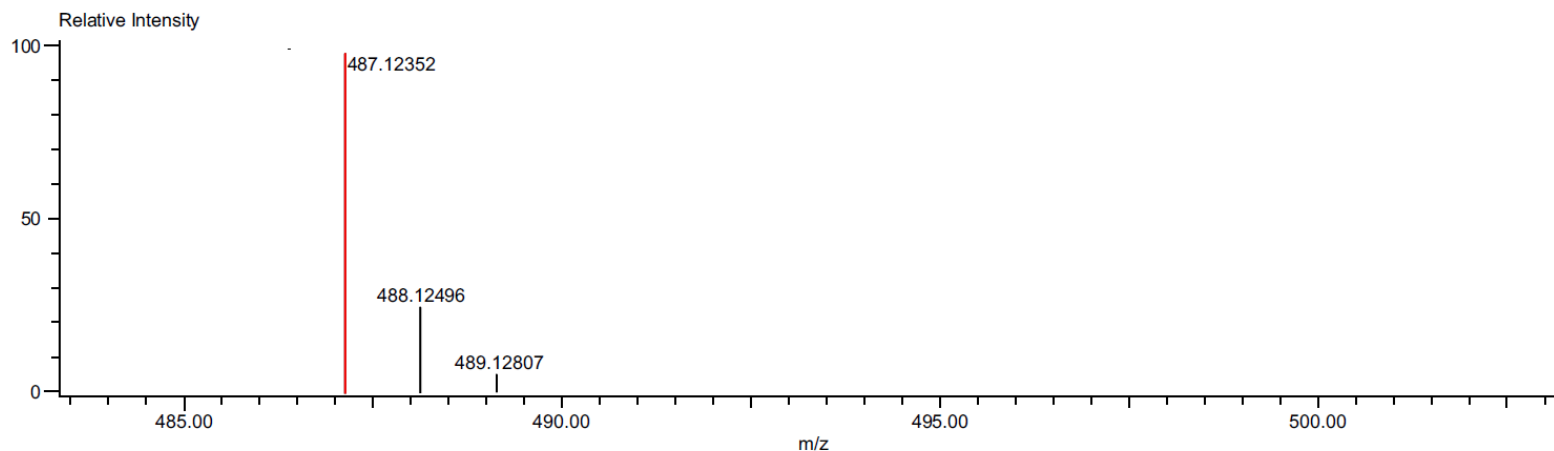
Data:1984 MR14-F  
 Sample Name:Dra Macias Martha- Operador: Carmen Garcia  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area] ;Correct Base[1.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1..1)

Acquired:10/29/2018 12:35:28 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal Peg 600  
 Created:11/9/2018 8:49:07 AM  
 Created by:AccuTOF

Charge number:1  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 40, <sup>16</sup>O:0 .. 15

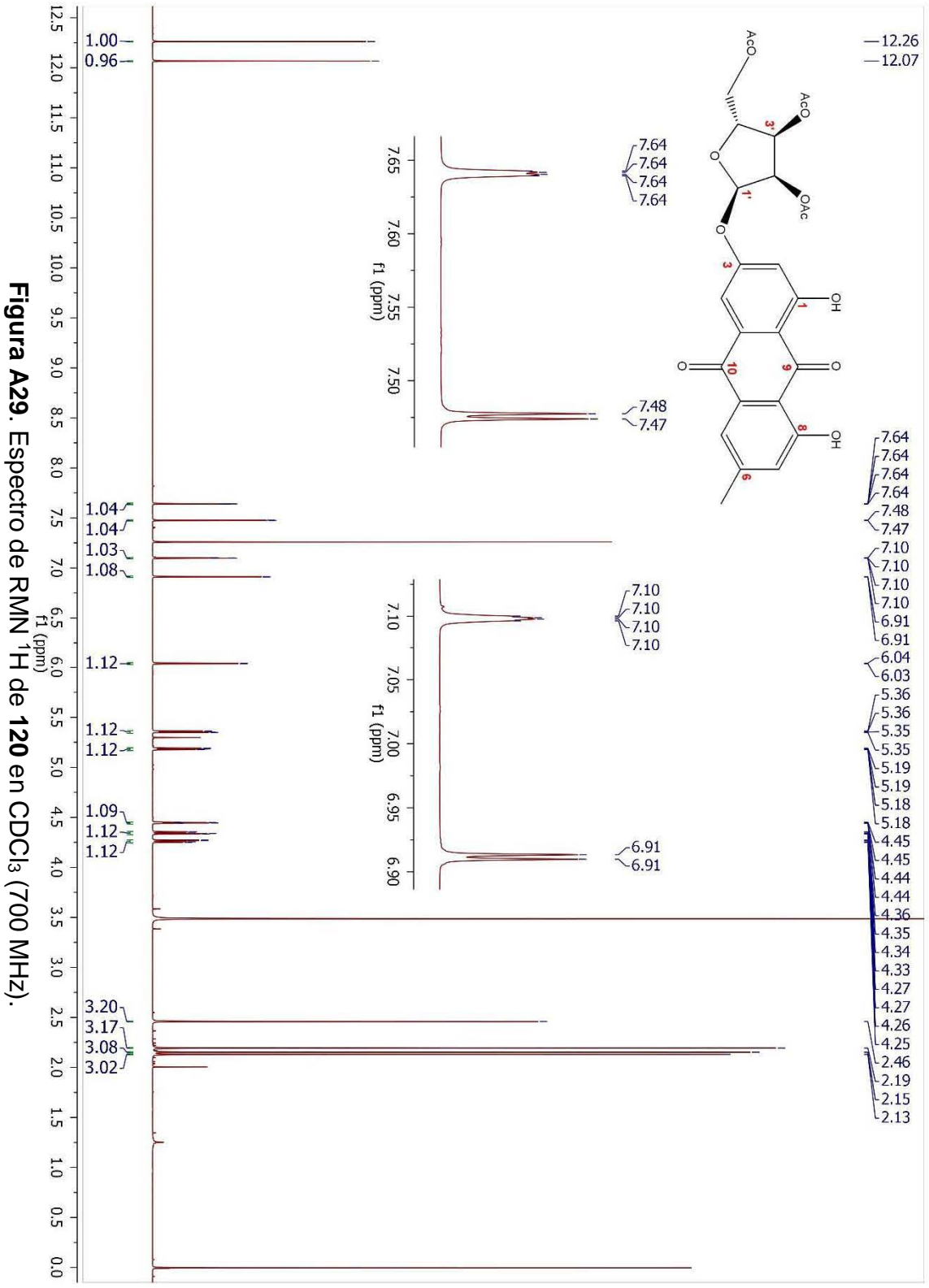
Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fraction:Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
487.12352	111286.38	487.12404	0.52	1.07	<sup>12</sup> C <sub>24</sub> <sup>1</sup> H <sub>23</sub> <sup>16</sup> O <sub>11</sub>	13.5

**Figura A28. Espectro de HRESIMS de 123.**



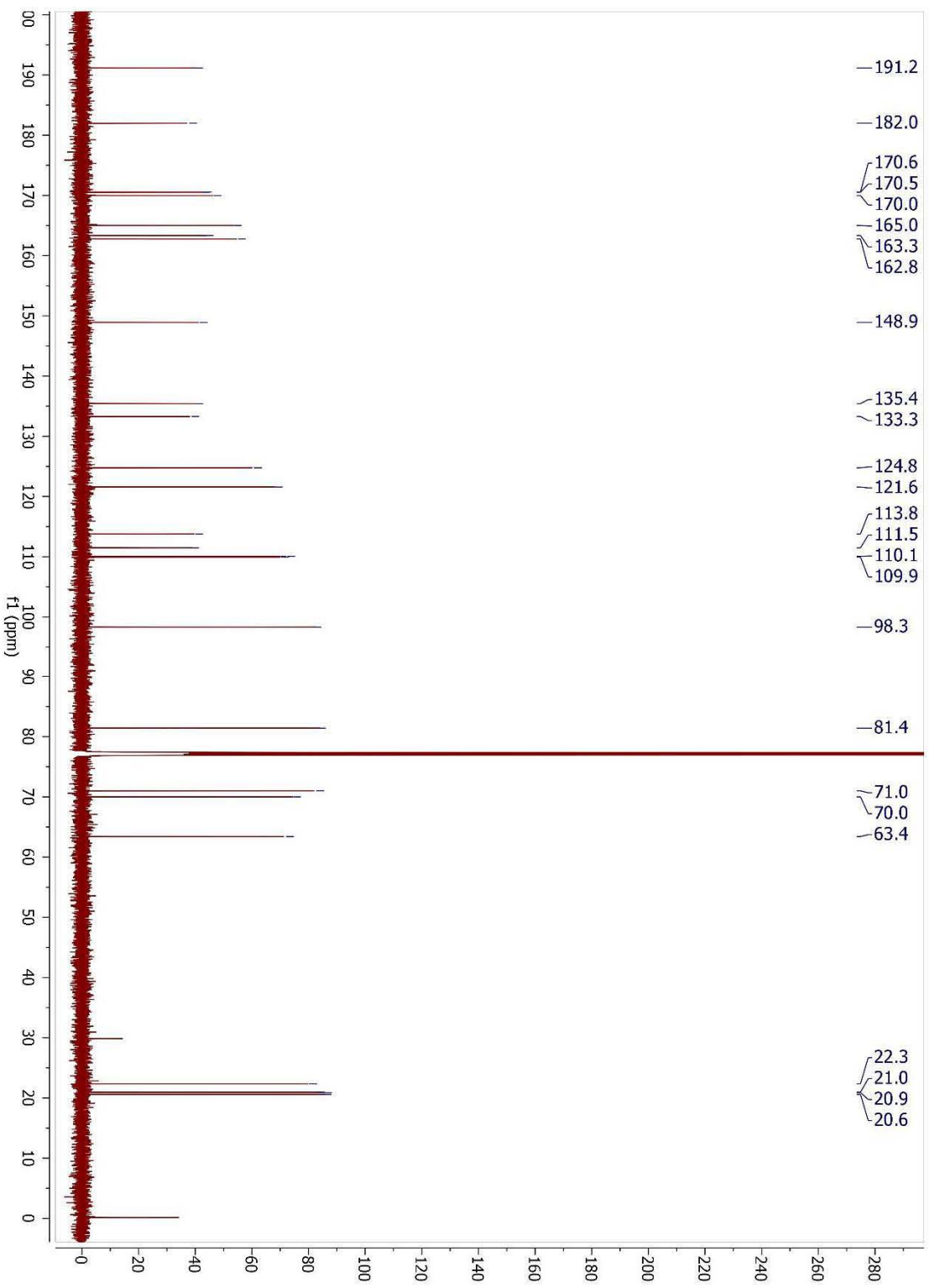


Figura A30. Espectro de <sup>13</sup>C NMR de 120 en CDCl<sub>3</sub> (175 MHz).

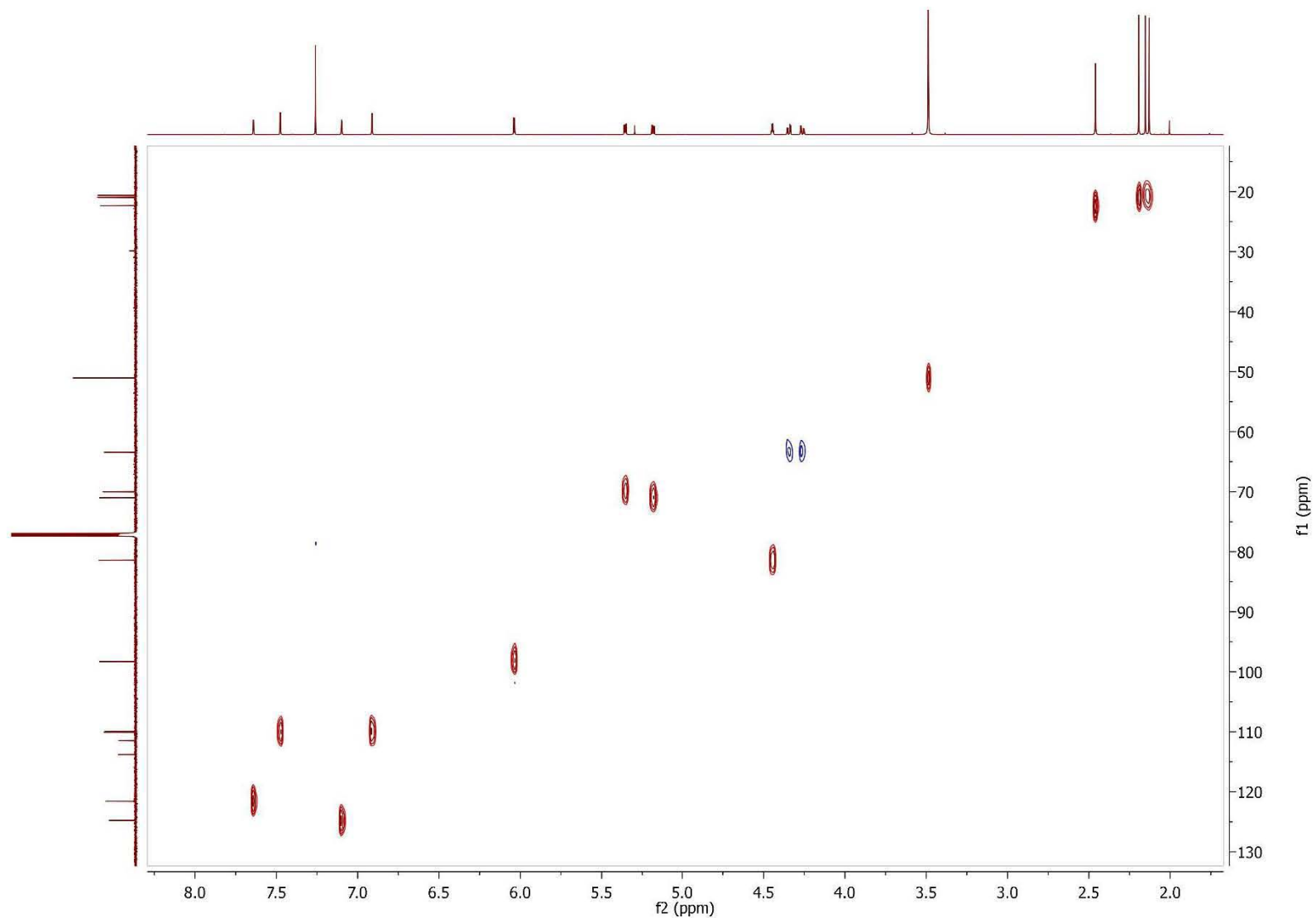


Figura A31. Espectro HSQC de **120** en CDCl<sub>3</sub>.

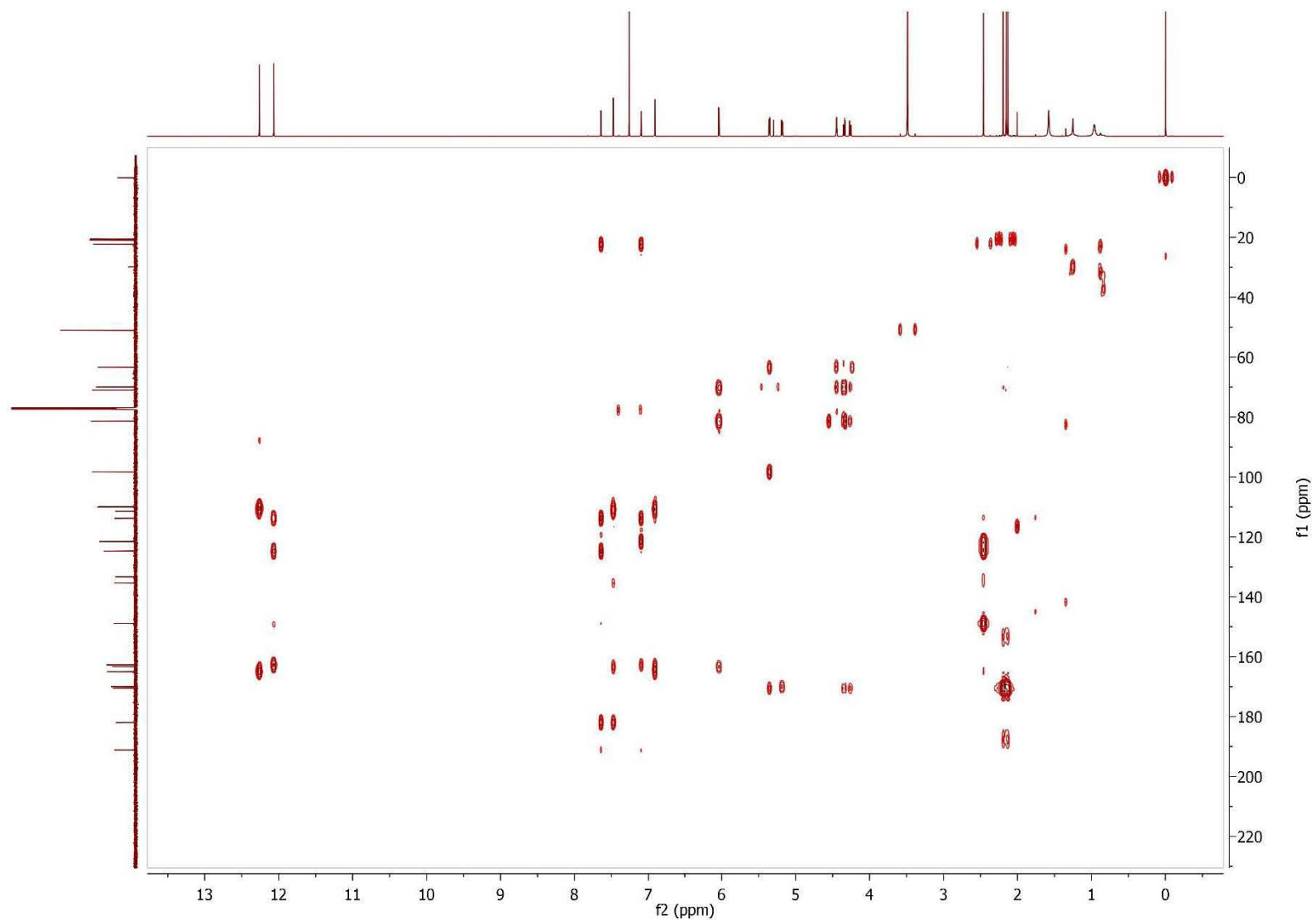


Figura A32. Espectro HMBC de **120** en CDCl<sub>3</sub>.

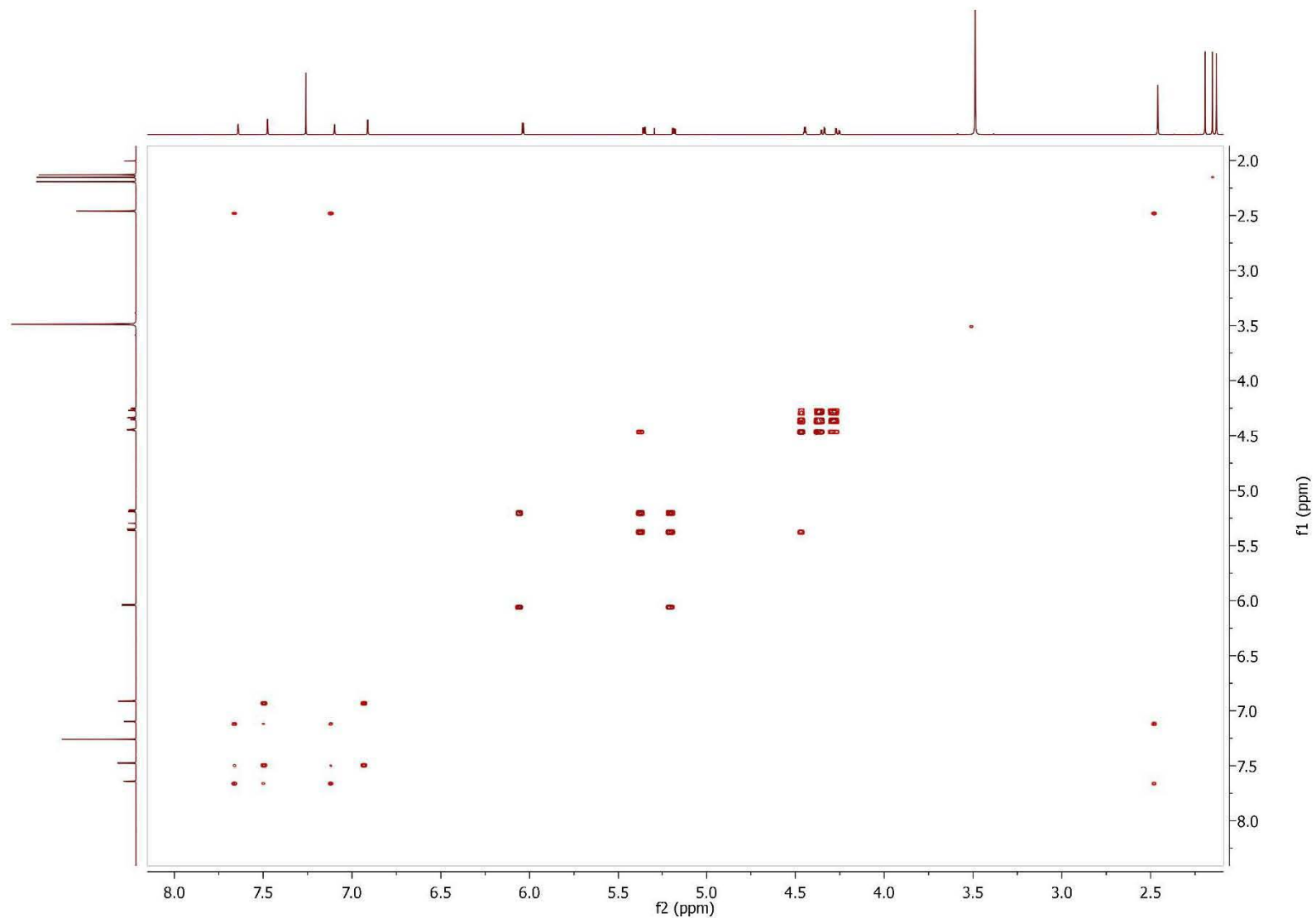


Figura A33. Espectro COSY de **120** en CDCl<sub>3</sub>.



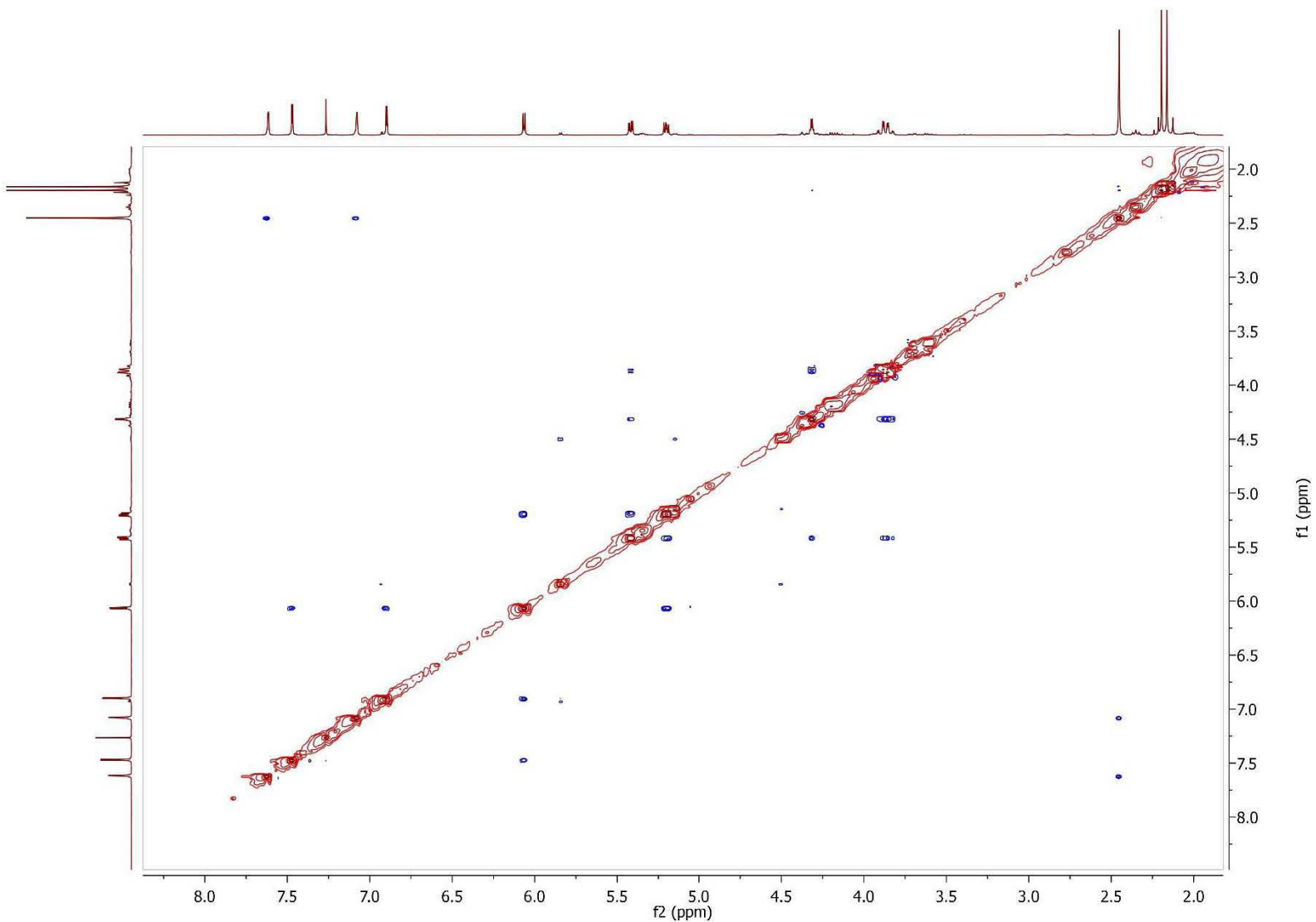


Figura A34. Espectro NOESY de **120** en  $\text{CDCl}_3$ .

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:926 MR15-Ma-H

Sample Name:Dra Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average(MS[...

Acquired:5/22/2019 10:50:17 AM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:5/31/2019 12:17:55 PM

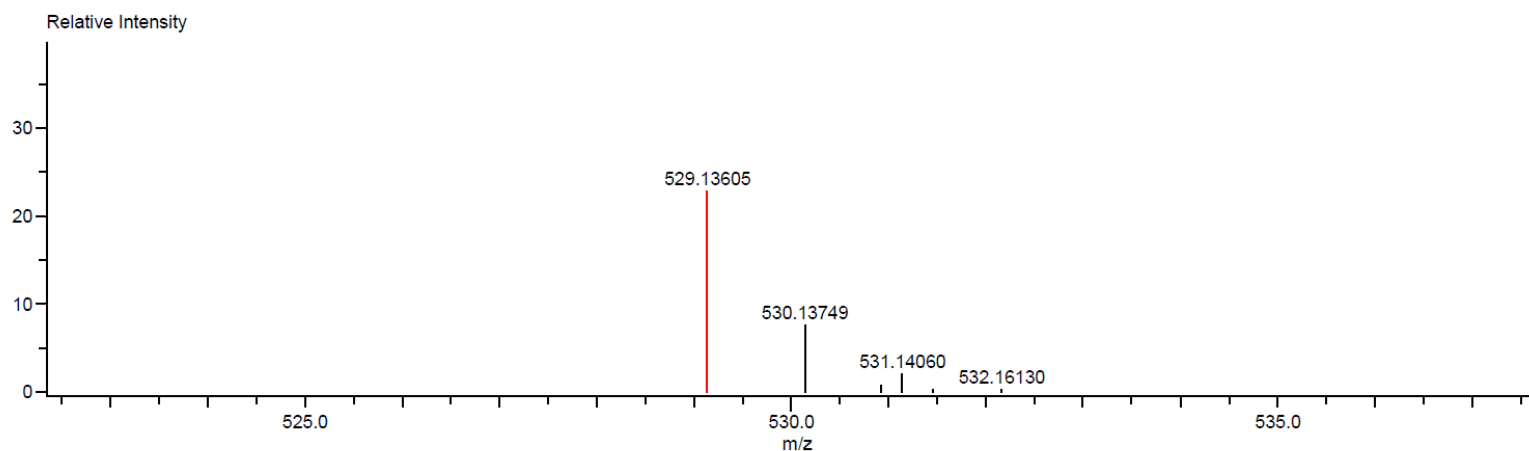
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:5.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 50, <sup>16</sup>O:0 .. 15



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
529.13605	11465.52	529.13460	1.45	2.74	<sup>12</sup> C <sub>26</sub> <sup>1</sup> H <sub>25</sub> <sup>16</sup> O <sub>12</sub>	14.5

**Figura A35. Espectro de HRESIMS de 120.**

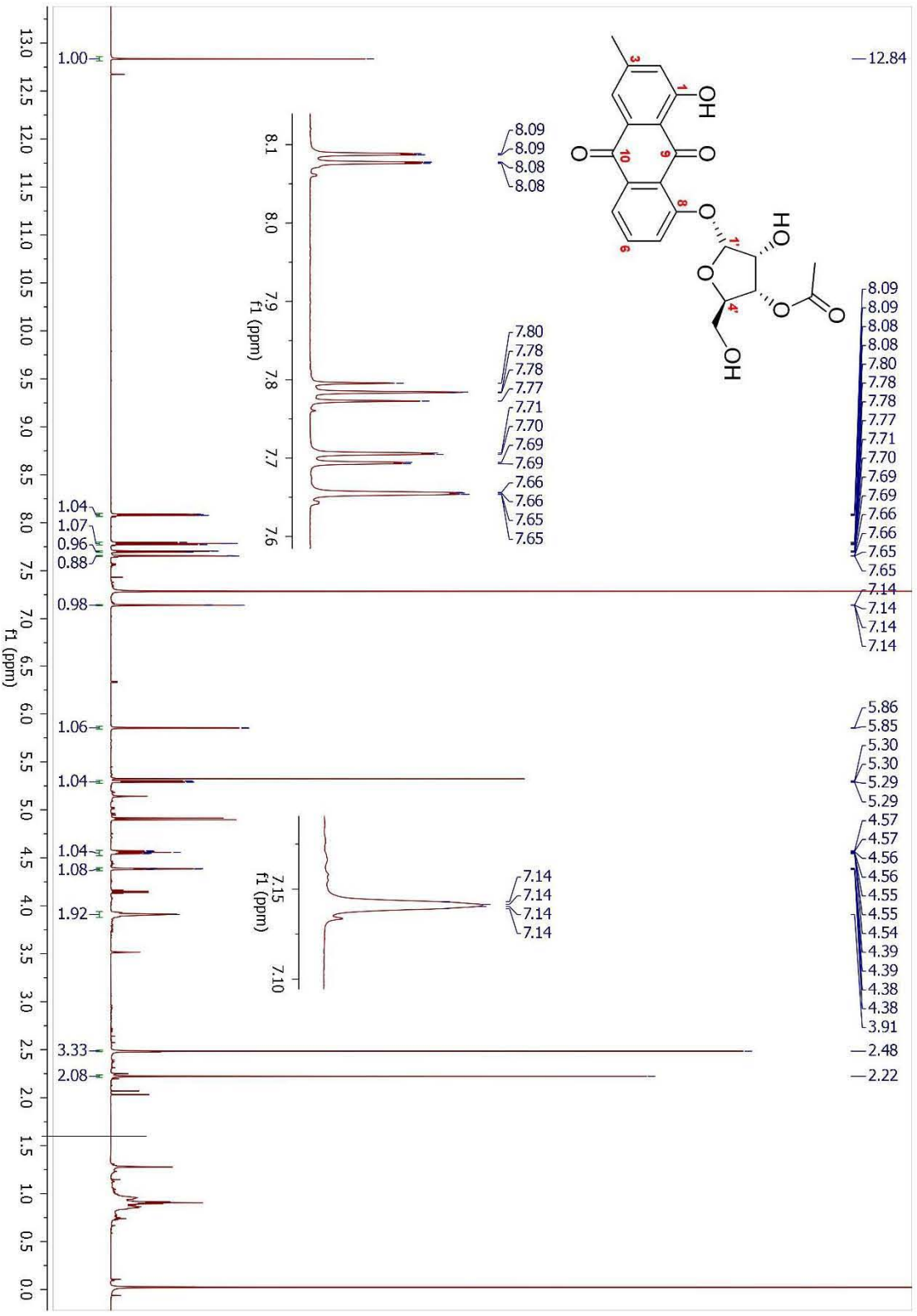


Figura A36. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 125 en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).

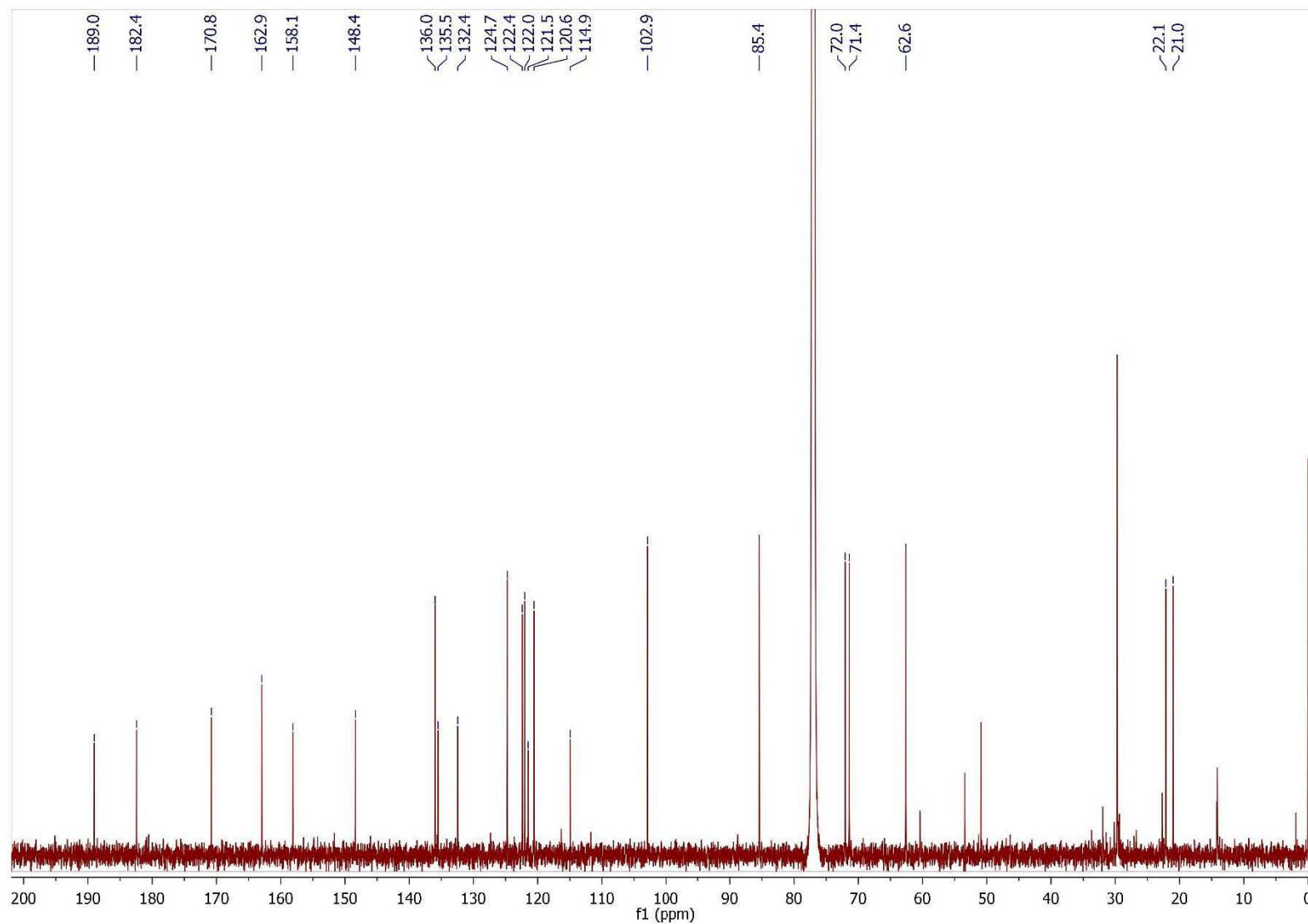


Figura A37. Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **125** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).

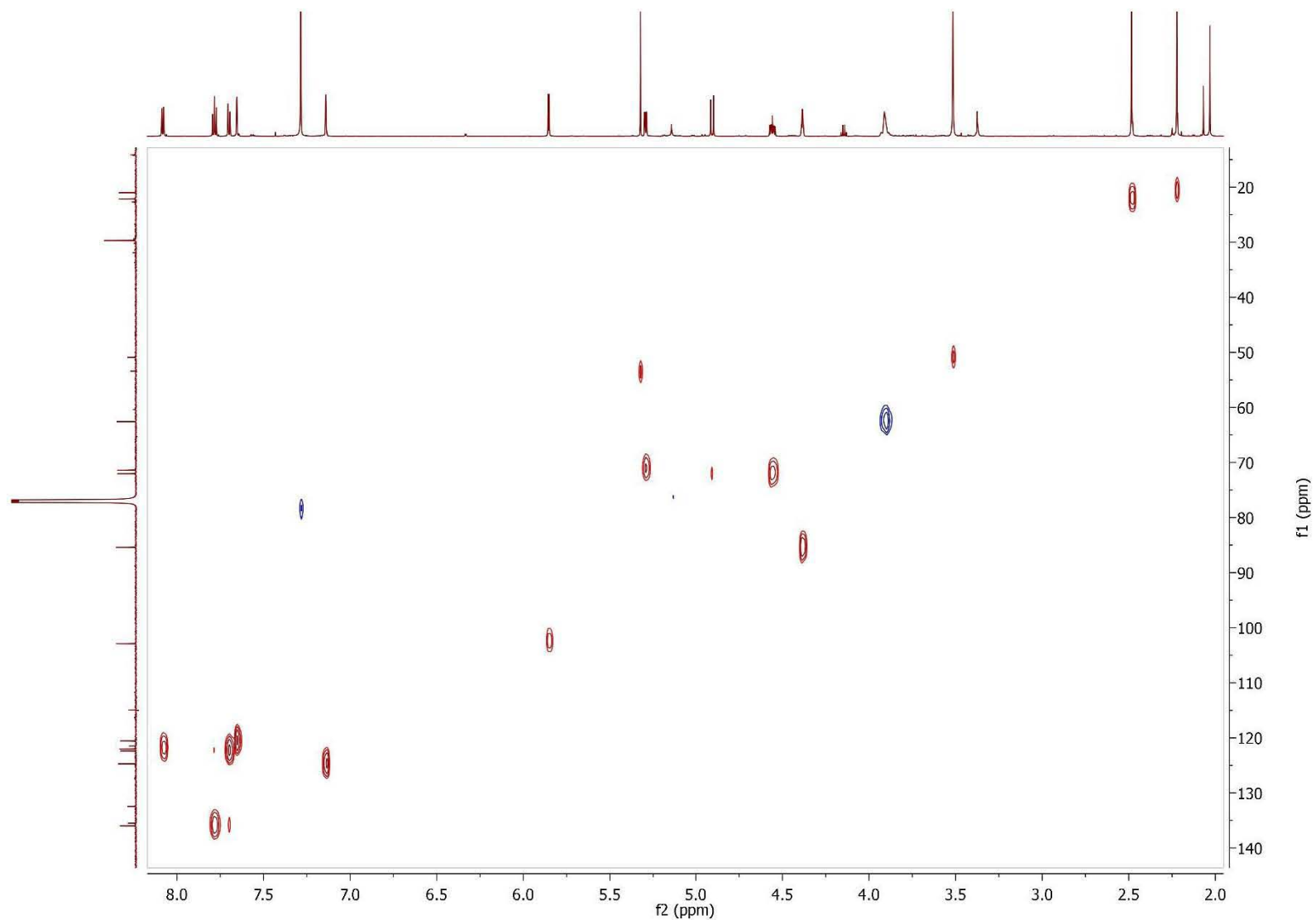


Figura A38. Espectro HSQC de **125** en  $\text{CDCl}_3$ .

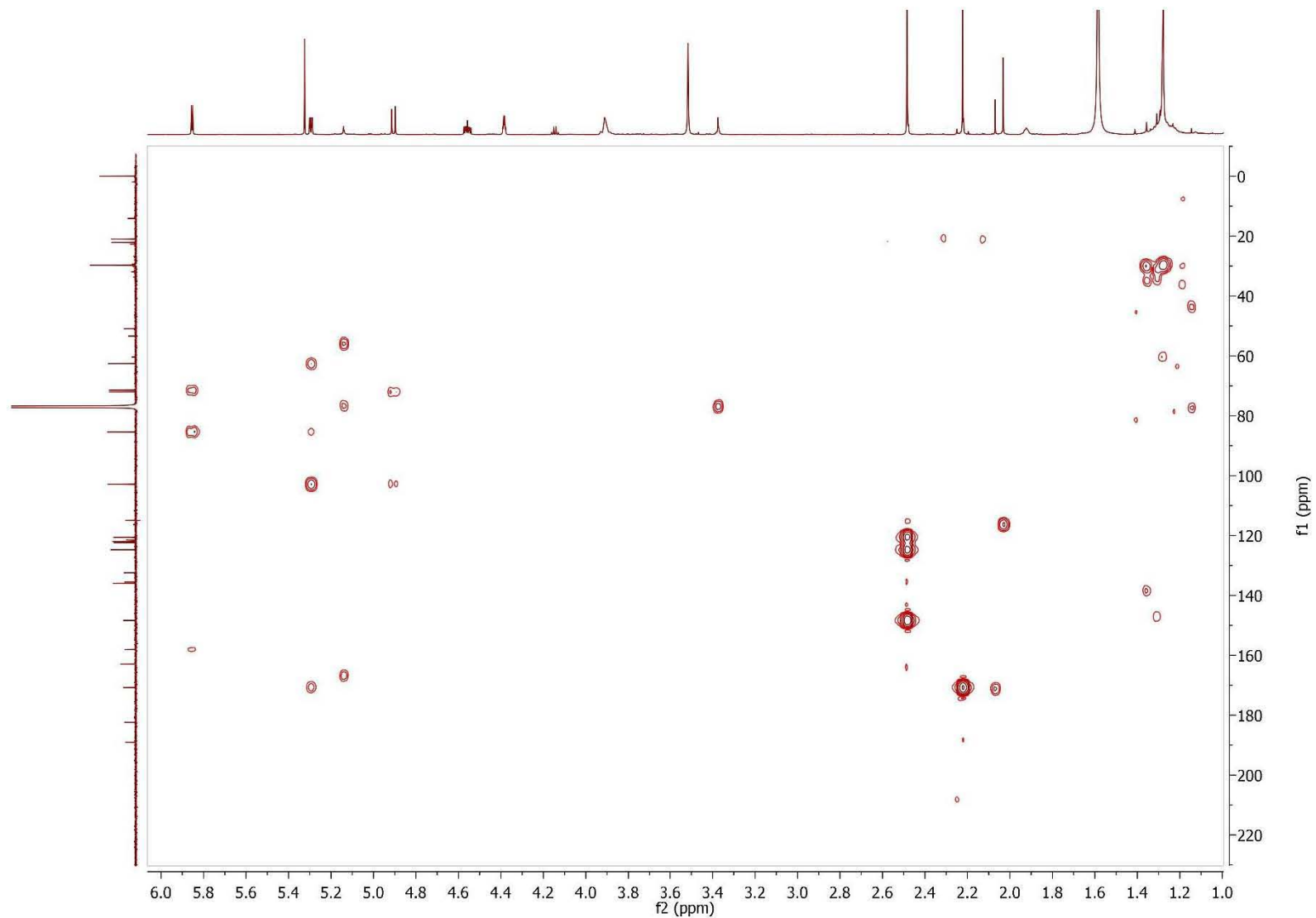


Figura A39. Espectro HMBC de 125 en CDCl<sub>3</sub>.

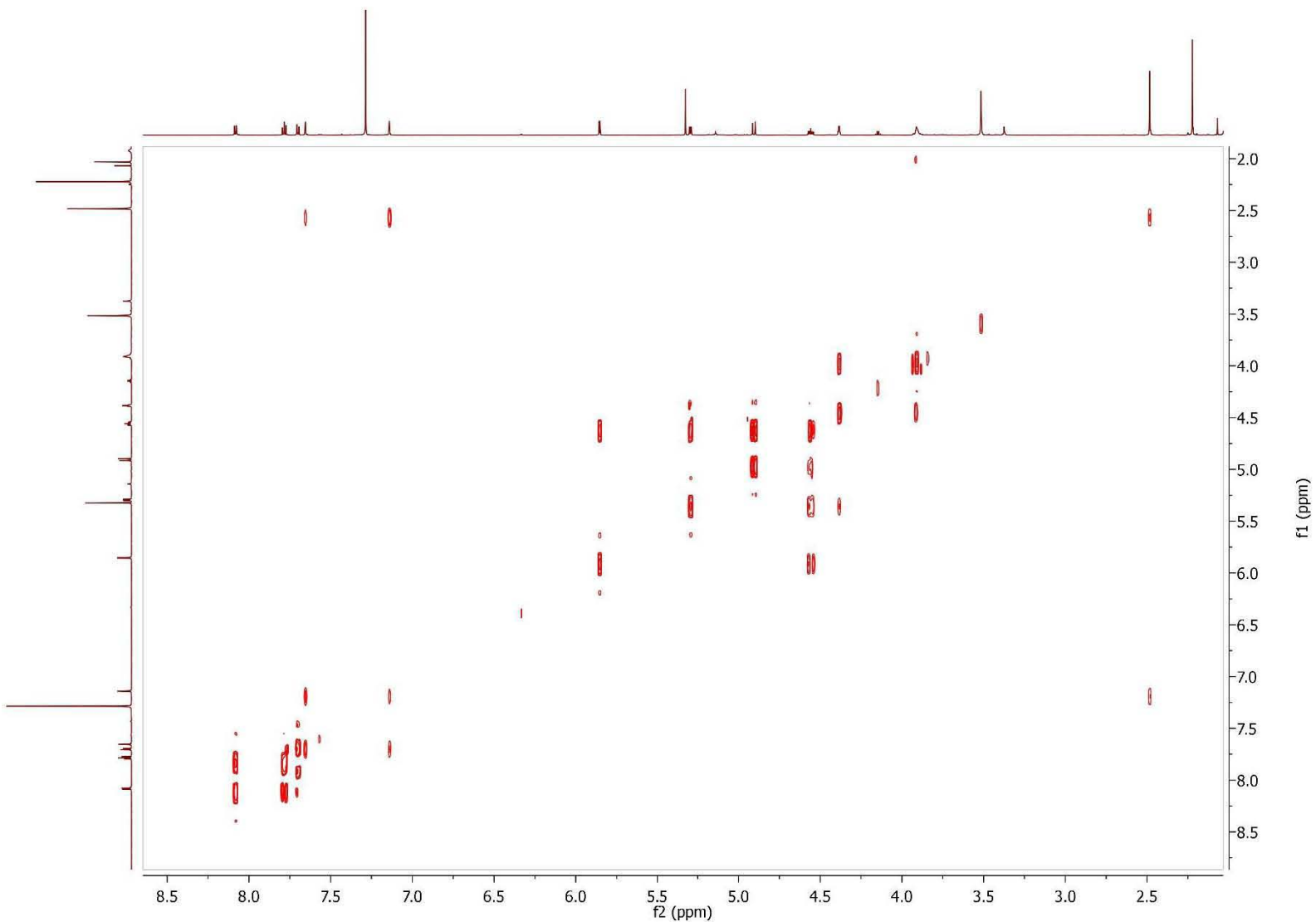


Figura A40. Espectro COSY de 125 en CDCl<sub>3</sub>.

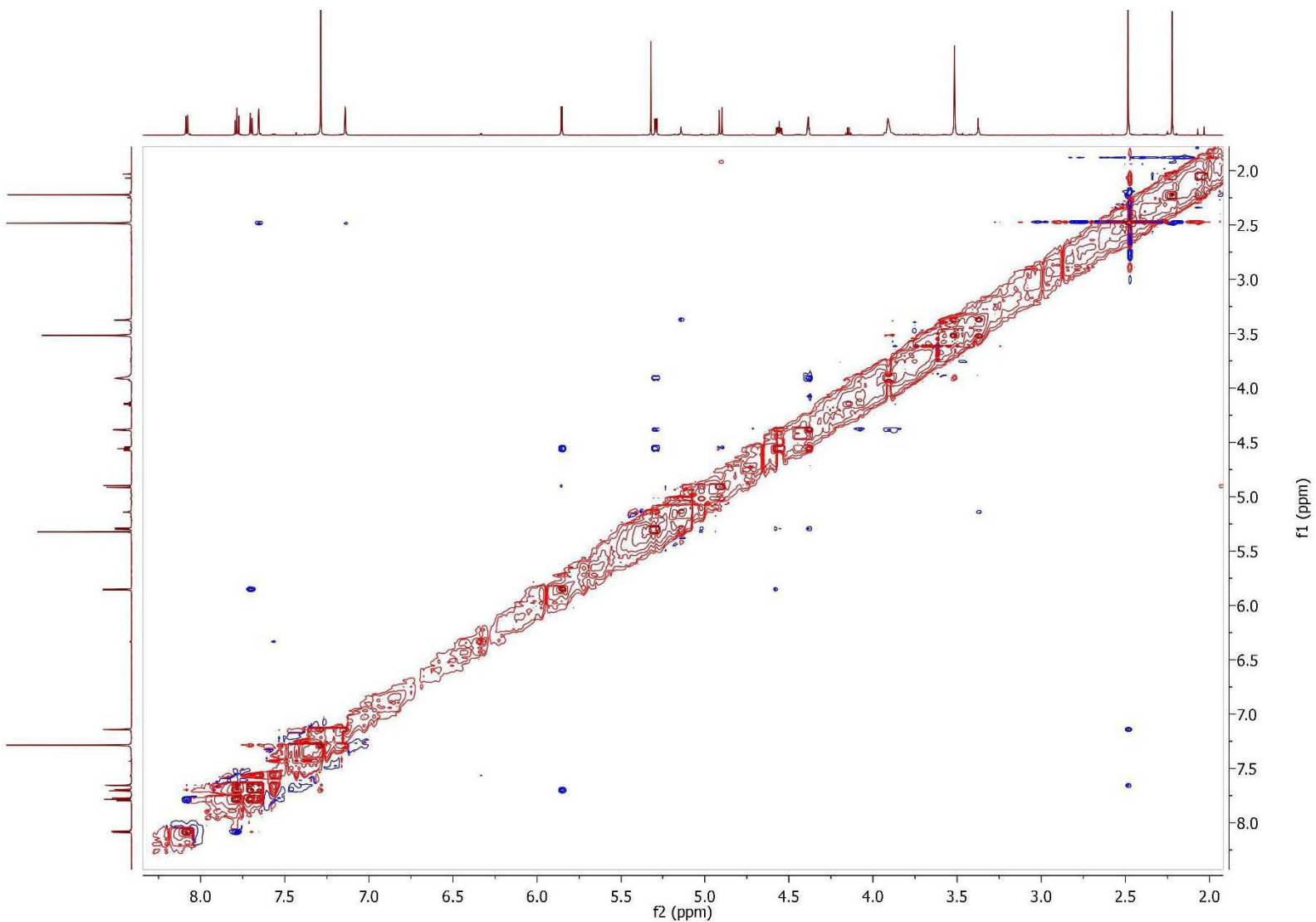


Figura A41. Espectro NOESY de 125 en  $\text{CDCl}_3$ .



**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:1448 MR15-Ma-U3

Sample Name:Dra Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area] ;Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average(MS[...

Acquired:8/15/2019 2:45:10 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:8/26/2019 3:47:29 PM

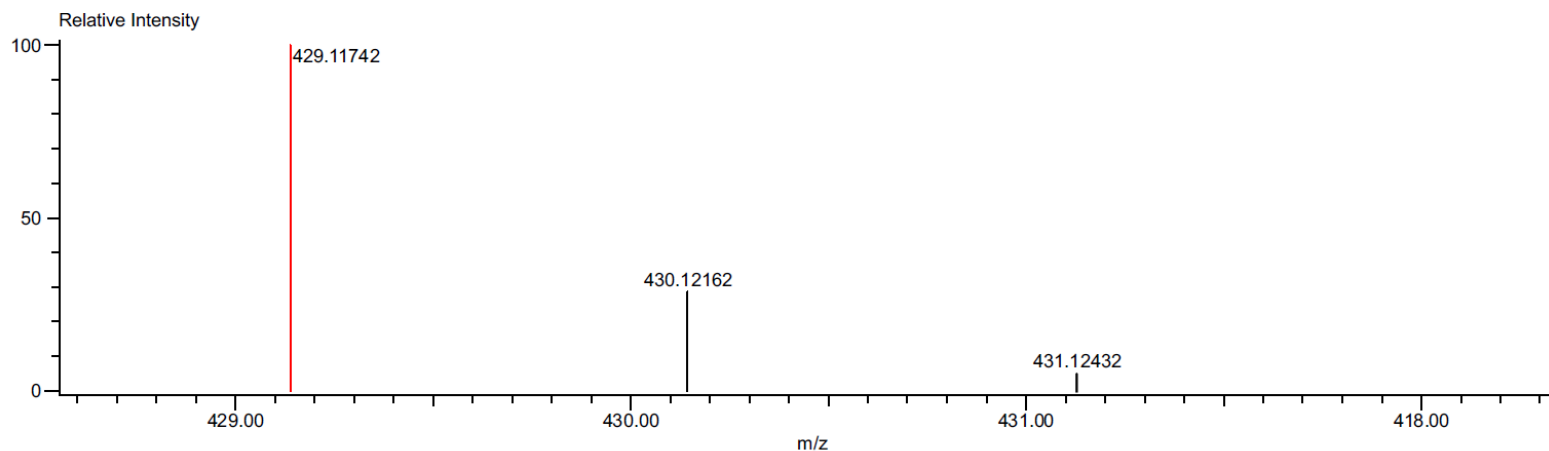
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 60, <sup>16</sup>O:0 .. 15



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
429.11742	712515.26	429.11856	1.14	2.65	<sup>12</sup> C <sub>22</sub> <sup>1</sup> H <sub>21</sub> <sup>16</sup> O <sub>9</sub>	12.5

**Figura A42. Espectro HRESIMS de 125.**

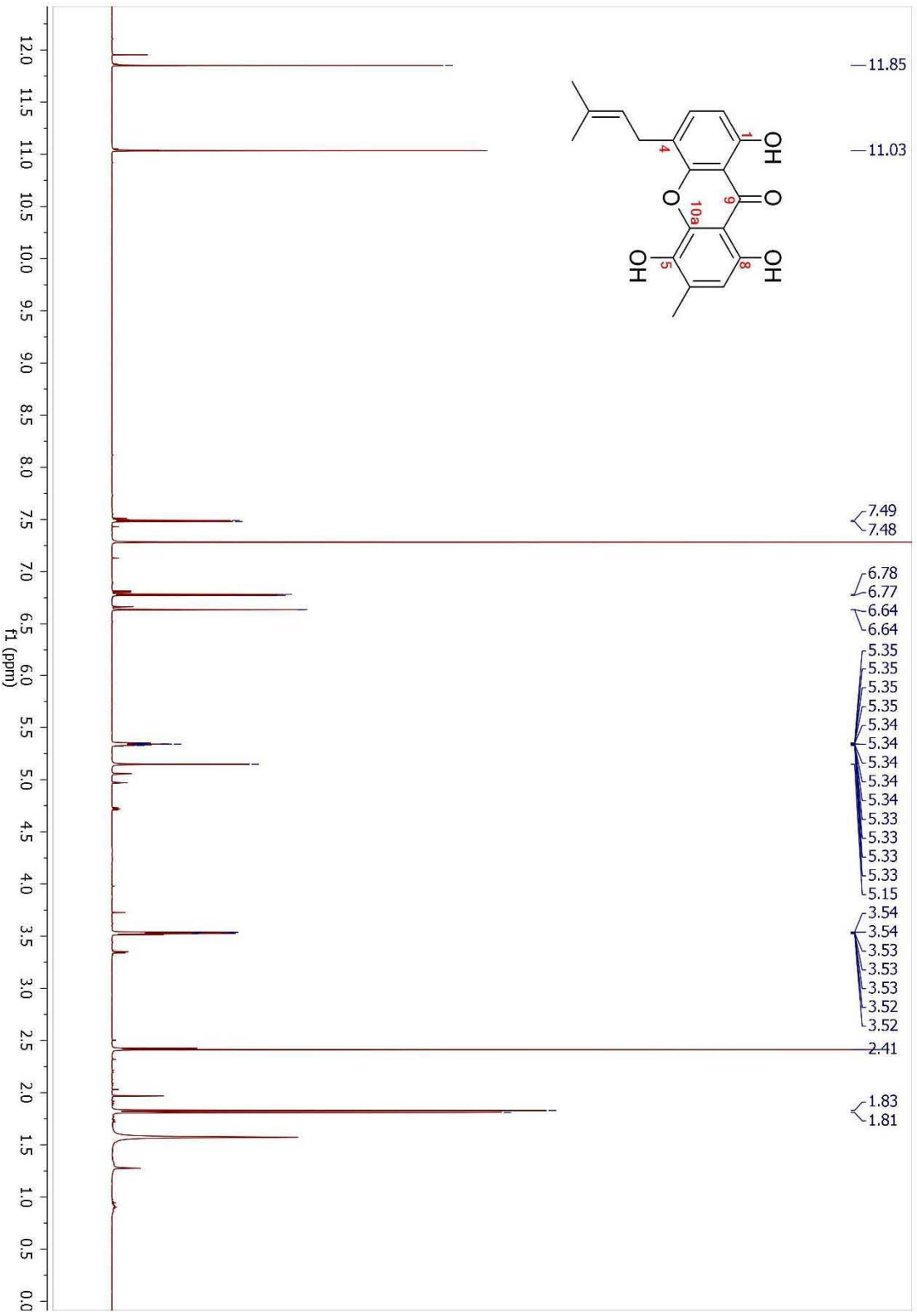


Figura A43. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 126 en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).

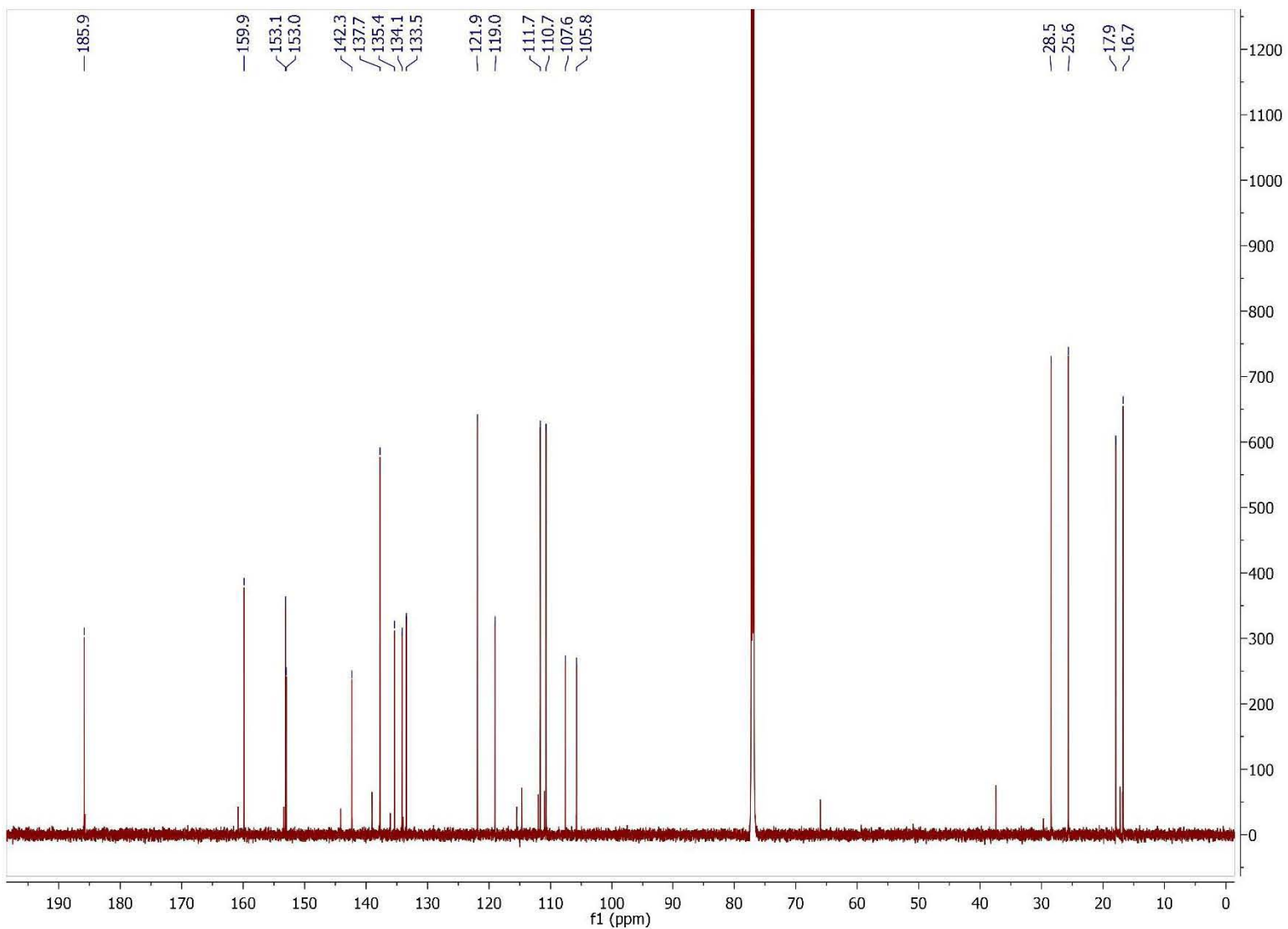


Figura A44. Espectro de <sup>13</sup>C NMR de **126** en CDCl<sub>3</sub> (175 MHz).

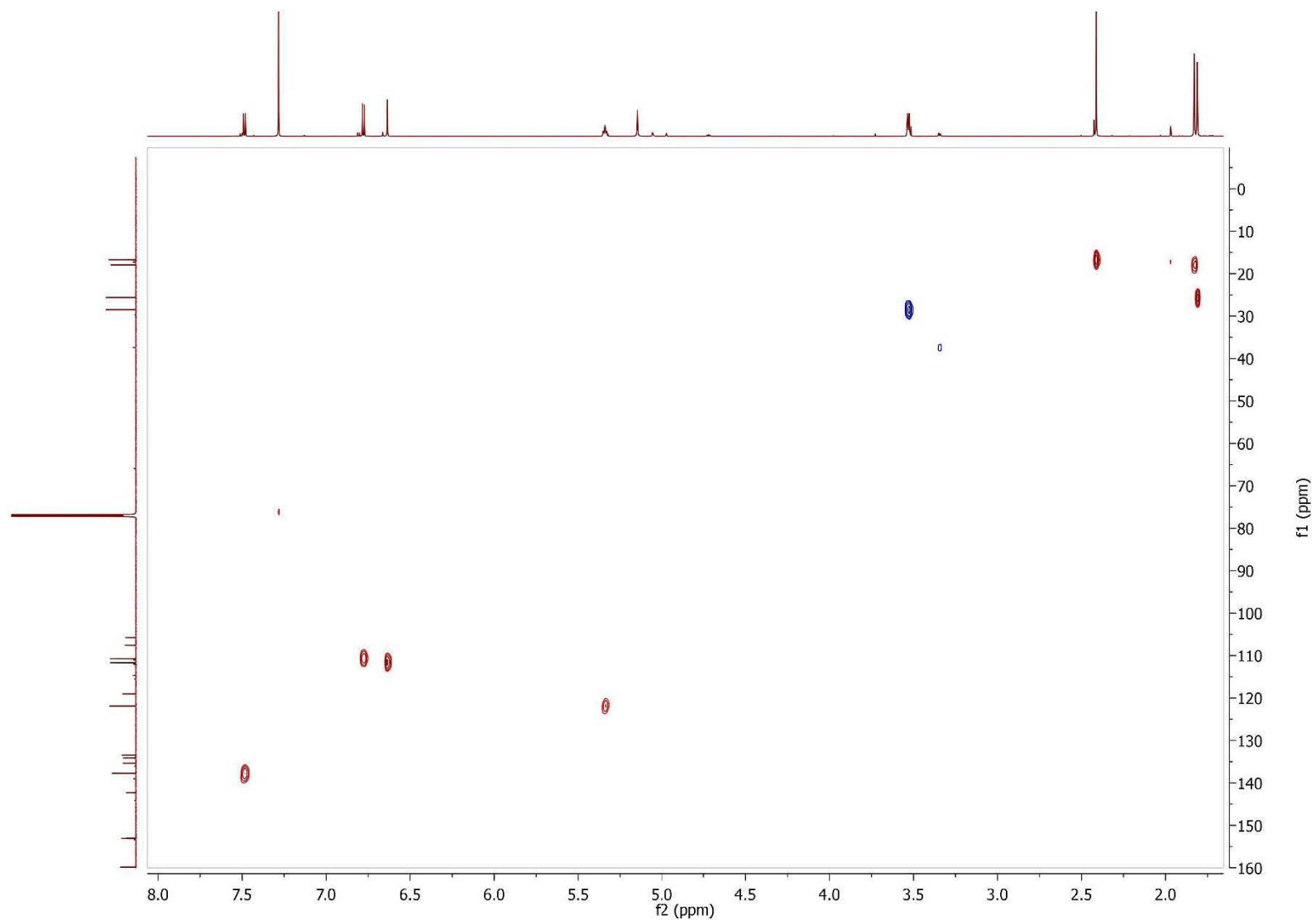


Figura A45. Espectro HSQC de **126** en  $\text{CDCl}_3$ .

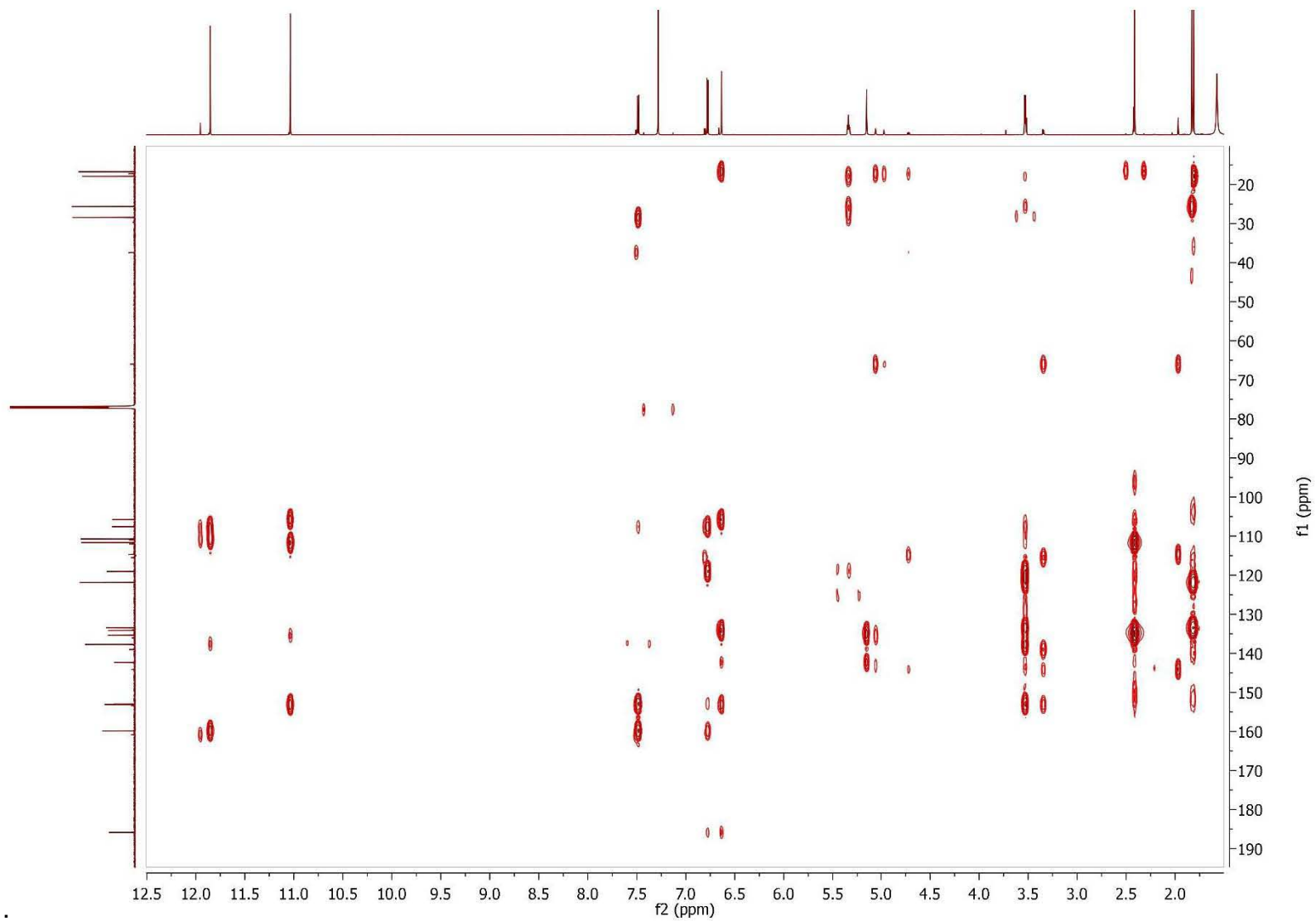


Figura A46. Espectro HMBC de 126 en CDCl<sub>3</sub>.

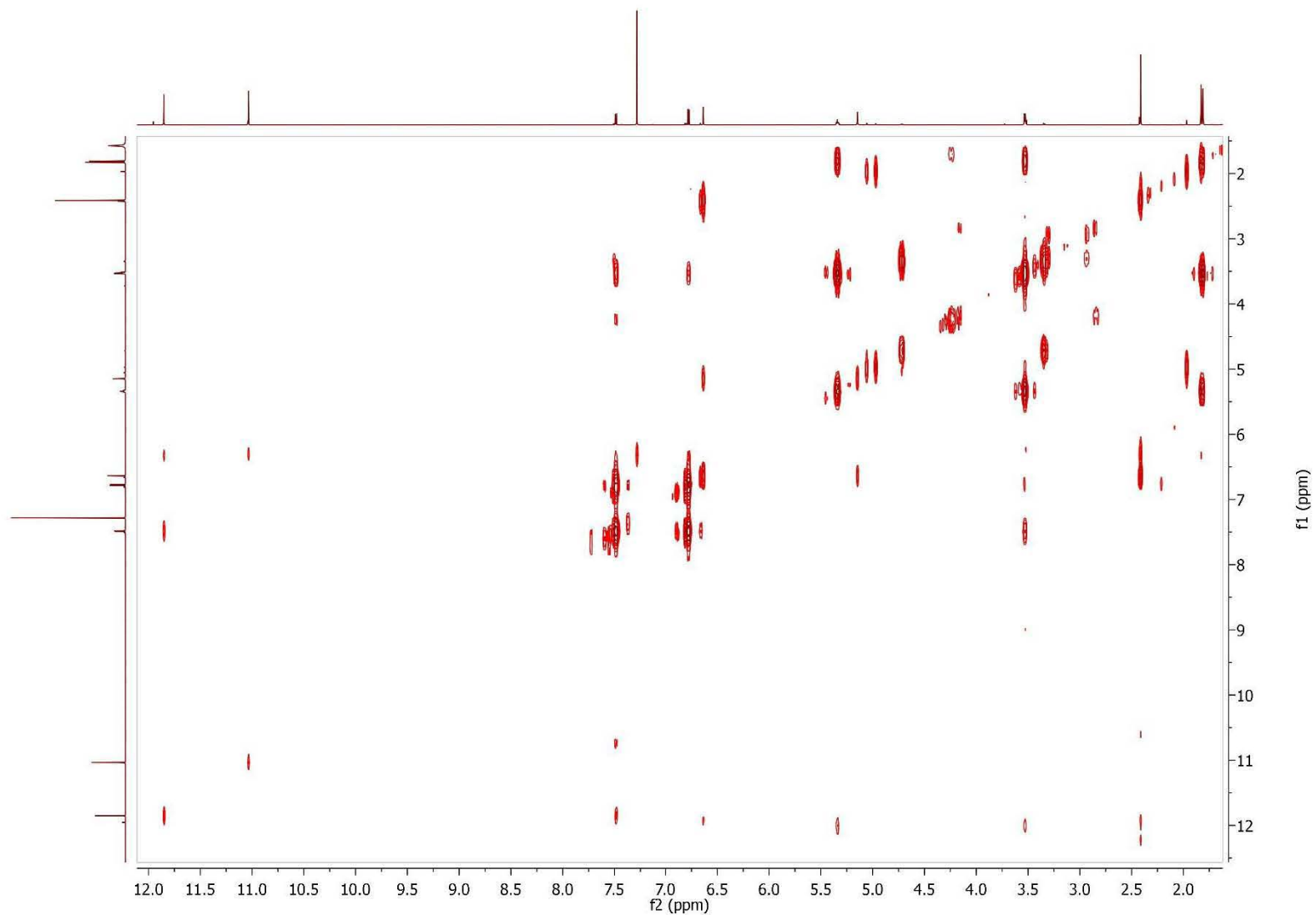


Figura A47. Espectro COSY de **126** en  $\text{CDCl}_3$ .

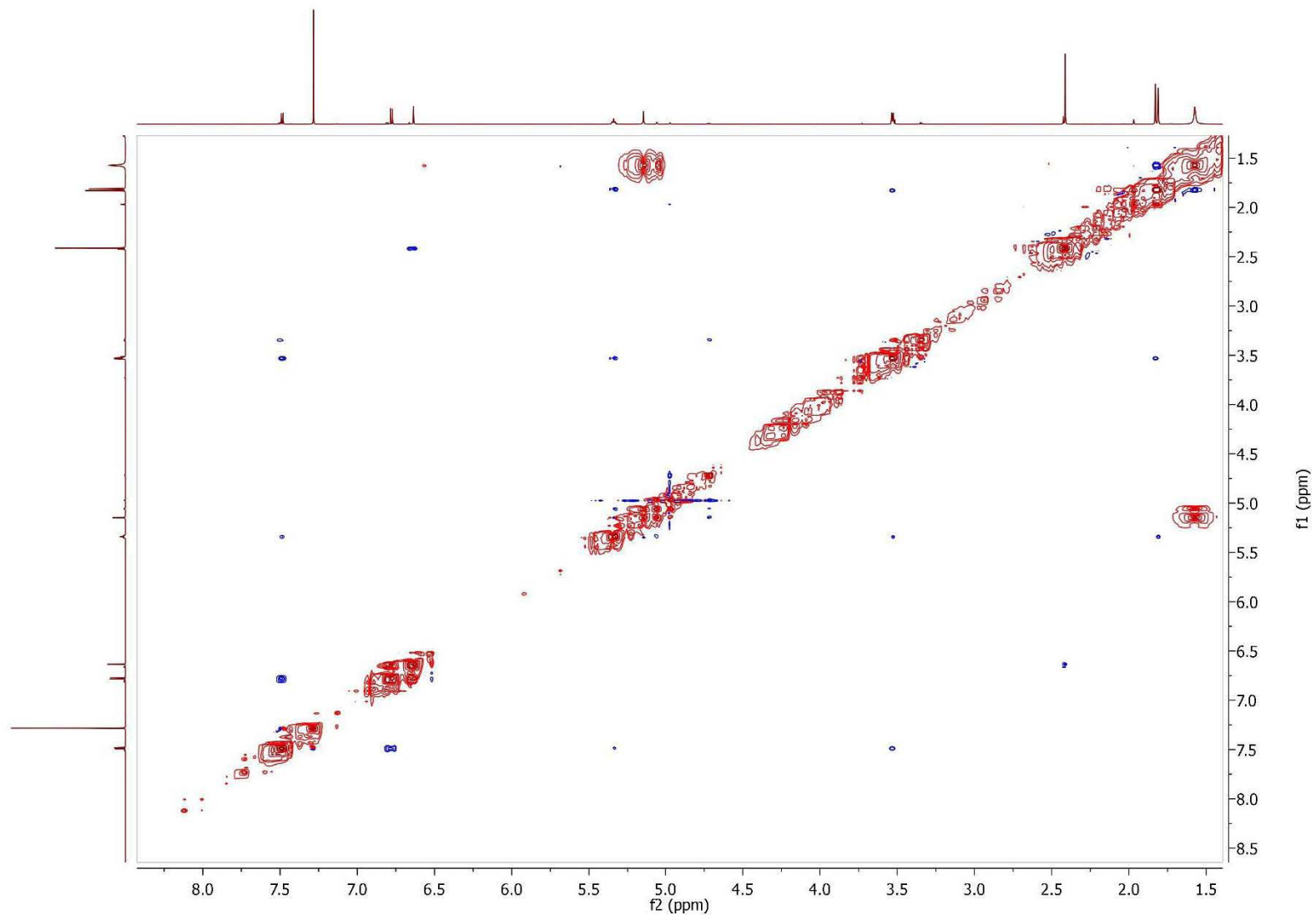


Figura A48. Espectro NOESY de 126 en CDCl<sub>3</sub>.

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:2538 MR15-Ma-R1

Sample Name:Dra Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5];Correct Base[5.0%];Average(MS[...

Acquired:5/22/2019 10:58:24 AM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:5/31/2019 13:12:32 PM

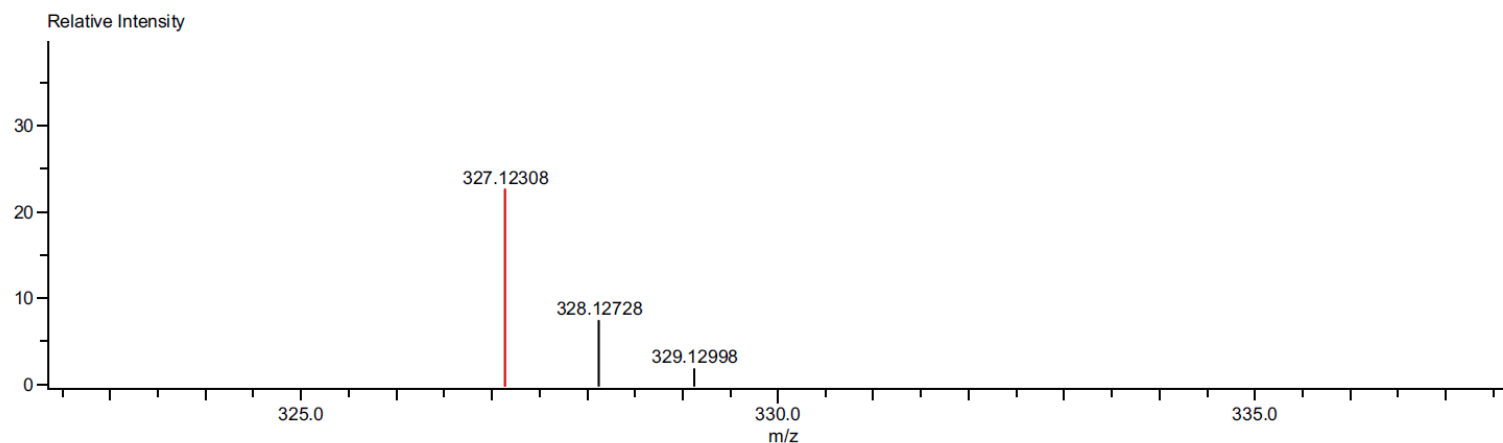
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:5.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 50, <sup>16</sup>O:0 .. 15



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
327.12308	13405.25	327.12325	0.17	0.52	<sup>12</sup> C <sub>19</sub> <sup>1</sup> H <sub>19</sub> <sup>16</sup> O <sub>5</sub>	10.5

**Figura A49.** Espectro de HRESIMS de 126.



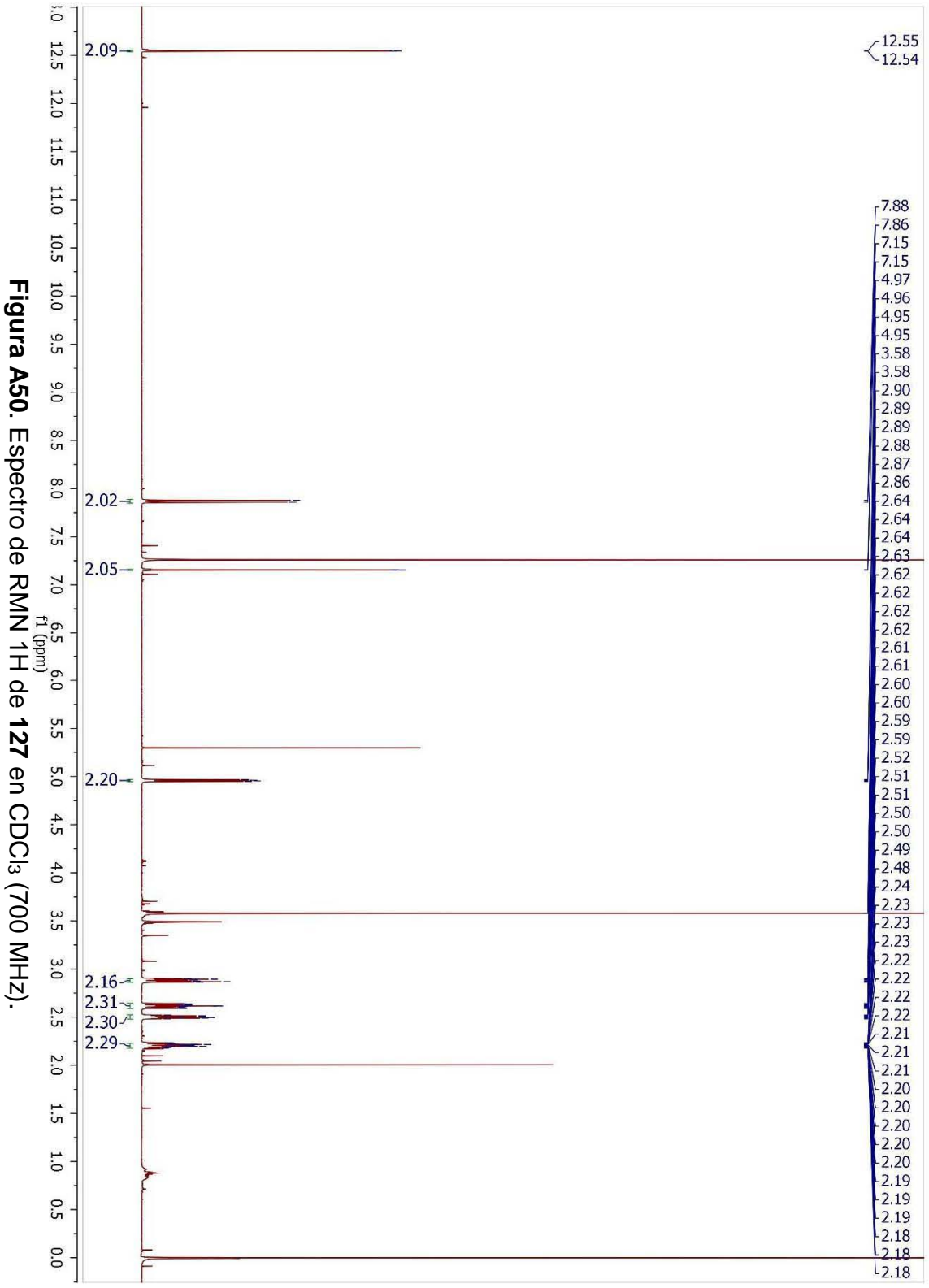


Figura A50. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 127 en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).

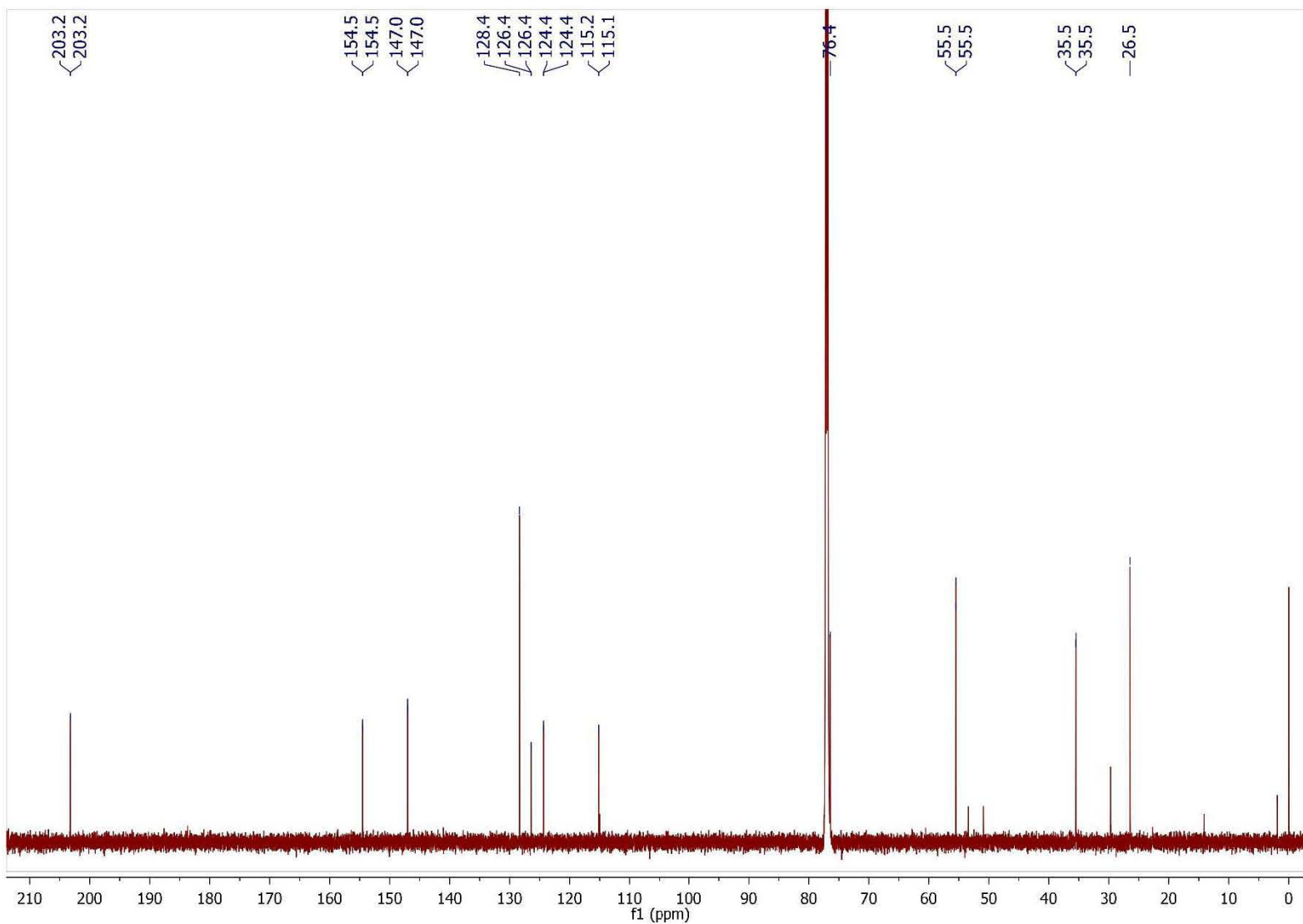


Figura A51. Espectro de <sup>13</sup>C NMR de 127 en CDCl<sub>3</sub> (175 MHz).

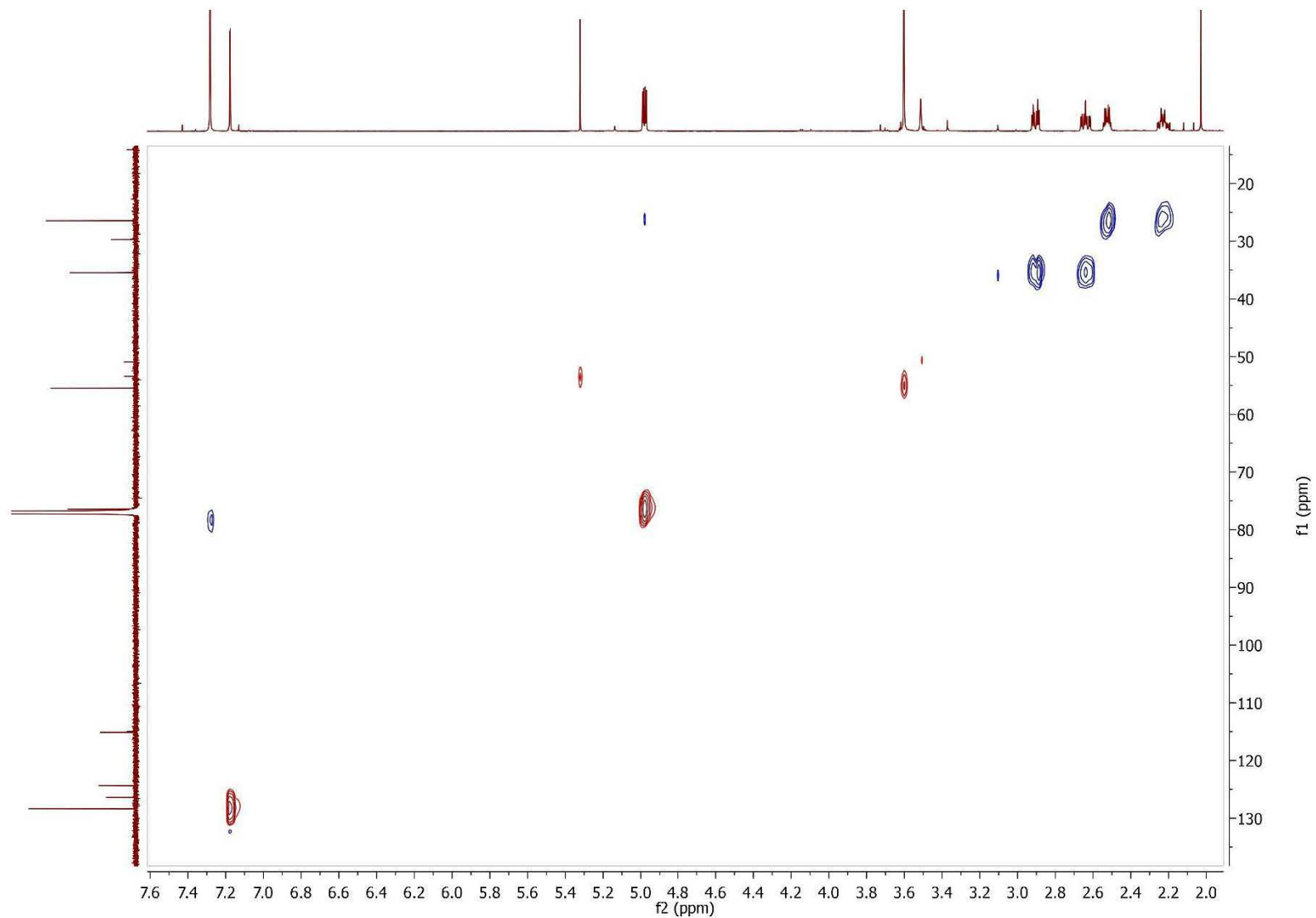


Figura A52. Espectro HSQC de 127 en CDCl<sub>3</sub>.

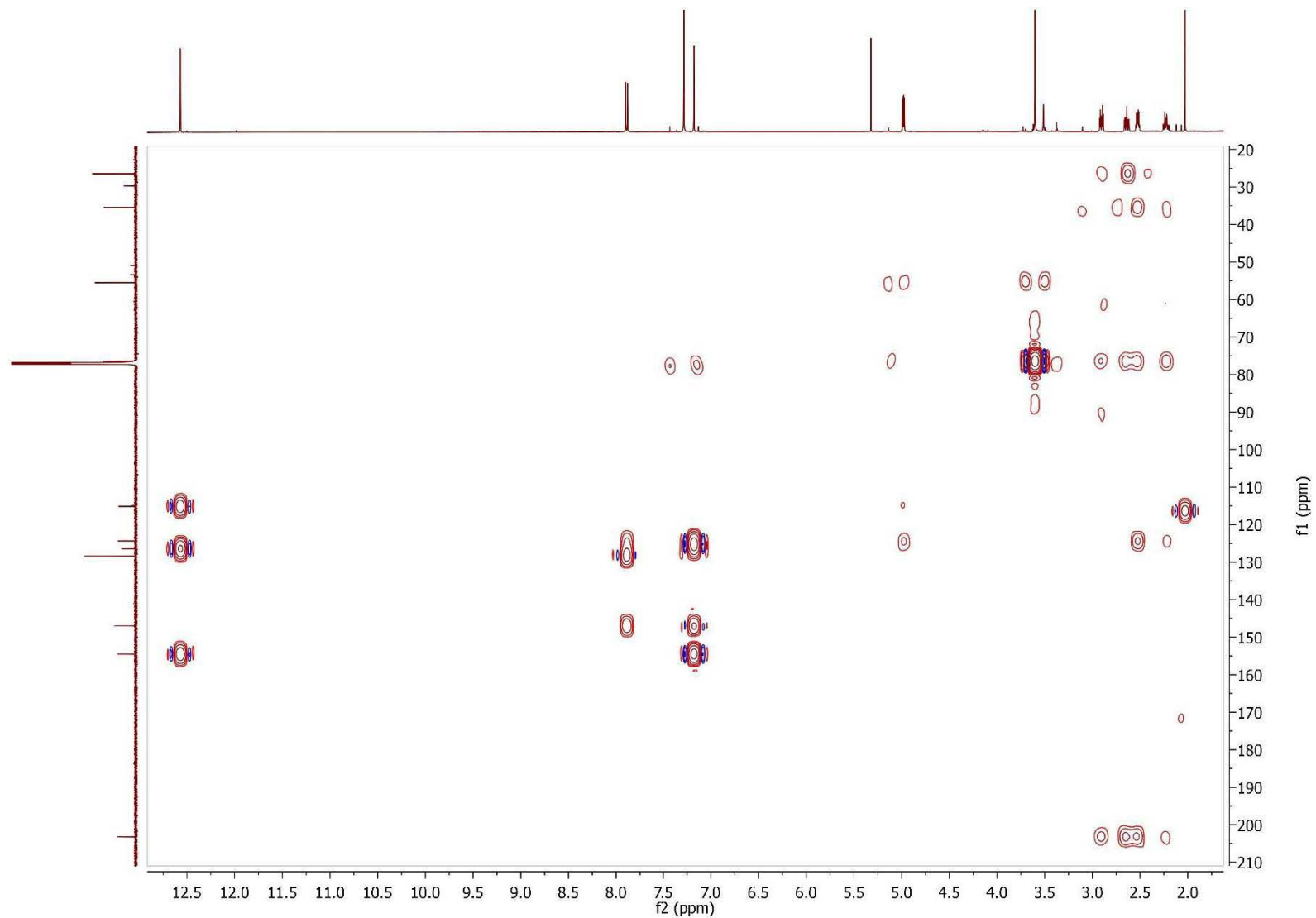
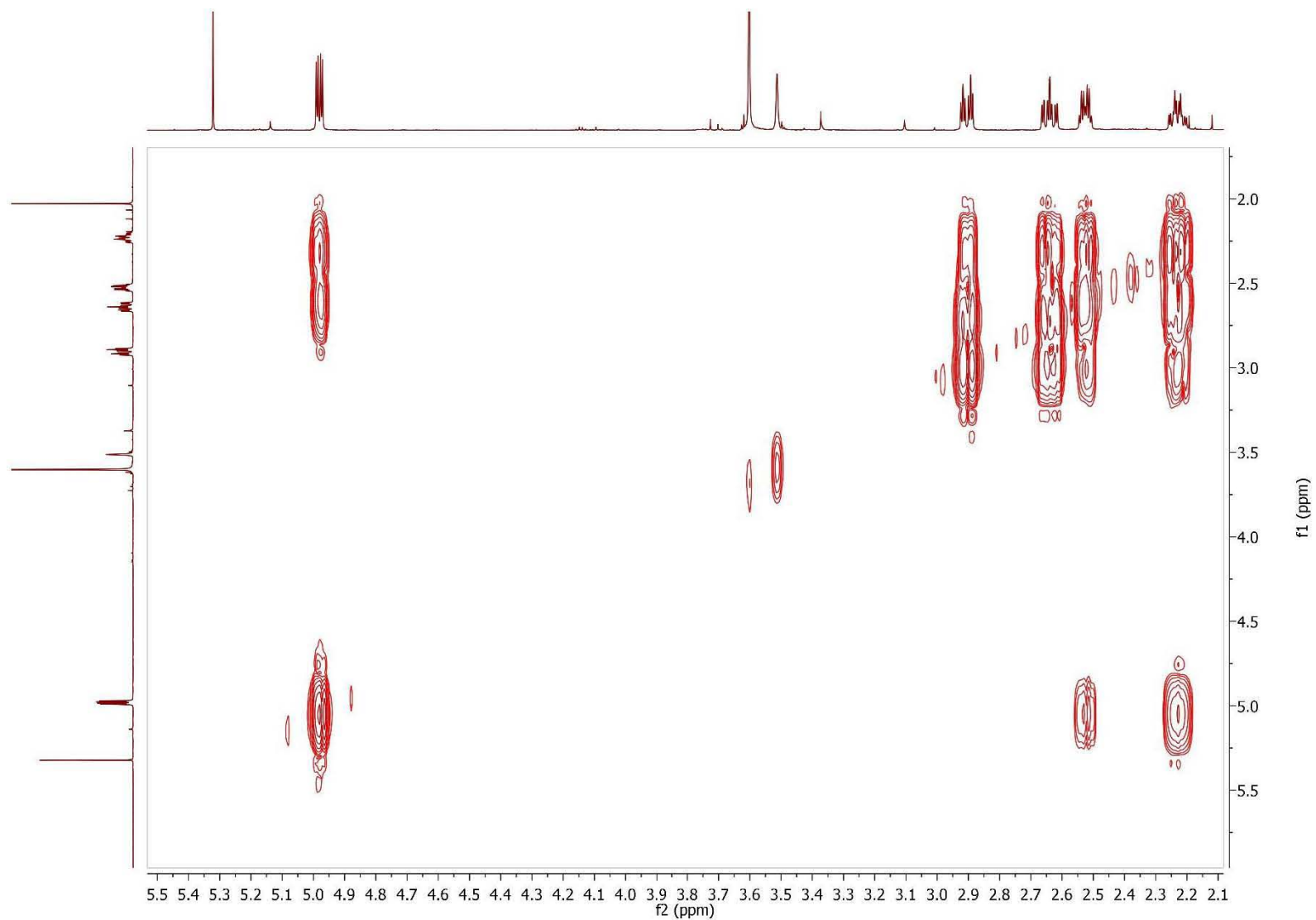


Figura A53. Espectro HMBC de 127 en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura A54.** Espectro COSY de 127 en CDCl<sub>3</sub>.

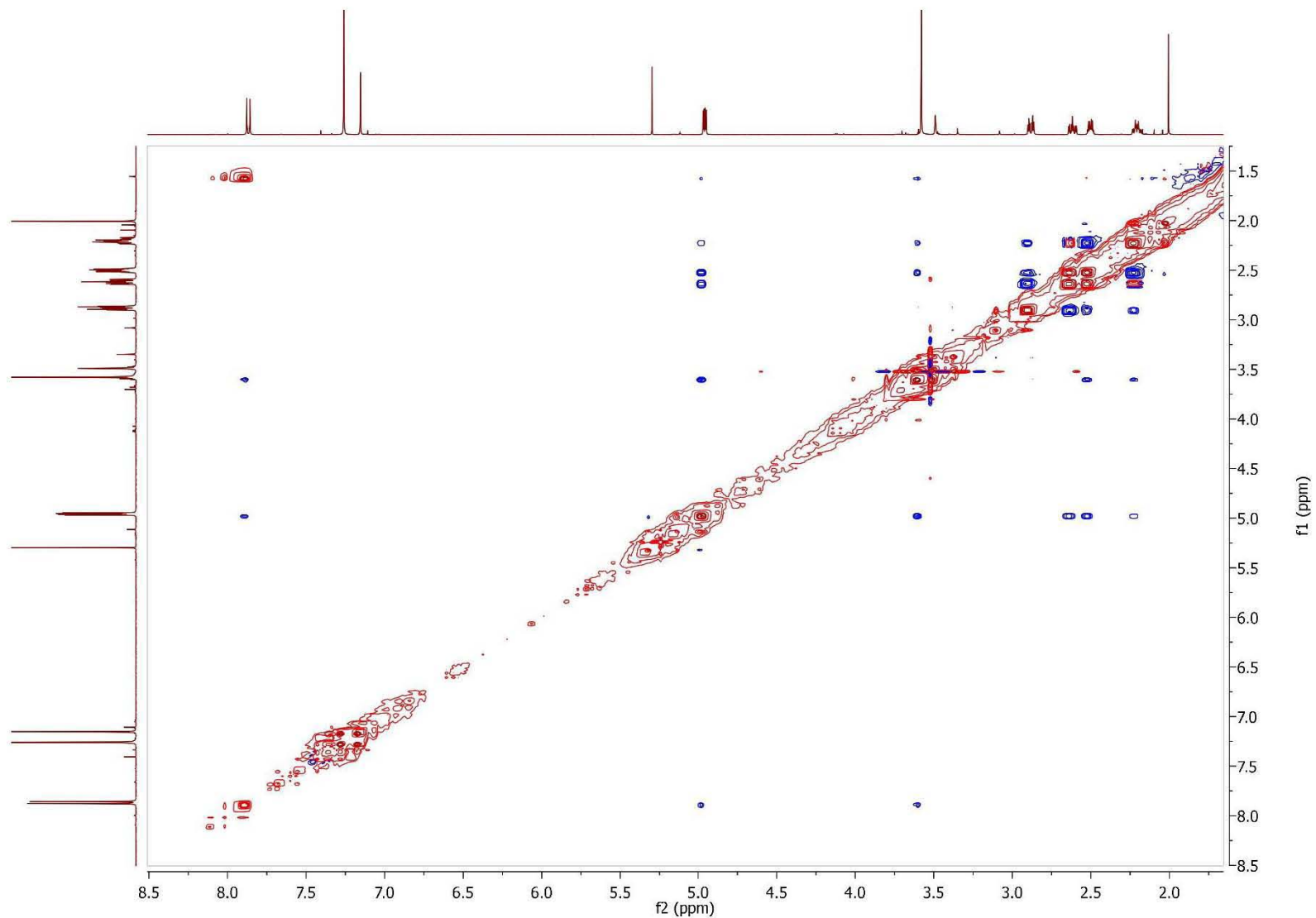


Figura A55. Espectro NOESY de 127 en CDCl<sub>3</sub>.

**INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM**  
**LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Data:1324 MR15-Ma-T22

Sample Name:Dra Macias Martha / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5];Correct Base[5.0%];Average(MS[...

Acquired:8/15/2019 3:11:10 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:8/26/2019 3:13:09 PM

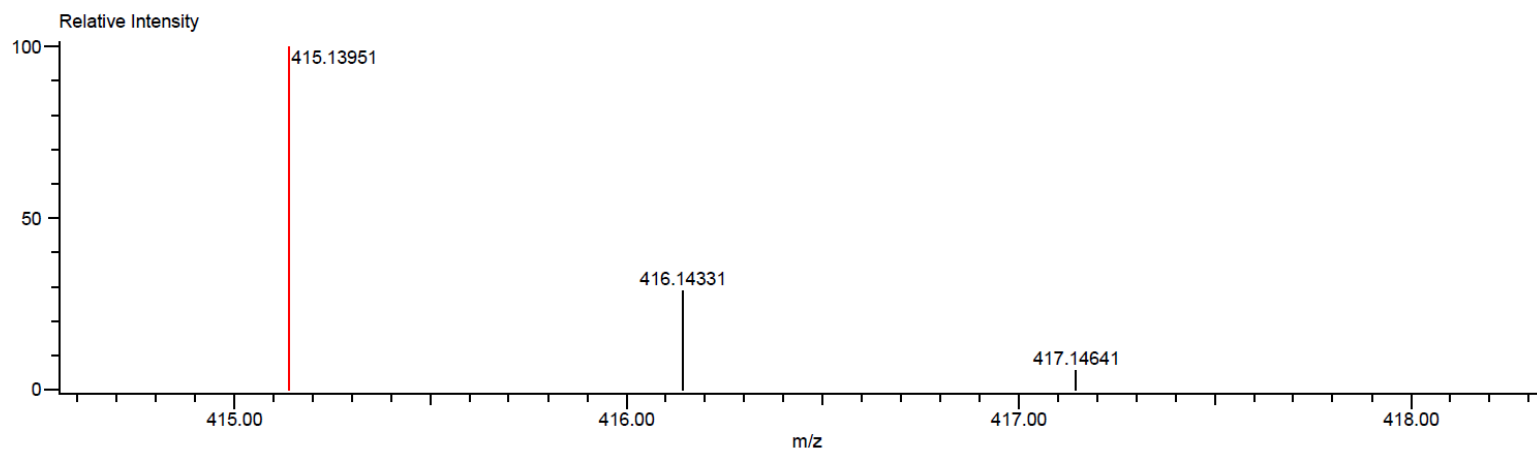
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 40.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 30, <sup>1</sup>H:0 .. 60, <sup>16</sup>O:0 .. 8



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
415.13951	622015.54	415.13929	0.22	0.52	<sup>12</sup> C <sub>22</sub> <sup>1</sup> H <sub>23</sub> <sup>16</sup> O <sub>8</sub>	11.5

**Figura A56. Espectro de HRESIMS de 127.**

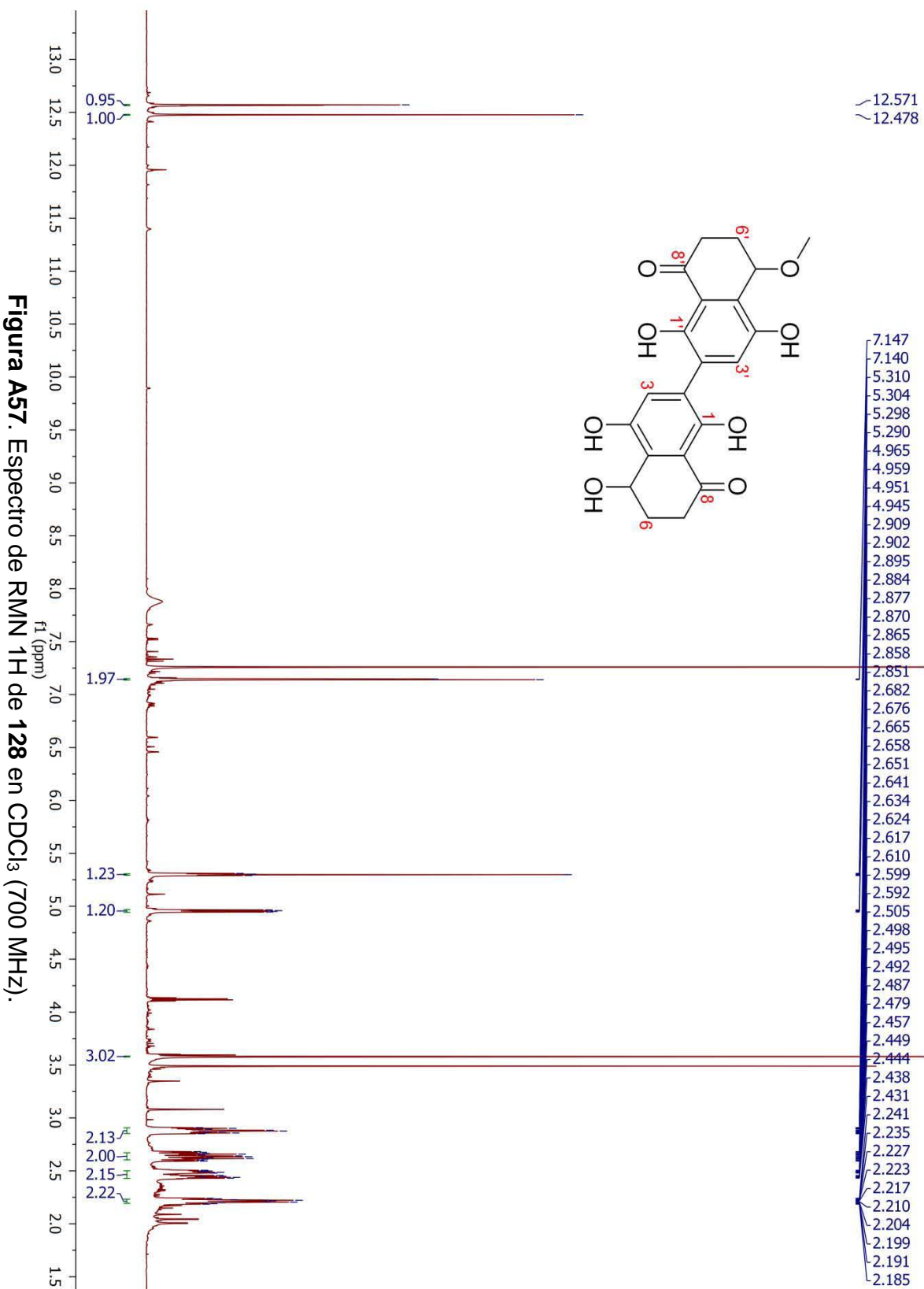
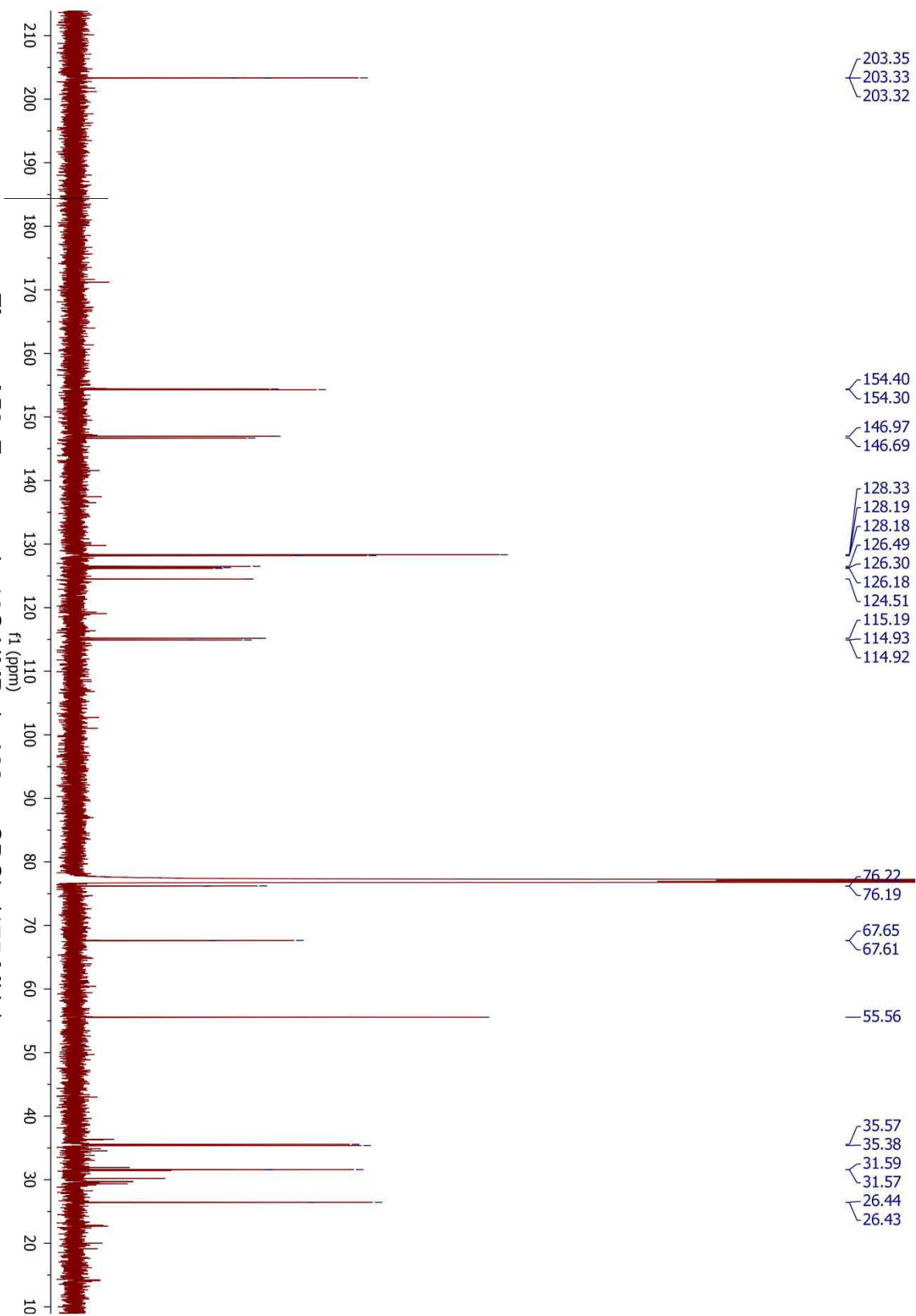


Figura A57. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 128 en  $\text{CDCl}_3$  (700 MHz).





**Figura A58.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de **128** en  $\text{CDCl}_3$  (175 MHz).

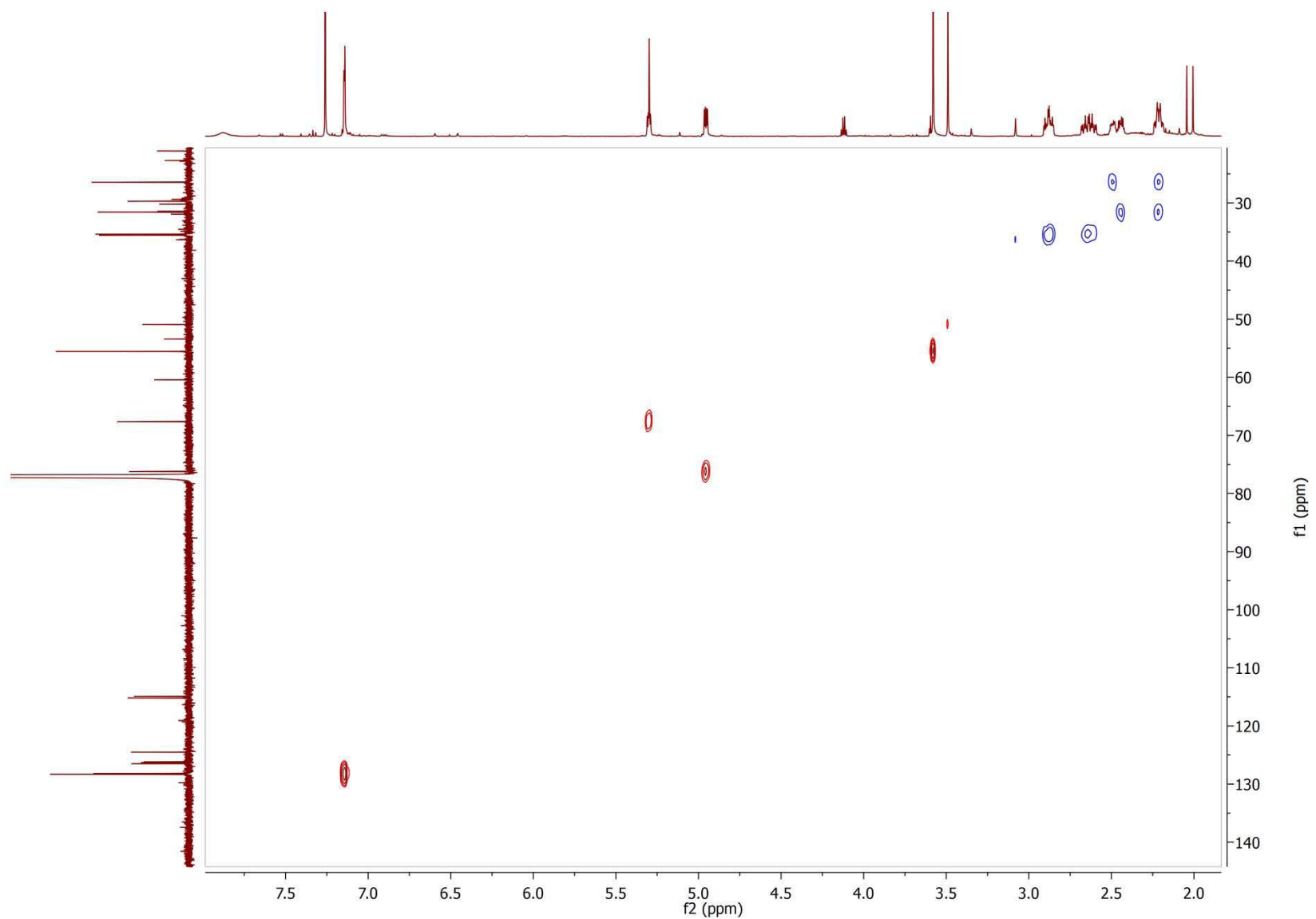


Figura A59. Espectro HSQC de **128** en CDCl<sub>3</sub>.

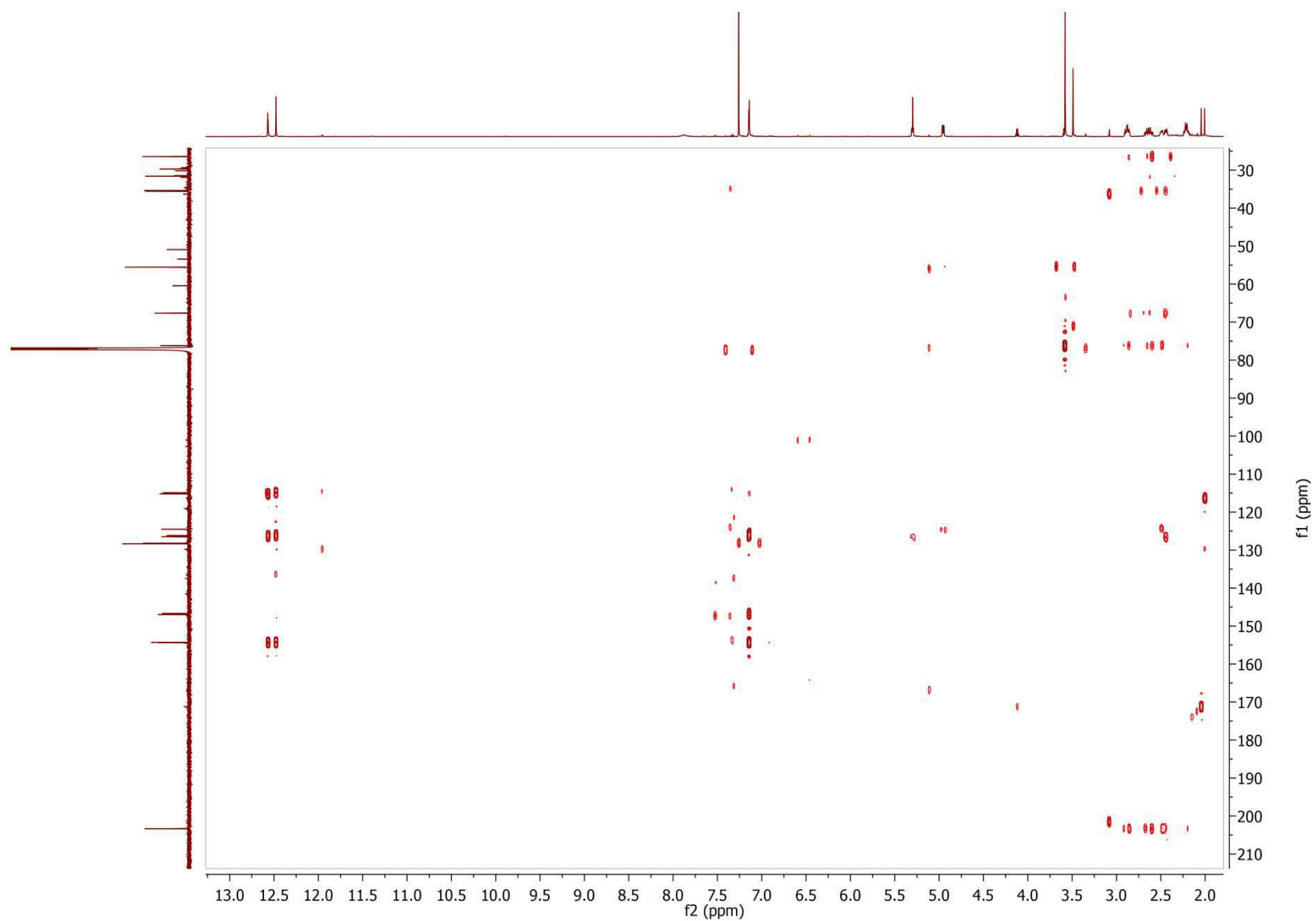


Figura A60. Espectro HMBC de 128 en CDCl<sub>3</sub>.

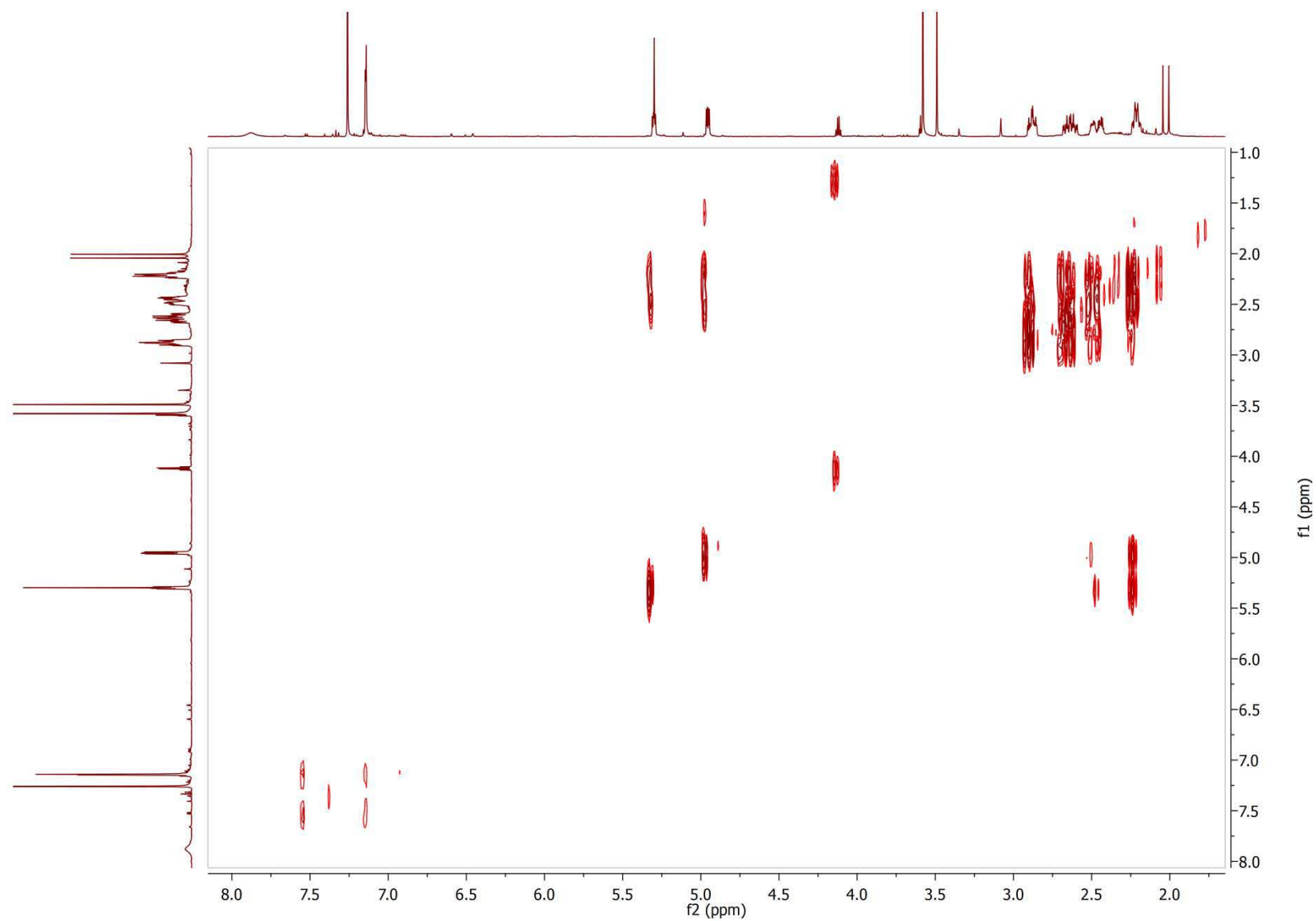


Figura A61. Espectro COSY de **128** en  $\text{CDCl}_3$ .

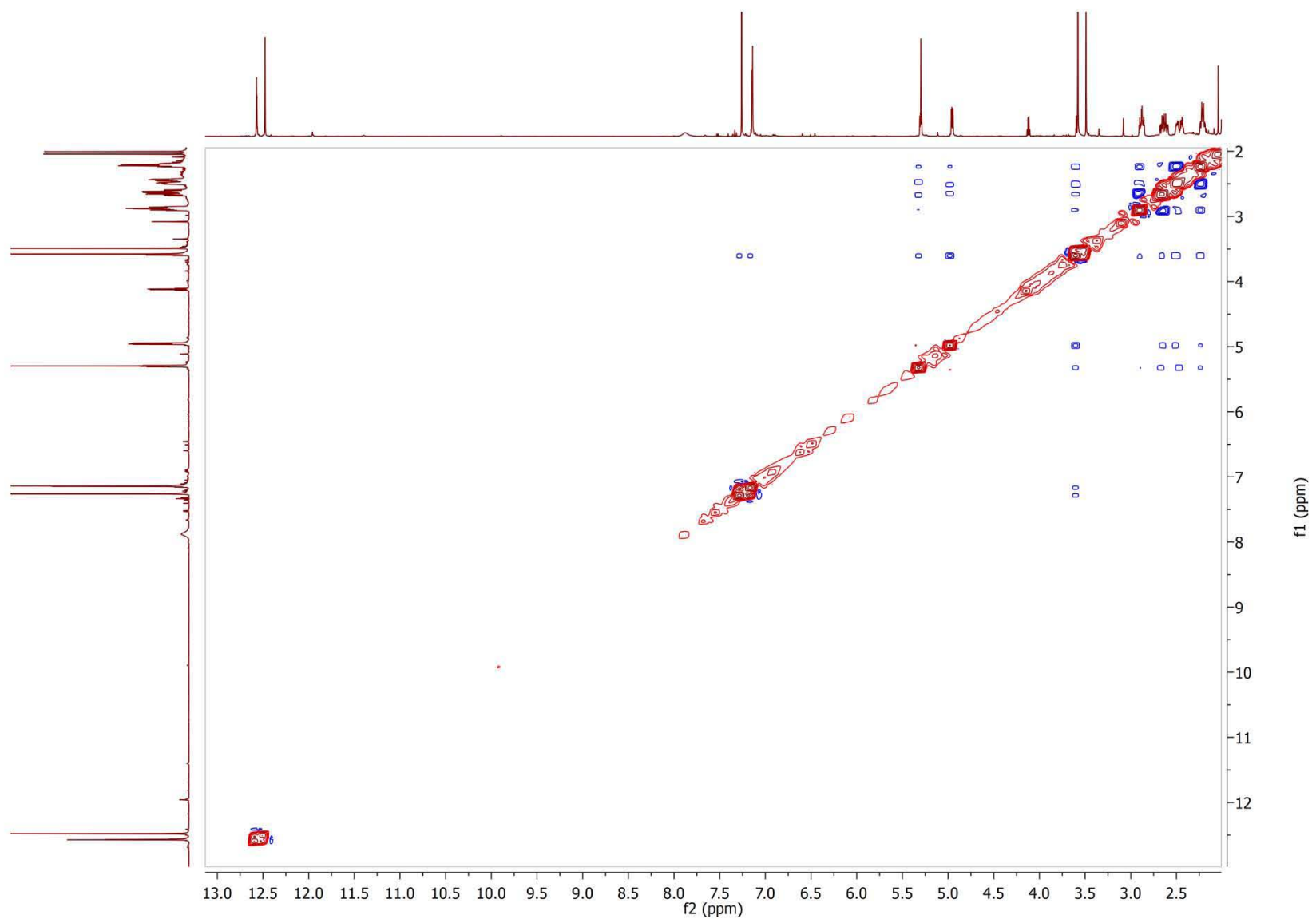


Figura A62. Espectro NOESY de 128 en  $\text{CDCl}_3$ .

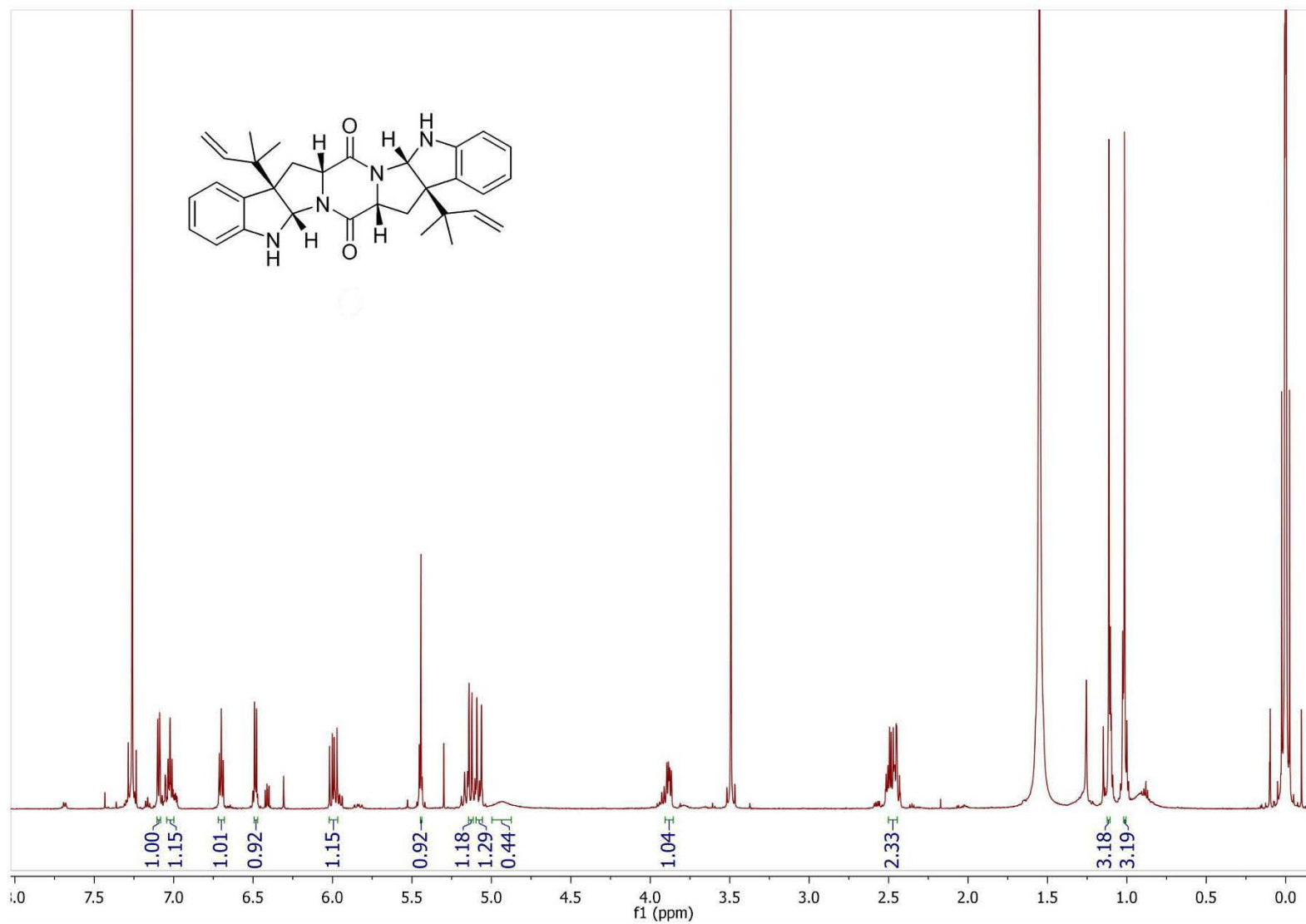


Figura A63. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **72** en CD<sub>3</sub>OD (700 MHz).

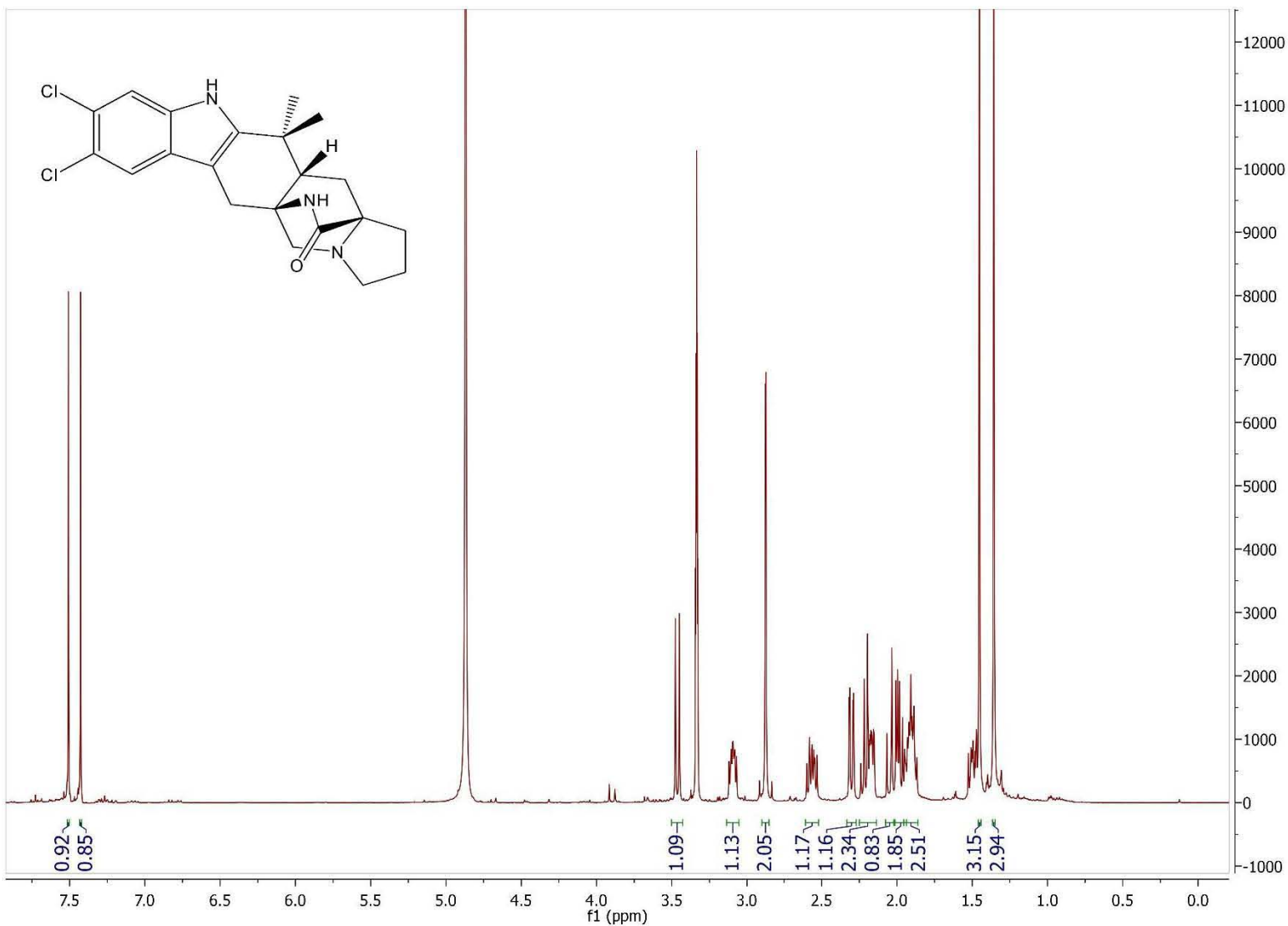


Figura A64. Espectro de RMN 1H de **89** en CD<sub>3</sub>OD (700 MHz).

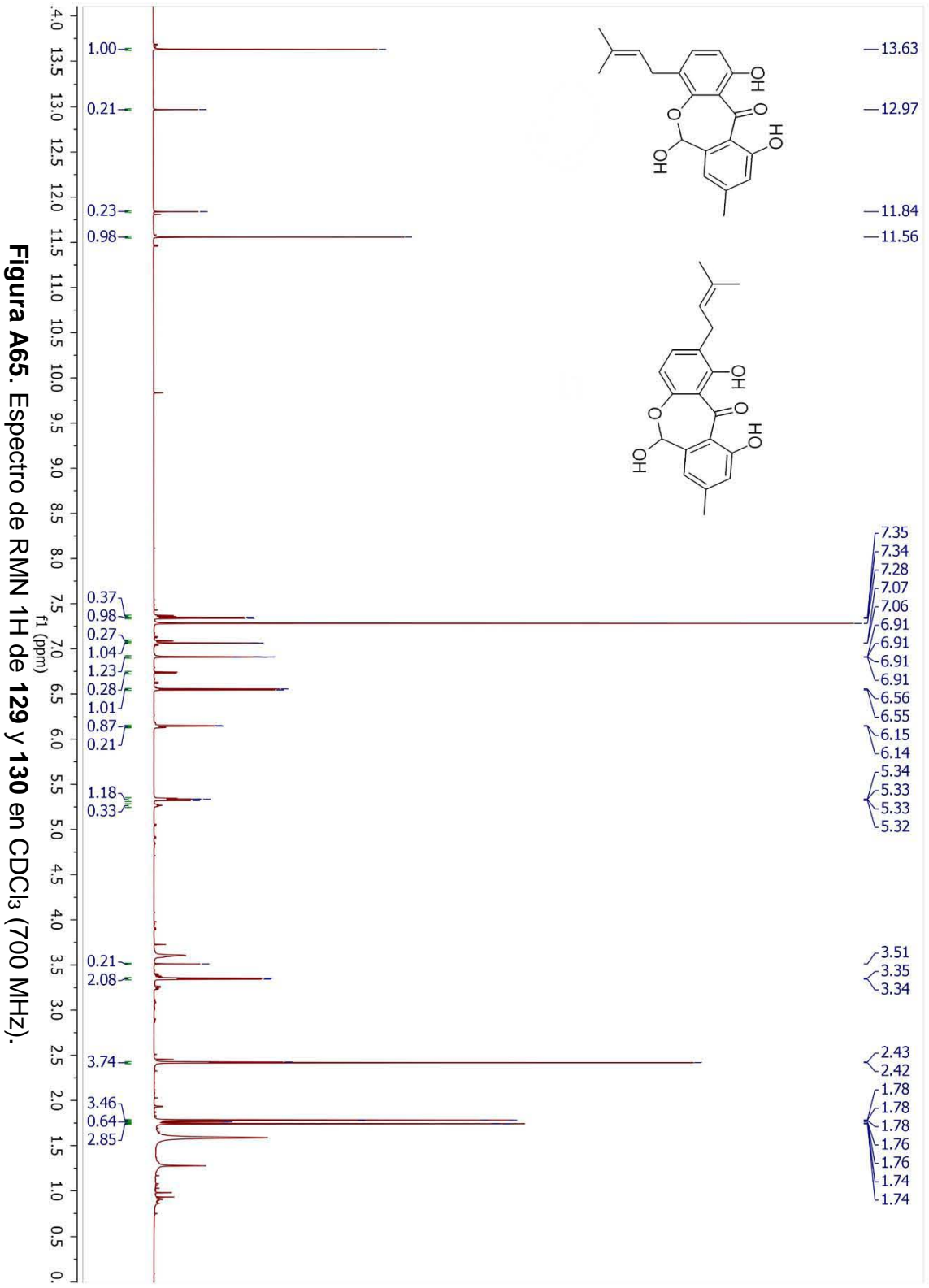
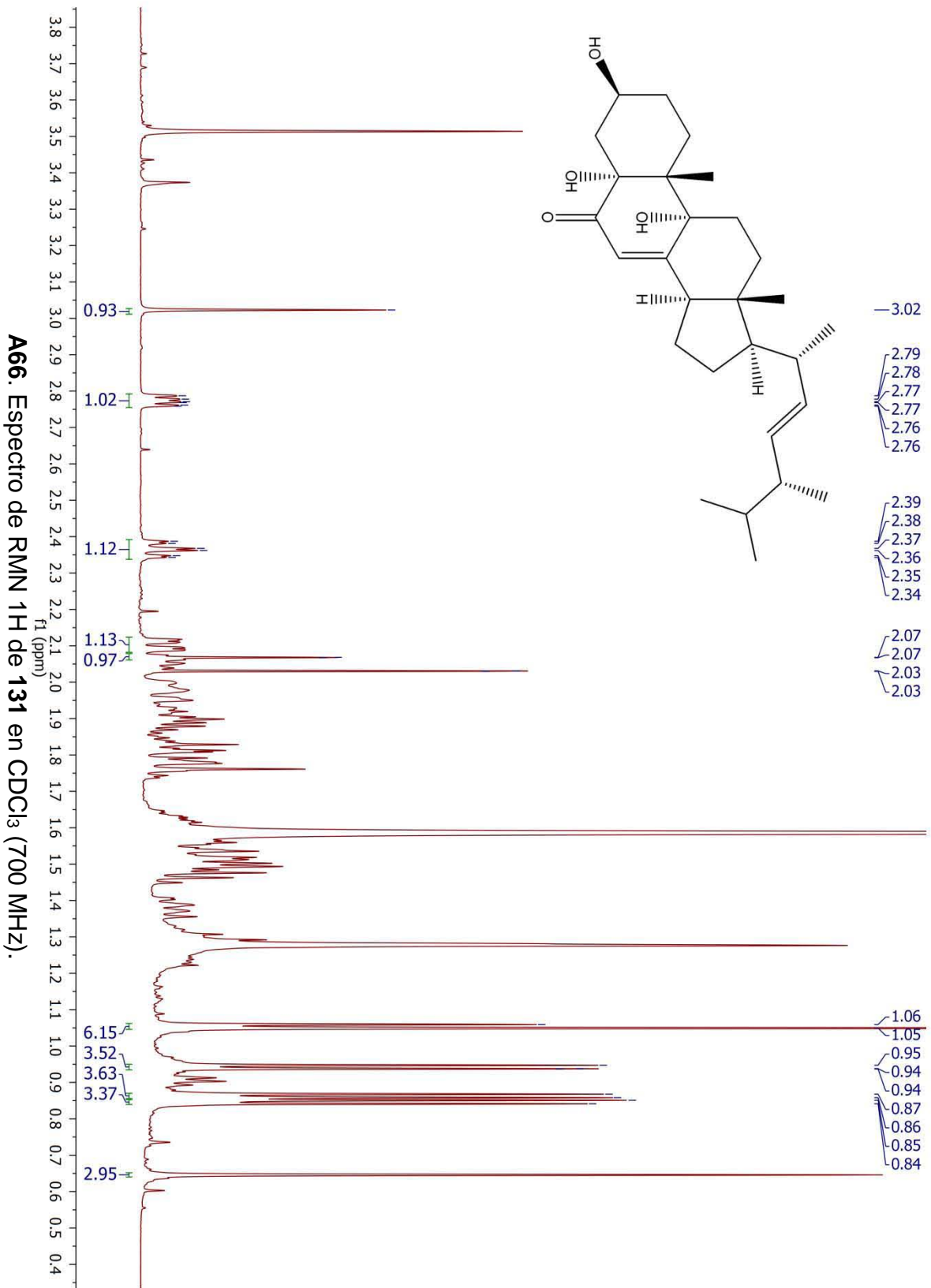
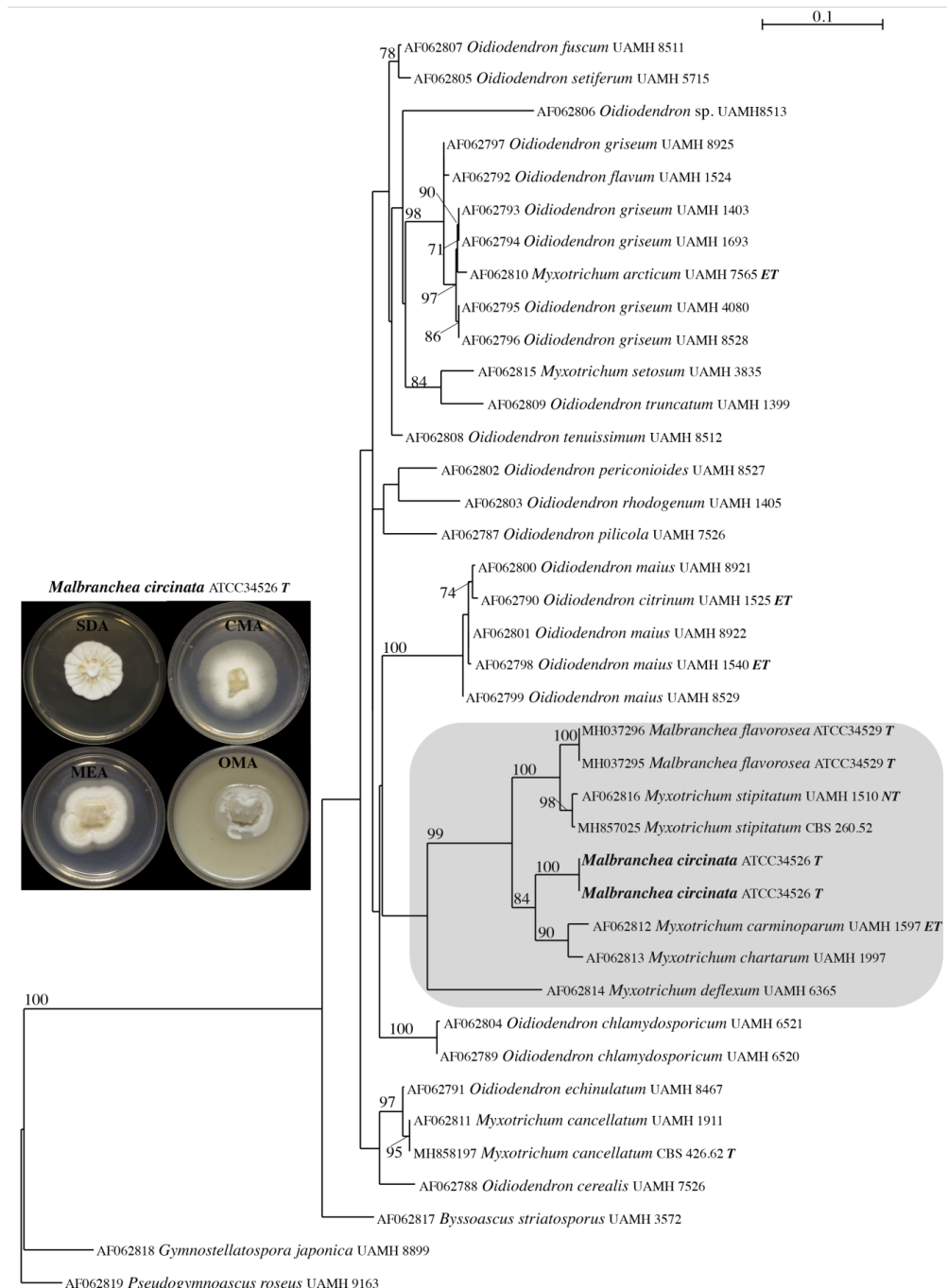


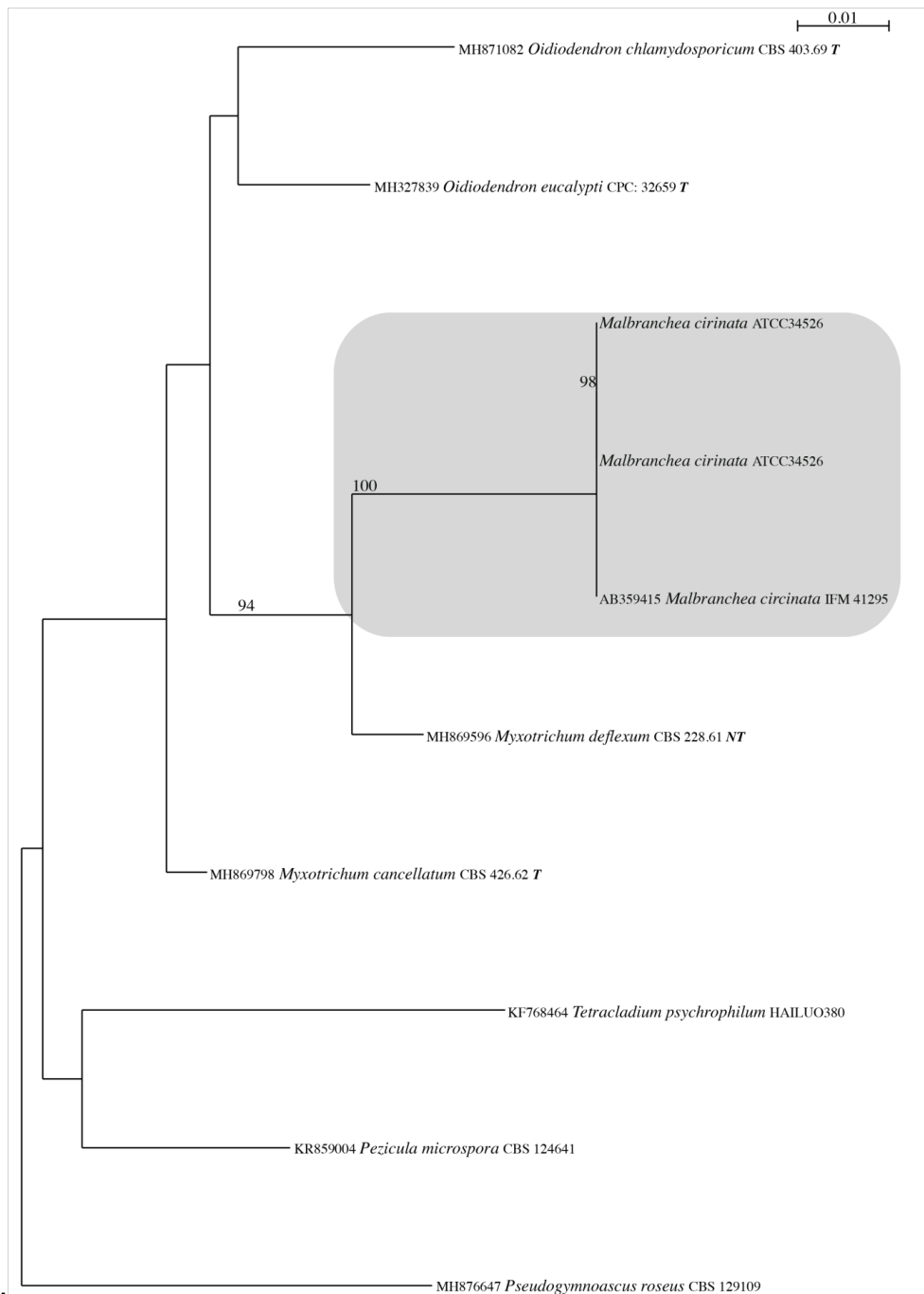
Figura A65. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 129 y 130 en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).







**Figura S67.** Filograma del árbol mas parecido ( $-\ln L = 2909.24$ ) del análisis RAxML de 39 cadenas de la región ITS (519 pb). Los números se refieren a valores de soporte de arranque RAxML  $\geq 70\%$  basados en 1000 réplicas. *Malbranchea circinata* (ATCC: 34526) está filogenéticamente relacionada con *Myxotrichum* spp. (Leotiomycetes incertae sedis, Myxotrichaceae, Ascomycota). Cultivos de 14 días de edad con agar dextrosa Sabouraud; Difco, agar de harina de maíz; Difco, agar extracto de malta; Difco agar de avena. Los símbolos "T, ET y NT" denotan taxones reportados como especímenes tipo, ex-tipo o neo-tipo. La barra indica sustituciones de nucleótidos por sitio



**Figura S68.** Filograma del árbol más probable ( $-\ln L = 2091.26$  10) de un análisis RAxML de 10 cepas del 28SrDNA parcial; Región LSU (871 pb). Los números se refieren a valores de soporte de arranque RAxML  $\geq 70\%$  basados en 1000 réplicas. *Malbranchea circinata* (ATCC: 34526) es idéntica a *M. circinata*, IFM4126 (AB35914) y hermana de *Myxotrichum deflexum*, CBS 228.61 (MH869596) (Leotiomyces incertae sedis, Myxotrichaceae, Ascomycota). La barra indica sustituciones de nucleótidos por sitio.

**Tabla A1.** Optimización geométrica y cálculo de los desplazamientos químicos utilizando DFT B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+g(d,p) para **120**.

Confórmero	Energía (Hartrees)	Energía <sup>a</sup> (kcal/mol)	Fracción molar (kcal/mol)
01	-1197.399152	-751379.4725277	0.5
02	-1197.399152	-751379.4725277	0.5

**Tabla A2.** Optimización geométrica y cálculos de los desplazamientos químicos utilizando DFT B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+g(d,p) para **121**.

Confórmero	Energía (Hartrees)	Energía <sup>a</sup> (kcal/mol)	Fracción molar (kcal/mol)
01	-1122.196562	-704189.1247539	0.5
02	-1122.196562	-704189.1247539	0.5

**Tabla S4.** Tensores y cálculos los desplazamientos químicos utilizando DFT B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+g(d,p) como nivel de teoría para el compuesto **120**.

Constantes Isotrópicas ( $\sigma$ )		Desplazamientos químicos calculados ( $\delta$ ) <sup>a</sup>				
$\sigma_{01}$	$\sigma_{02}$	$\delta_{01}$	$\delta_{02}$	$\delta_{\text{calc}}^c$	$\delta_{\text{exp}}$	$ \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}} $
23.62280	23.62280	7.73187	7.73187	7.73	7.80	0.06813 4
48.79160	48.79150	125.87873	125.87883	125.8 8	126.8 3	0.95122 2
49.83340	49.83340	124.88861	124.88861	124.8 9	126.5 7	1.68138 6
40.38080	40.38070	133.87227	133.87236	133.8 7	134.9 9	1.11768 5
28.04060	28.04070	145.60027	145.60017	145.6 0	147.2 8	1.67978 1
57.34800	57.34790	117.74682	117.74691	117.7 5	120.5 0	2.75313 6
48.84660	48.84680	125.82646	125.82627	125.8 3	127.5 7	1.74363 6
23.47280	23.47280	7.87118	7.87118	7.87	7.93	0.05882
23.78200	23.78200	7.58401	7.58401	7.58	7.63	0.04599 3
22.99660	22.99660	8.31346	8.31346	8.31	8.31	0.00345 8
14.08900	14.08900	158.85972	158.85972	158.8 6	160.9 8	2.12027 8
20.82360	20.82380	152.45923	152.45904	152.4 6	154.4	1.94086 7
40.02430	40.02450	134.21108	134.21089	134.2 1	136.3 5	2.13901 3
45.60510	45.60520	128.90715	128.90705	128.9 1	131.1 6	2.25290 1
39.21420	39.21420	134.98099	134.98099	134.9 8	133.0 9	1.89099 2
48.10590	48.10600	126.53041	126.53032	126.5 3	128.5 5	2.01963 5
48.78080	48.78090	125.88899	125.88890	125.8 9	127.6 5	1.76105 3
50.59060	50.59060	124.16898	124.16898	124.1 7	126.1 3	1.96102 1
23.97530	23.97530	7.40448	7.40448	7.40	7.63	0.22552 3
24.12950	24.12950	7.26126	7.26126	7.26	7.4	0.13873 9

24.25530	24.25530	7.14442	7.14442	7.14	7.18	0.03557 7
24.02100	24.02100	7.36203	7.36203	7.36	7.47	0.10796 8
51.28300	51.28430	123.51093	123.50969	123.5 1	121.7 5	1.76031 2
45.05390	45.05390	129.43100	129.43100	129.4 3	130.9 5	1.51899 8
40.91020	40.91000	133.36913	133.36932	133.3 7	134.2 2	0.85077 4
23.65700	23.65700	149.76639	149.76639	149.7 7	152.6 5	2.88360 6
55.17180	55.17270	119.81505	119.81420	119.8 1	117.7 8	2.03462 6
56.15490	56.15550	118.88073	118.88016	118.8 8	116.9 1	1.97044 1
24.35120	24.35120	7.05535	7.05535	7.06	6.92	0.13535 4
24.43990	24.44000	6.97297	6.97288	6.97	6.9	0.07292 7
24.09070	24.09070	7.29730	7.29730	7.30	7.29	0.00729 7
4.69260	4.69250	167.78996	167.79006	167.7 9	170.7 9	2.99998 9

MAE 1.28

<sup>1</sup>H-MAE 0.08

<sup>13</sup>C-MAE 1.91

$$\text{MAE} = |\Delta\delta_{\text{ave}}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{\text{comp}} - \delta_i^{\text{exp}}|$$

<sup>a</sup>Los desplazamientos químicos teóricos se obtuvieron de la aplicación de los factores de escalamiento (pendiente = -1.0767, intercepto = 31.9477) para los tensores de <sup>1</sup>H NMR y los factores de escalamiento (pendiente = -1.0522, intercepto = 181.2412) para los tensores de <sup>13</sup>C NMR calculados con el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).

**Tabla S4** Tensores y cálculos los desplazamientos químicos utilizando DFT B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+g(d,p) como nivel de teoría para el compuesto **121**.

Constantes Isotrópicas ( $\sigma$ )		Desplazamientos químicos calculados ( $\delta$ ) <sup>a</sup>				
$\sigma_{01}$	$\sigma_{02}$	$\delta_{01}$	$\delta_{02}$	$\delta_{\text{calc}}^c$	$\delta_{\text{exp}}$	$ \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}} $
23.6296	23.6297	7.7256	7.7255	7.73	7.81	0.08449 6
48.9712	48.971	125.7080	125.7082	125.7 1	126.9 3	1.22186 5
50.2253	50.2251	124.5162	124.5163	124.5 2	126.5 5	2.03374 8
41.0602	41.0601	133.2266	133.2267	133.2 3	135.1 9	1.96338
27.8463	27.8464	145.7849	145.7848	145.7 8	147.1 7	1.38512 1
56.1963	56.1965	118.8414	118.8412	118.8 4	120.6 1	1.76871 5
49.4423	49.4423	125.2603	125.2603	125.2 6	127.6 8	2.41968 8
23.5198	23.5198	7.8275	7.8275	7.83	7.95	0.12247 1
23.8333	23.8333	7.5364	7.5364	7.54	7.67	0.13363 9
23.1176	23.1176	8.2011	8.2011	8.20	8.32	0.11892 3
12.6682	12.6681	160.2100	160.2101	160.2 1	161.6 1	1.39991 6
20.5163	20.5163	152.7513	152.7513	152.7 5	153.7	0.94871 7
39.8879	39.888	134.3407	134.3406	134.3 4	133.7 8	0.56066 7
45.8131	45.8131	128.7095	128.7095	128.7 1	131.0 6	2.35053 4
38.685	38.6849	135.4839	135.4840	135.4 8	136.3 1	0.82601 4
47.5814	47.5812	127.0289	127.0291	127.0 3	128.9 4	1.91101 3
48.9959	48.9959	125.6846	125.6846	125.6 8	127.7 3	2.04543 4
50.223	50.2228	124.5183	124.5185	124.5 2	126.1 3	1.61196 2
23.8866	23.8866	7.4869	7.4869	7.49	7.6	0.11314 2
24.0954	24.0954	7.2929	7.2929	7.29	7.39	0.09706

24.3	24.3	7.1029	7.1029	7.10	7.2	0.09709 8 3
24.0265	24.0265	7.3569	7.3569	7.36	7.47	0.11307 6
39.8252	39.8249	134.4003	134.4006	134.4 0	134.0 6	0.34044 7
46.3587	46.3587	128.1909	128.1909	128.1 9	129.5 8	1.38906 7
41.8562	41.8564	132.4701	132.4699	132.4 7	133.7 1	1.24003 2
47.5072	47.5072	127.0994	127.0994	127.1 0	128.1 8	1.08058 9
45.3813	45.3813	129.1198	129.1198	129.1 2	130.7 9	1.67015 6
48.4202	48.4204	126.2317	126.2315	126.2 3	127.3 1	1.07839
23.9845	23.9845	7.3959	7.3959	7.40	7.5	0.10406 8
23.9135	23.9135	7.4619	7.4619	7.46	7.5	0.03812 6
23.9907	23.9906	7.3902	7.3903	7.39	7.5	0.10978
3.9896	3.9895	168.4581	168.4582	168.4 6	170.4 5	1.99186 5
24.2389	24.2389	7.1597	7.1597	7.16	7.33	0.17034 6

MAE 0.99  
<sup>1</sup>H-MAE 0.11  
<sup>13</sup>C-MAE 1.49

$$MAE = |\Delta\delta_{ave}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{comp} - \delta_i^{exp}|$$

<sup>a</sup>Los desplazamientos químicos teóricos se obtuvieron de la aplicación de los factores de escalamiento (pendiente = -1.0767, intercepto = 31.9477) para los tensores de <sup>1</sup>H NMR y los factores de escalamiento (pendiente = -1.0522, intercepto = 181.2412) para los tensores de <sup>13</sup>C NMR calculados con el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).



## Detalles experimentales adicionales

**Identificación molecular de la cepa fúngica.** La extracción de ADN y PCR se realizó por duplicado para cada región. Los datos de secuencia se buscaron en BLAST en NCBI GenBank para verificar la identidad y la homología de secuencia con otras secuencias similares en la base de datos pública. Basado en una búsqueda BLAST en la base de datos de nucleótidos GenBank de NCBI, los resultados más cercanos se encontraron en la base de datos ITS y la de LSU fueron miembros de *Oidiodendron robak* y *Myxotrichum kunze* en Myxotrichaceae. Para dilucidar la colocación filogenética de la cepa ATCC 34526, se obtuvieron las mejores coincidencias de secuencias ITS y LSU de GenBank y se emplearon análisis filogenéticos separados. La filogenia de máxima verosimilitud basada en la región ITS mostró que la cepa ATCC 34526, *M. circinata* estaba relacionada filogenéticamente con *Myxotrichum* spp.<sup>1</sup> (Figura S67). *Malbranchea circinata* formó un clado fuertemente soportado ( $\geq 84\%$  de soporte de arranque) con *Myx. carminoparum* y *Myx. chartarum* (Figura S76) junto con *M. flavorosea* (ATCC 34529) y *Myx. stipitatum* ( $\geq 99\%$  de soporte de arranque). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la *M. circinata* asexual está relacionada filogenéticamente con el género teleomorfo *Myxotrichum*.<sup>1-3</sup> Curiosamente, se afirma en la literatura que *Myx. carminoparum* y *Myx. chartarum* corresponden a un estado asexual de *Malbranchea*.<sup>1</sup> El análisis de máxima verosimilitud con una región LSU parcial también mostró un resultado similar (Figura S68); *M. circinata* formó un clado fuertemente apoyado con una cepa secuenciada previamente de *M. circinata* (IFM 41295; AB359415)<sup>4</sup> y *Myx. deflexo* (CBS 228.61; MH869596).

Aunque, existe una secuencia ITS de *M. circinata* (CBS 129.77) depositada en el GenBank, nuestra cepa de *M. circinata* (ATCC 34526) mostró  $\leq 40\%$  de similitud de secuencia con ella. En cambio, otra cepa *Malbranchea aurantiaca* Sigler et Carmichael ATCC 34524 fue 100 % similar a la región ITS de la cepa CBS 129.77 (datos no publicados). Los resultados de la secuenciación y los análisis filogenéticos realizados en este documento sugieren que *M. circinata* (ATCC 34526) está afiliada a Myxotrichaceae, Leotiomycetes incertae sedis; Ascomycota.

Según nuestro análisis de secuenciación preliminar y la literatura, parece que el género asexual *Malbranchea* es polifilético y muestra afiliaciones filogenéticas tanto a Onygenaceae (Eurotiomycetes)<sup>5-6</sup> como a Myxotrichaceae (Leotiomycetes, incertae sedis).<sup>2</sup>

### Referencias de apoyo

- (1) Hambleton, S., Egger, K. N., Currah, R. S. *Mycologia*. **1998**, *90*, 854–868.
- (2) Rebollar-Ramos, D., Macías-Ruvalcaba, M. L., Figueroa, M., Raja, H. A., González-Andrade, M., Mata, R. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2018**, *71*, 862–871.
- (3) L.; Carmichael, J. W. *Mycotaxon*. **1976**, *4*, 349–488.
- (4) Okada, K., Takizawa, K., Maebayashi, Y., Nishimura, K., Miyaji, M., Fukushima, K. *Mycoscience*. **1995**, *36*, 385–389.
- (5) Sigler, L., Hambleton, S., Flis, A. L., Paré, J. A. *J. Stud. Mycol.* **2002**, 111–122.
- (6) Sarrocco, S., Diquattro, S., Baroncelli, R., Cimmino, A., Evidente, A., Vannacci, G., Doveri, F. *Mycol. Prog.* **2015**, *14*, 112.

## **ANEXO 3**

### **Estudios de acoplamiento molecular con las $\alpha$ -glucosidasas de humano**

#### **Enzimas $\alpha$ -glucosidasas humanas**

En los humanos, la digestión de los almidones y azúcares se lleva a cabo mediante la acción de las amilasas ( $\alpha$ -amilasas salival y pancreática), las cuales son enzimas de tipo endoglicosidasa que hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos y se encargan de degradar el almidón a maltosa, maltotriosa y oligosacáridos; y las glucosidasas intestinales (trehalasa, lactasa, maltasa-glucoamilasa y sacarasa-isomaltasa), las cuales liberan monómeros de glucosa como producto final de la reacción. Las más relevantes son la maltasa-glucoamilasa (MGAM) y la sacarasa-isomaltasa (SI), las cuales son las encargadas de metabolizar los subproductos derivados de la digestión del almidón. Estas enzimas están compuestas por dominios catalíticos duplicados: el dominio *N*-terminal que se encuentra unido a la membrana del enterocito (*nt*-MGAM y *nt*-SI) y el dominio luminal *C*-terminal (*ct*-MGAM y *ct*-SI). Los cuatro dominios exhiben actividad de exoglicosidasa frente a los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos pero presentan diferentes especificidades en cuanto al tamaño de sus sustratos; los dominios *C*-terminales prefieren cadenas más grandes (mayores a cuatro unidades de glucosa). Las subunidades *nt*- y *ct*-SI, hidrolizan adicionalmente los enlaces  $\alpha$ -1,6- y  $\alpha$ -1,2-glicosídicos, respectivamente y aril- $\alpha$ -glucopiránosidos. La SI se encarga de hidrolizar aproximadamente el 80 % de la maltosa. Las subunidades *nt*- y *ct*-MGAM, hidrolizan aproximadamente el 20 % restante de la maltosa, presentan muy poca actividad isomaltasa pero exhiben toda actividad glucoamilasa (Ren et al., 2011; Sim et al., 2010; Sim et al., 2008; Van Beers et al., 1995).

Con base en lo mencionado anteriormente, estas enzimas son un blanco ideal para el desarrollo de inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas como tratamiento para la diabetes mellitus tipo 2.

## Estudios de Acoplamiento Molecular

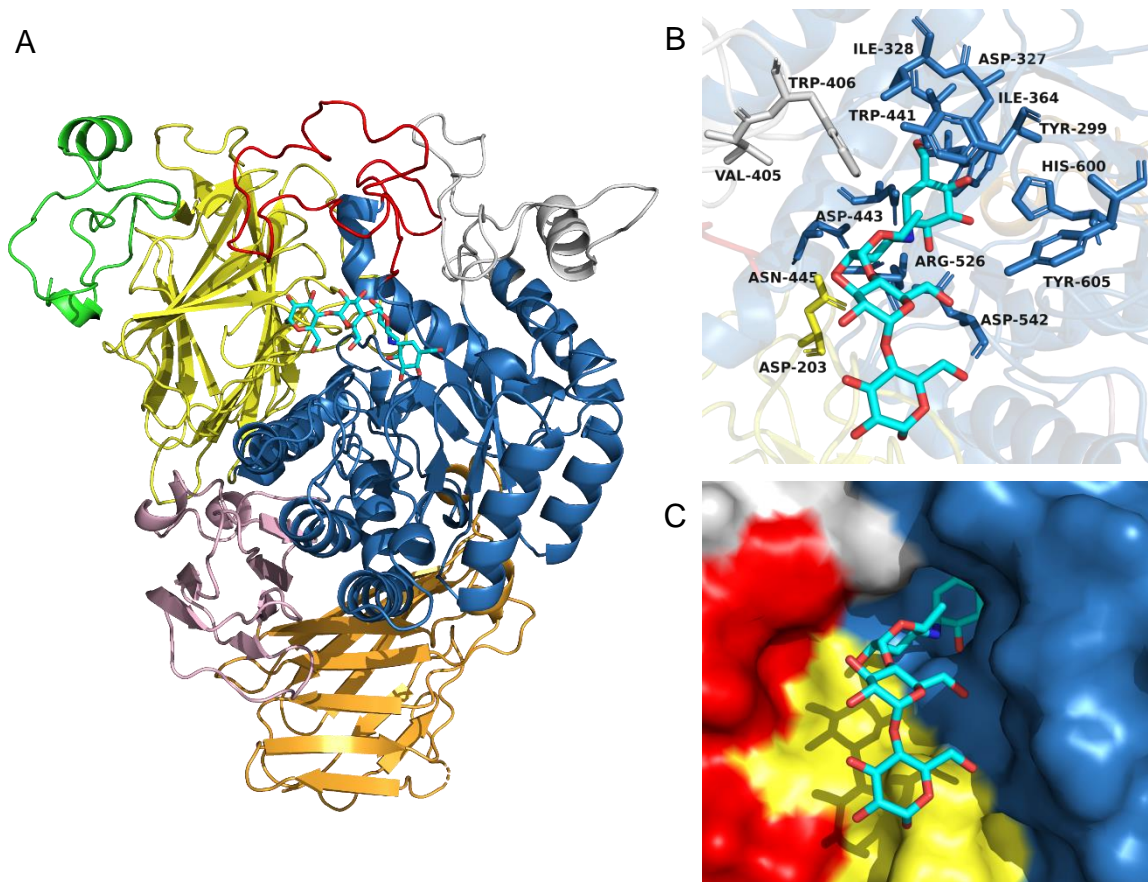
Para complementar los resultados obtenidos de las evaluaciones enzimáticas y los estudios de acoplamiento molecular con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*, se determinó el posible modo de unión de los compuestos **118** y **119** de *P. minimoides* y los compuestos **72**, **89** y **120** de *M. circinata* con las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de humano. Los estudios de acoplamiento molecular se llevaron a cabo empleando la estructura obtenida por rayos X de del dominio *N*-terminal de la sacarasa-isolmatasa humana (*nt*-SI: código PDB 3LPP) y los dominios *N*- y *C*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (*nt*-MGAM: PDB 2QMJ y *ct*-MGAM: PDB 3TOP, respectivamente).

### Dominio *N*-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (*nt*-MGAM: 2QMJ)

La *nt*-MGAM, consta de cinco subdominios: un dominio trébol tipo P (residuos 1–51); un dominio *N*-terminal (residuos 52–269); un dominio catalítico, que está formado por un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (residuos 270–651) y dos insertos, el asa-1 (residuos 367–419) y el asa-2 (residuos 447–492); un dominio *C*-terminal proximal (residuos 652–730) y un dominio *C*-terminal distal (residuos 731–868; **Figura B1**).

Los residuos catalíticos son el Asp443, el cual actúa como nucleófilo y la Asp542. El sitio catalítico está formado por los residuos Tyr299, Asp327, Ile328, Ile364, Trp441, Met444, Arg526 e His600 (Sim et al., 2008).

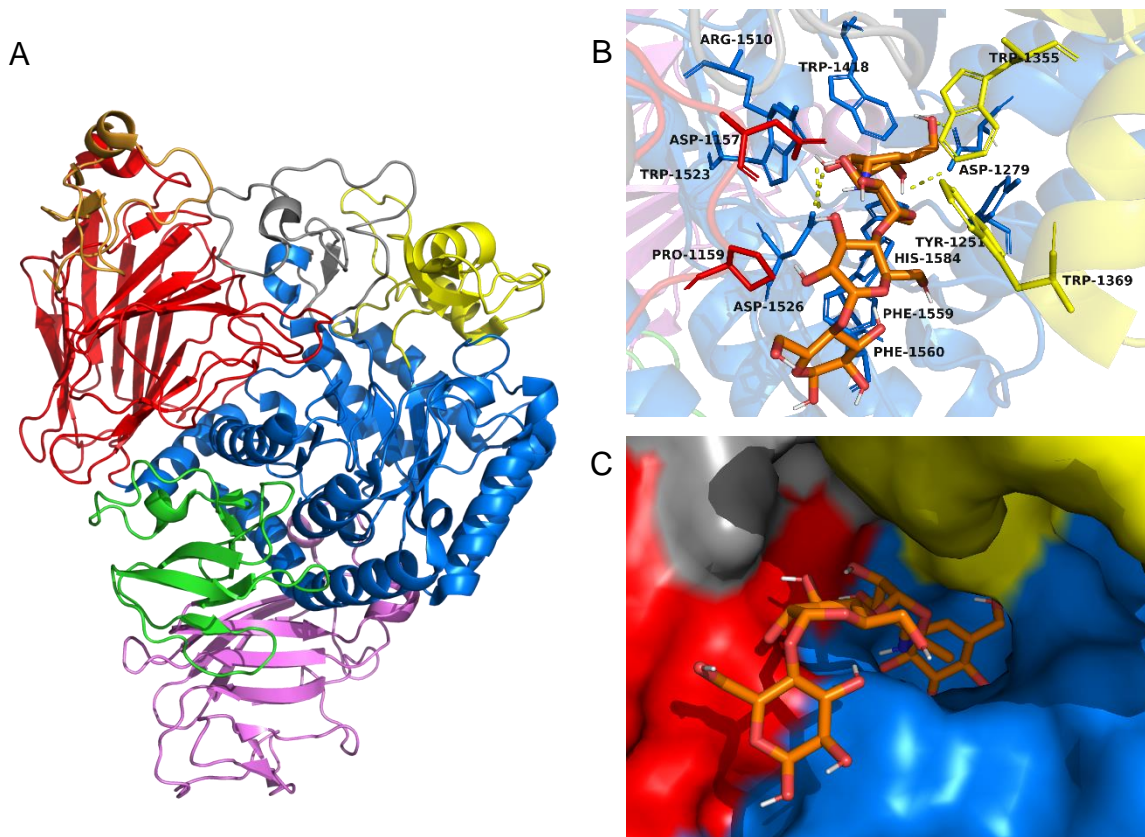
Como se puede ver en la **Figura B1**, en asa-1 se observa un hélice pequeña, la cual le proporciona mayor especificidad a este dominio a oligosacáridos de menor tamaño, pudiendo de esta forma estabilizar cadenas de menor tamaño en comparación con el dominio *ct*-MGAM.



**Figura B1.** A) Representación de los subdominios de la *nt*-MGAM: dominio trébol tipo P (verde); un dominio N-terminal (amarillo); dominio catalítico, barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (azul), el asa-1 (gris) y el asa-2 (rojo); dominio C-terminal proximal (rosa) y el dominio C-terminal distal (anaranjado); acarbosa (cian). B) Residuos presentes en el sitio catalítico y la acarbosa cocrystalizada en la enzima (cian). C)

### **Dominio C-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (*ct*-MGAM: 3TOP)**

El dominio *ct*-MGAM, consta de cinco subdominios: un dominio trébol tipo P (residuos 955–1001); un dominio N-terminal (residuos 1002–1220); un dominio catalítico, que está formado por un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (residuos 1221–1632) y dos insertos, el asa-1 (residuos 1317–1386) y el asa-2 (residuos 1424–1477); un dominio C-terminal proximal (residuos 1633–1711) y un dominio C-terminal distal (residuos 1712–1857; **Figura B2**). Los residuos catalíticos son el Asp1279, el cual actúa como nucleófilo y la Asp1526. El sitio catalítico está formado por los residuos His1584, Try1251, Trp1523, Trp1428, Asp1157, Arg1510, Trp1355, Phe1559, Trp1369 y Phe1560 (Ren et al., 2011).

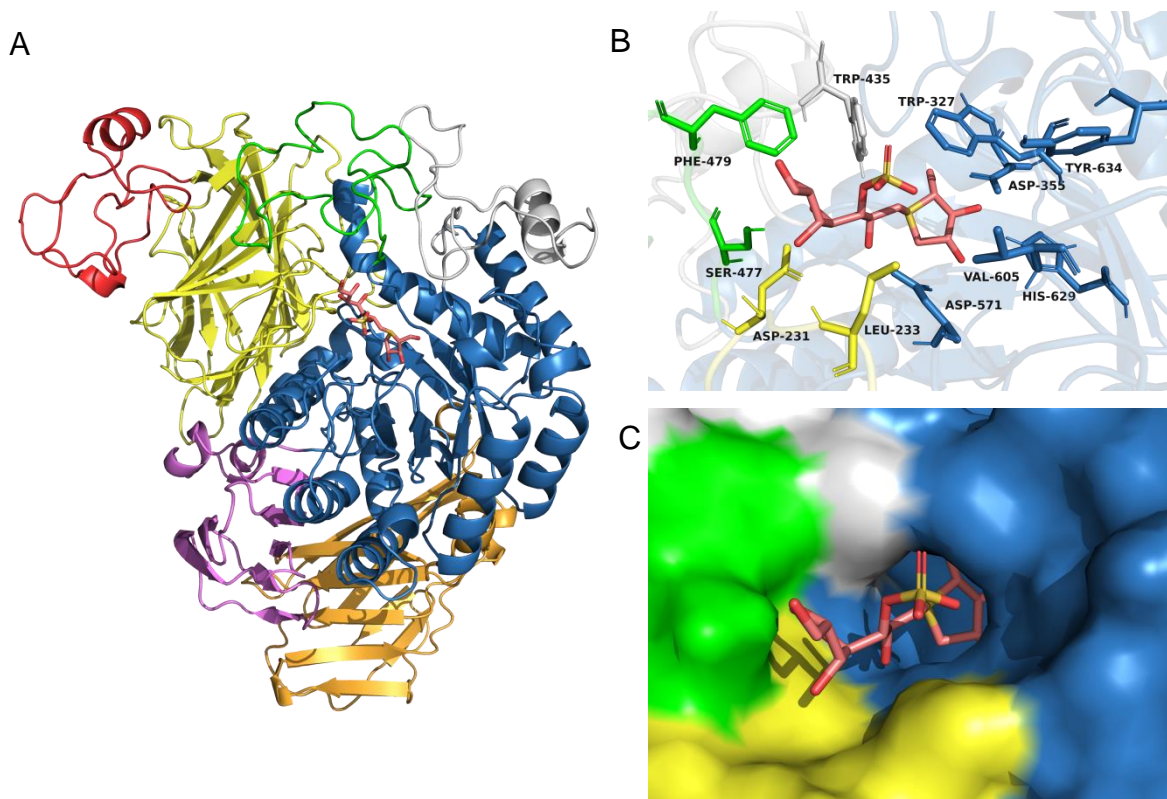


**Figura B2.** A) Representación de los subdominios de la *ct*-MGAM: dominio trébol tipo P (anaranjado); un dominio N-terminal (rojo); dominio catalítico, barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (azul), el asa-1 (amarillo) y el asa-2 (gris); dominio C-terminal proximal (verde) y el dominio C-terminal distal (rosa); acarbosa (cian). B) Residuos presentes en el sitio catalítico y la acarbosa cocrystalizada en la enzima (anaranjada).

### **Dominio N-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana (*nt*-SI: 3LPP)**

El dominio *nt*-SI, consta de cinco subdominios: un dominio trébol tipo P (residuos 29–80); un dominio N-terminal (residuos 81–296); un dominio catalítico, que está formado por un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (residuos 297–681) y dos insertos, el asa-1 (residuos 395–445) y el asa-2 (residuos 476–521); un dominio C-terminal proximal (residuos 682–579) y un dominio C-terminal distal (residuos 760–898; **Figura B3**).

Los residuos catalíticos son el Asp472, el cual actúa como nucleófilo y la Asp571. El sitio catalítico está formado por los residuos Asp231, Asp571, Leu233, Trp327, Trp435, Phe479, Val605, Tyr634, His629, Asp355 y Arg555 (Sim et al., 2010).



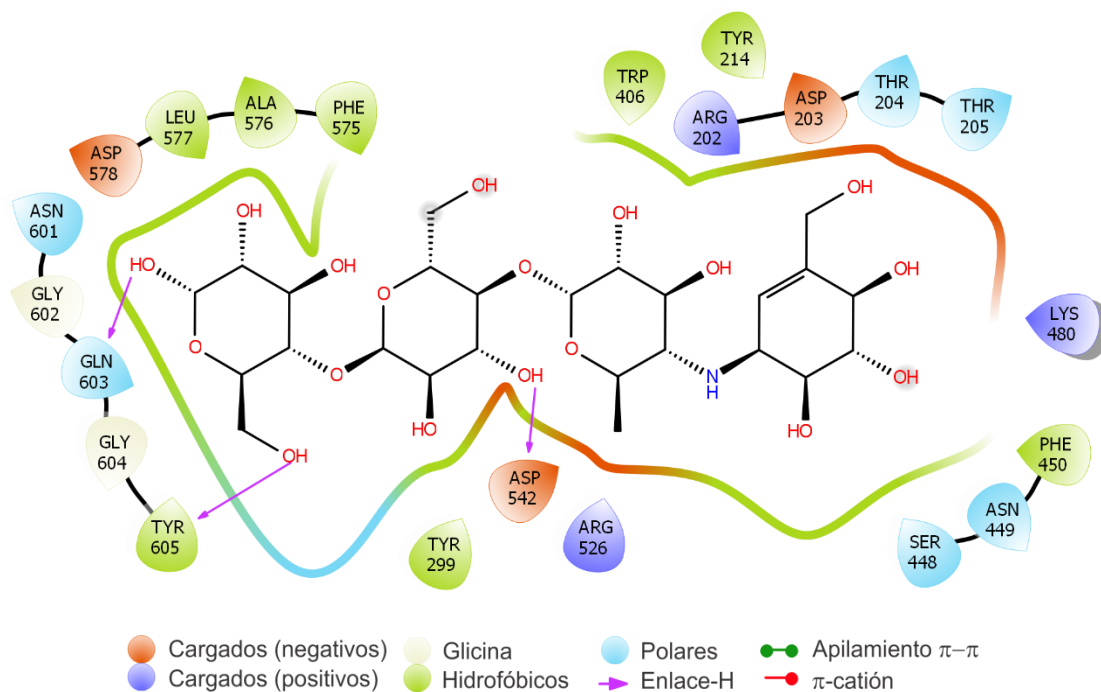
**Figura B3.** A) Representación de los subdominios de la *nt*-SI: dominio trébol tipo P (rojo); un dominio N-terminal (amarillo); dominio catalítico, barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (azul), el asa-1 (gris) y el asa-2 (verde); dominio C-terminal proximal (violeta) y el dominio C-terminal distal (anaranjado); acarbosa (cian). B) Residuos presentes en el sitio catalítico y el kotanolol cocrystalizado en la enzima (rosa). C) Forma del sitio catalítico.

### Acoplamiento molecular de los compuestos 118 y 119 de *P. minimoides*

Las estructuras de los compuestos **118** y **119-R** se optimizaron geoméricamente utilizando el programa Spartan'10; posteriormente, se encontraron los posibles sitios de interacción empleando el programa AutoDock. El protocolo utilizado en los estudios de acoplamiento molecular se validó al modelar el modo de unión de la acarbosa en las enzimas 2QMJ Y 3TOP (Figura 4 y 7; RMSD = 0.91 y 1.09 Å, respectivamente) y del kotanolol en la enzima 3LPP (RMSD = 1.2 Å). Las interacciones para la *nt*-MGAM se muestran en la **Tabla B1** y en las **Figuras B4** y **B6**; para la *ct*-MGAM se muestran en la **Tabla B2** y en las **Figuras B7** y **B9**; y para *nt*-SI se muestran en la **Tabla B3** y en las **Figuras B10** y **B12**.

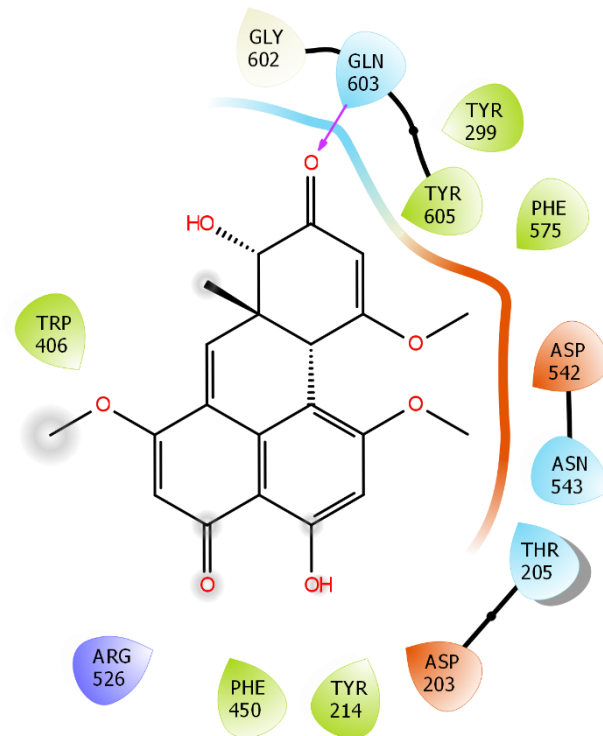
**Tabla B1.** Interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la *nt*-MGAM.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones <i>nt</i> -MGAM: 2QMJ			
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Apilamiento de anillos
118	-7.2	Asp203,Thr205, Arg526,Asp542, Asn543,Gln603	Tyr214,Tyr299, Trp406,Phe450, Phe575,Gly602, Tyr605	Gln603	
119S	-7.9	Asp203,glu300, Asp327,arg334, Asp542,gln603	Tyr299,ile328, Trp406,phe450, leu575,Ala576, leu577,Gly602, tyr605		Leu575
acarbosa	-7.4	Arg202,Asp203, Thr203,Thr205, Ser448,Asn449, Lys480,Arg526, Asp542,Asp578, Asn601,Gln603	Tyr214,Tyr299, Trp406,Phe450, Phe575,Leu577, Ala576,Gly602, Gly604,Tyr605	Asp542, Gln603, Tyr605	



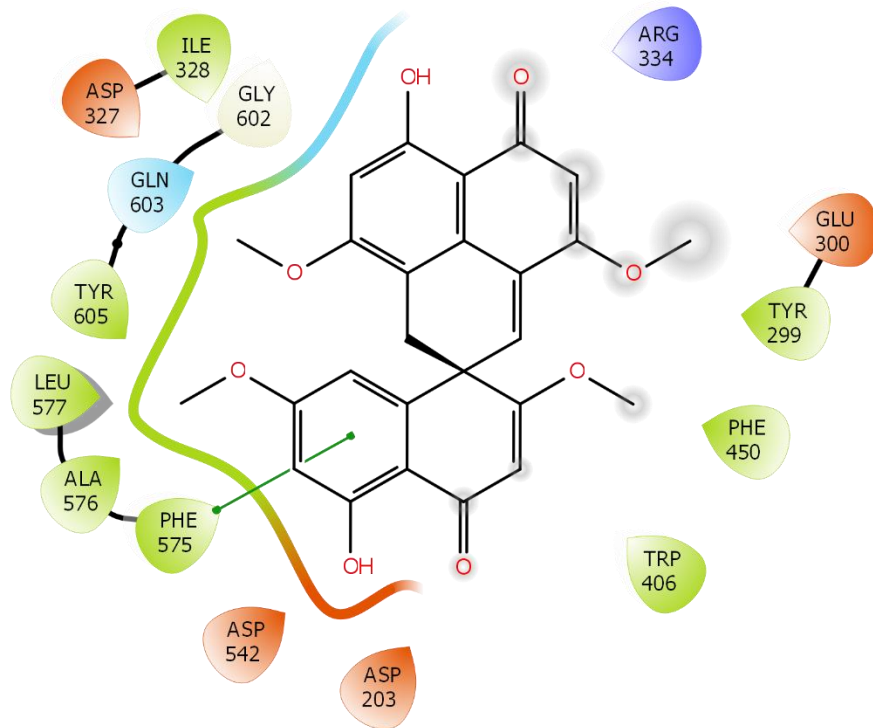
**Figura B4.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con 2QMJ.





- Cargados (negativos)
- Glicina
- Polares
- Apilamiento  $\pi-\pi$
- Cargados (positivos)
- Hidrofóbicos
- ▶ Enlace-H
- $\pi$ -catión

**Figura B5.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **118** con 2QMJ.

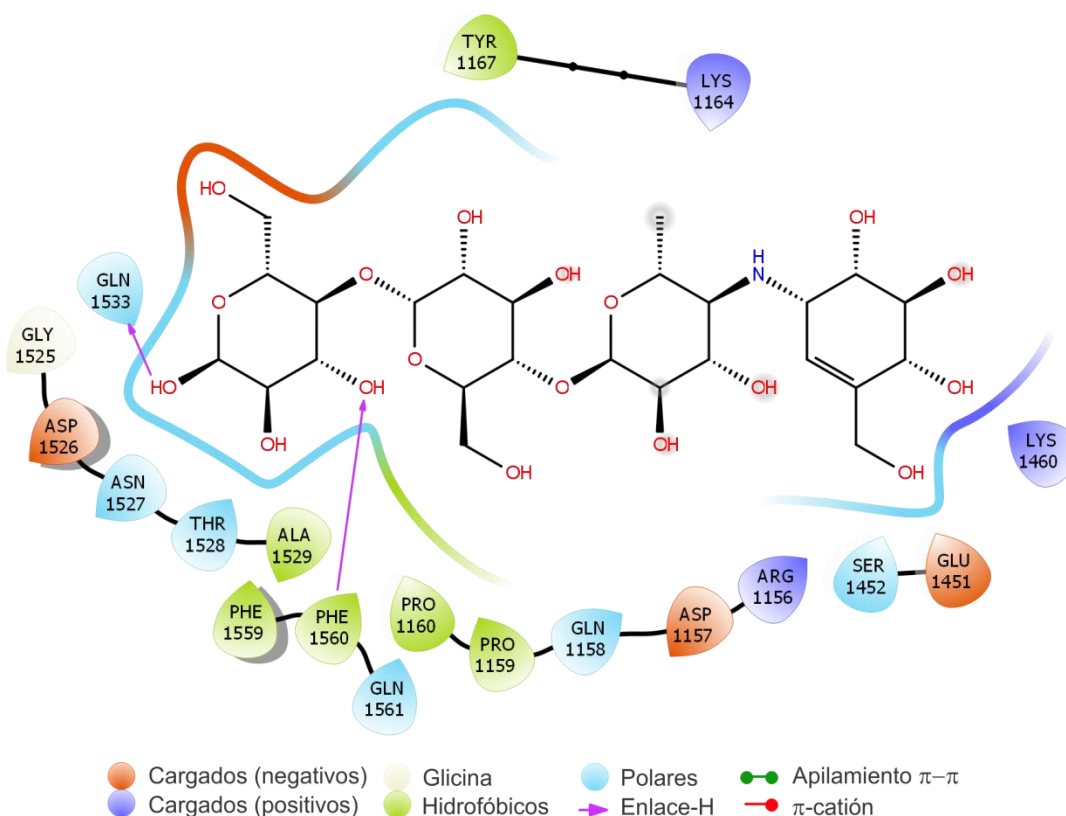


- Cargados (negativos)
- Glicina
- Polares
- Apilamiento  $\pi-\pi$
- Cargados (positivos)
- Hidrofóbicos
- ▶ Enlace-H
- $\pi$ -catión

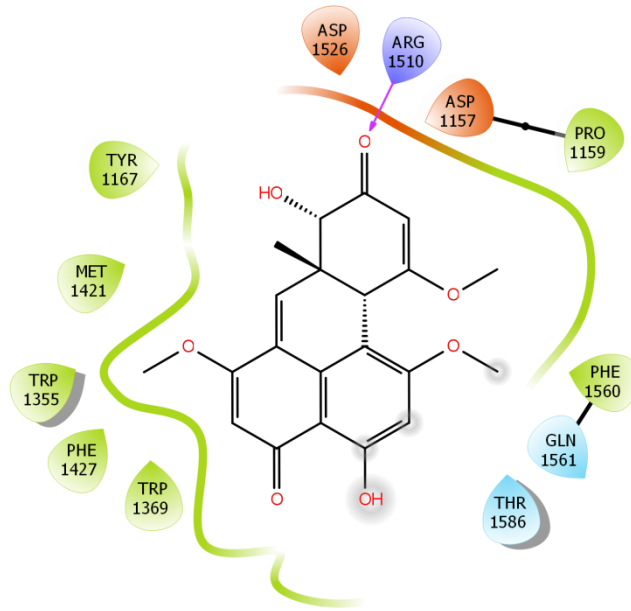
**Figura B6** Interacciones enzima-ligando en 2D de **119-S** con 2QMJ.

**Tabla B2.** Interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la *ct*-MGAM.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones <i>ct</i> -MGAM: 3TOP				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación	Apilamiento de anillos
118	-7.0	Asp1157, arg1510, Asp1526, gln1561, Thr1586	Pro1159, tyr1167, trp1355, trp1369, met1421, phe1427, phe1560	arg1510		
119S	-8.8	Asp1157, Gln1372, Arg1377, Lys1460, Asp1526, Gln1561, Asn1585, Thr1586, Thr1589,	Tyr1251, Trp1355, Trp1369, Met1421, Phe1427, Phe1559 Phe1560, Ile1587			Trp1369, Phe1560
acarbosa	-7.8	Arg1156, Asp1157, Gln1158, Lys1164, Glu1451, Ser1452, Lys1460, Asp1526, Asn1527, Thr1528, Gln1533, Gln1561	Pro1159, Pro1160, Tyr1167, Gly1525, Ala1529, Phe1559, Phe1560	Gln1533, Phe1560		

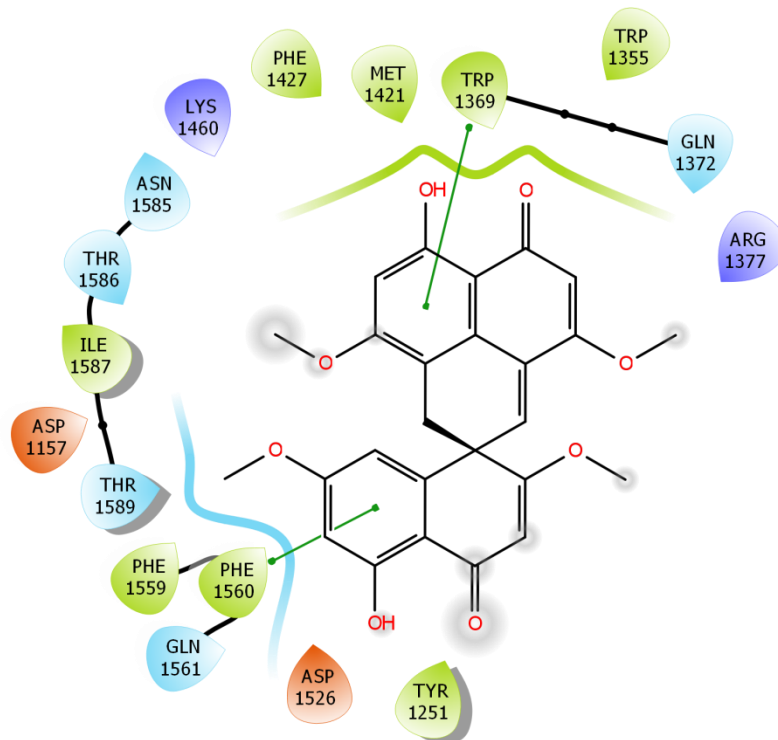


**Figura B7.** Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con 3TOP.



- Cargados (negativos)
- Glicina
- Polares
- Apilamiento  $\pi$ - $\pi$
- Cargados (positivos)
- Hidrofóbicos
- ▶ Enlace-H
- $\pi$ -catión

**Figura B8.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **118** con 3TOP.

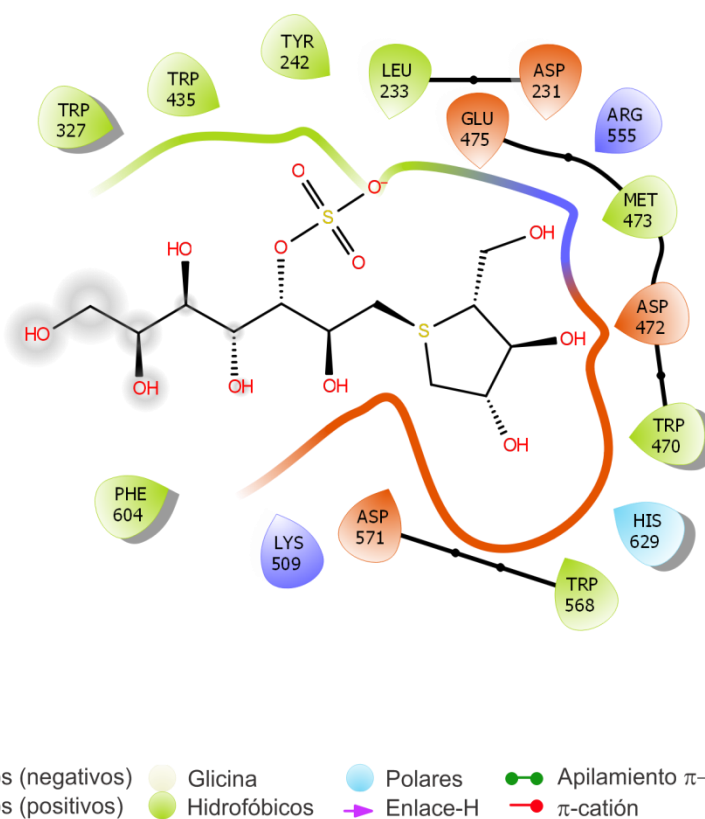


- Cargados (negativos)
- Glicina
- Polares
- Apilamiento  $\pi$ - $\pi$
- Cargados (positivos)
- Hidrofóbicos
- ▶ Enlace-H
- $\pi$ -catión

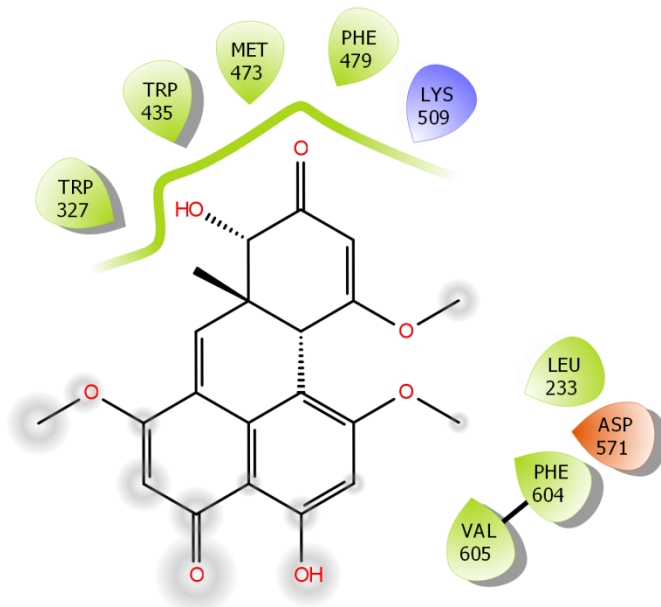
**Figura B9.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **119-S** con 3TOP.

**Tabla B3.** Interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la *nt*-Sl.

Compuesto	Energía libre de unión (kcal/mol)	Interacciones <i>nt</i> -Sl: 3LPP				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación	Apilamiento de anillos
118	-6.6	Lys509,asp571	Leu233,trp327, Trp435,met472, Phe479,phe604, Val605			
119S	-7.7	Asp231,lys362, Lys509,arg555, Asp571,ser631, Aso632	Leu233,trp327, Trp435,phe479, Phe604,val605			
kotanolol	-6.1	Asp231,Asp472, Glu475,Lys509, Arg555,Asp571, His629	Leu233,Tyr242, Trp327,Trp435, Trp470,Met473, Trp568,Phe604			

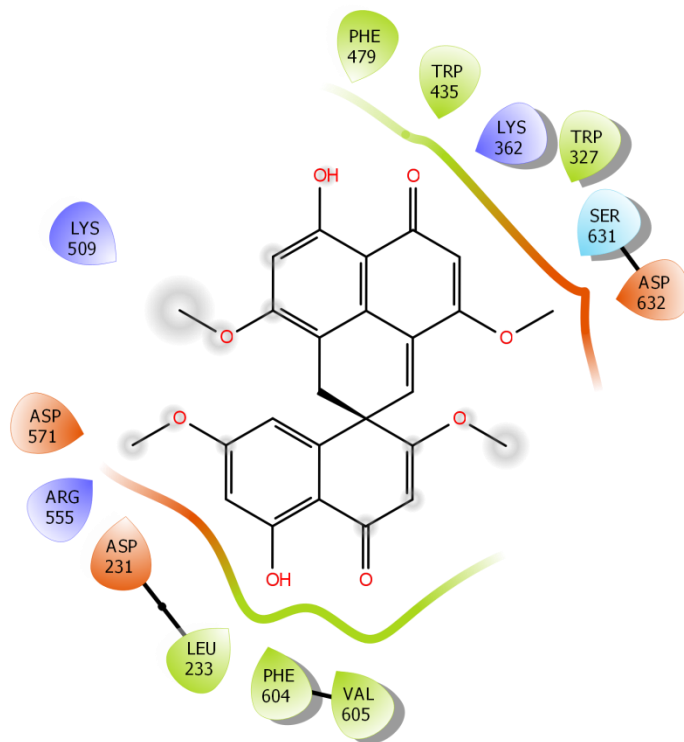


**Figura B10.** Interacciones enzima-ligando en 2D del kotanolol con 3LPP.



● Cargados (negativos)    ● Glicina    ● Polares    ● Apilamiento  $\pi$ - $\pi$   
● Cargados (positivos)    ● Hidrofóbicos    ➤ Enlace-H    ●  $\pi$ -catión

**Figura B11.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **118** con 3LPP.



● Cargados (negativos)    ● Glicina    ● Polares    ● Apilamiento  $\pi$ - $\pi$   
● Cargados (positivos)    ● Hidrofóbicos    ➤ Enlace-H    ●  $\pi$ -catión

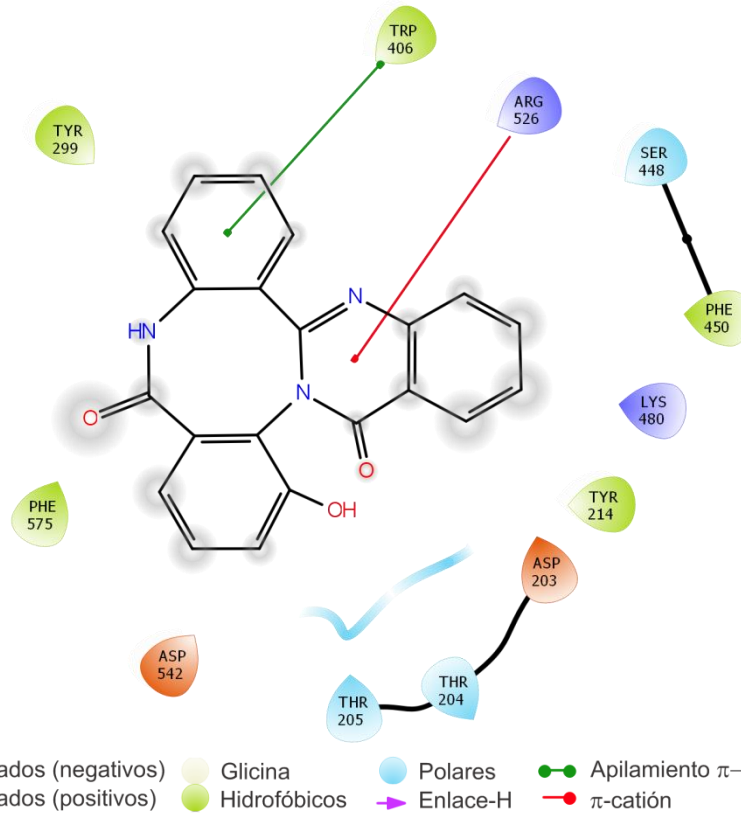
**Figura B12.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **119-S** con 3LPP.

## Acoplamiento molecular de los compuestos 72, 89 y 120 de *M. circinata*

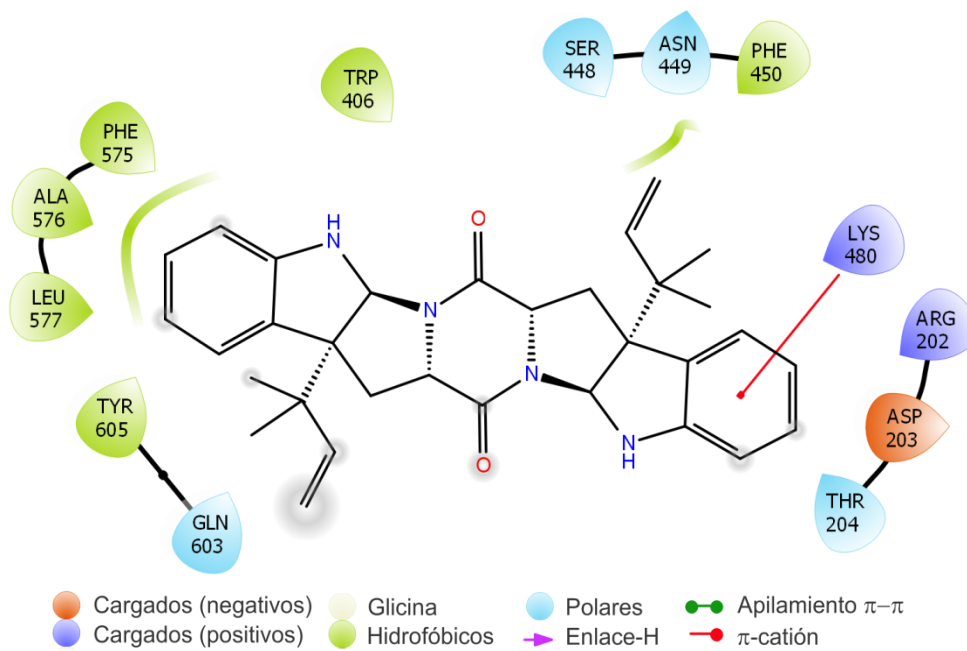
Las estructuras de los compuestos **72**, **89** y **120** se optimizaron geométricamente utilizando el programa Spartan'10; posteriormente, se encontraron los posibles sitios de interacción empleando el programa AutoDock. El protocolo utilizado en los estudios de acoplamiento molecular se validó al modelar el modo de unión de la acarbosa en las enzimas 2QMJ Y 3TOP (**Figuras 4** y **7**; RMSD = 0.91 y 1.09 Å, respectivamente) y del kotanolol en la enzima 3LPP (**Figura 10**; RMSD = 1.2 Å). Las interacciones para la *nt*-MGAM se muestran en la **Tabla B4** y en las **Figuras B13** y **B15**; para la *ct*-MGAM se muestran en la **Tabla B5** y en las **Figuras B16** y **B18**; y para *nt*-SI se muestran en la **Tabla B6** y en las **Figuras B19** y **B21**.

**Tabla B4.** Interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la *nt*-MGAM

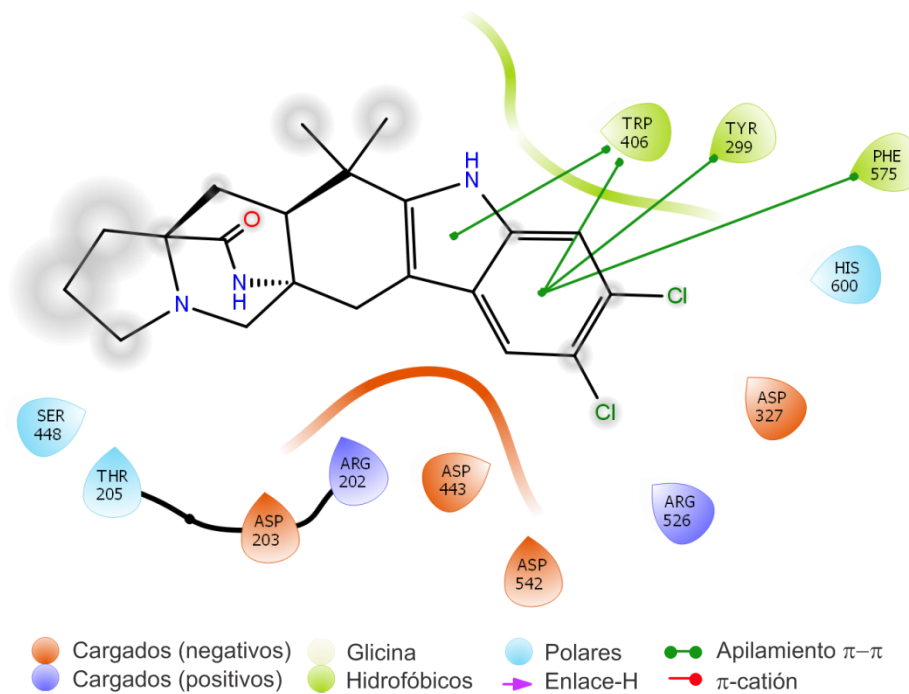
Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones <i>nt</i> -MGAM: 3LPP				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación	Apilamiento de anillos
<b>120</b>	-8.2	Asp203,Thr204 Thr205,Ser448, Lys480,Arg526, Asp542	Tyr214,Tyr299 Trp406,Phe450 Phe575		Arg526	Trp406
<b>72</b>	-6.9	Arg202,Asp203, Thr204,Ser448, Asn449,Lys480, Gln603	Trp406,Phe450, Phe575,Ala576, Leu577,Tyr605		Lys480	
<b>89</b>	-8.1	Ser448,Arg202, Asp203,Thr205, Asp327,Arg443, Asp502,Arg526, His600	Tyr299, Trp406, Phe575			Tyr299, Trp406, Phe575
<b>acarbosa</b>	-7.4	Arg202,Asp203, Thr203,Thr205, Ser448,Asn449, Lys480,Arg526, Asp542,Asp578, Asn601,Gln603	Tyr214,Tyr299, Trp406,Phe450, Phe575,Leu577, Ala576,Gly602, Gly604,Tyr605	Asp542, Gln603, Tyr605		



**Figura B13.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **120** con 2QMJ.



**Figura B14.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **72** con 2QMJ.

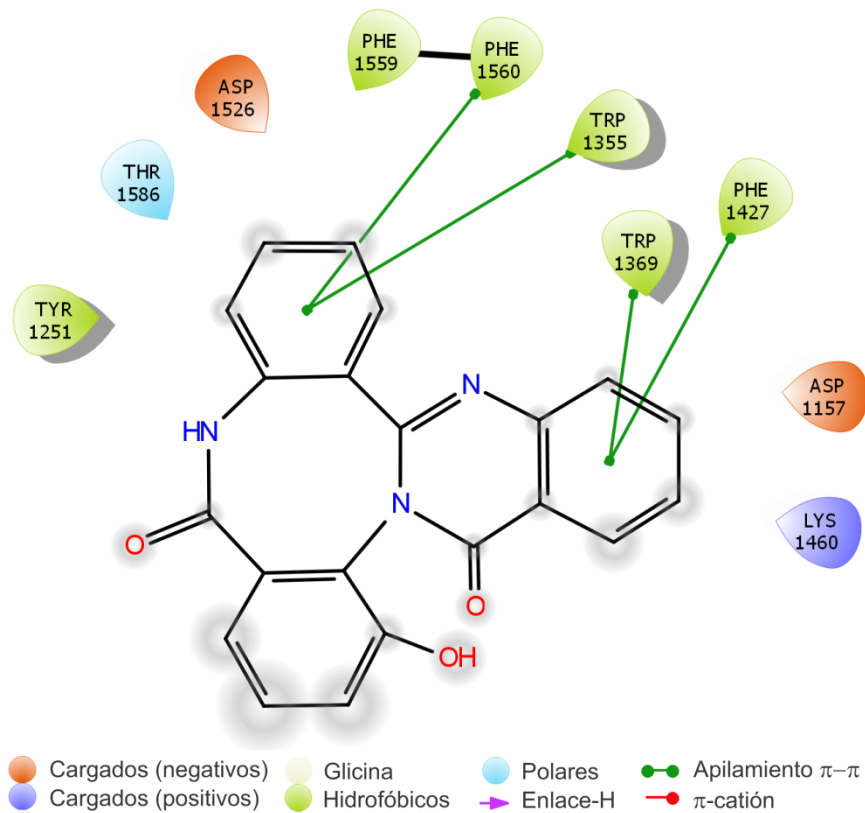


**Figura B15.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **89** con 2QMJ.

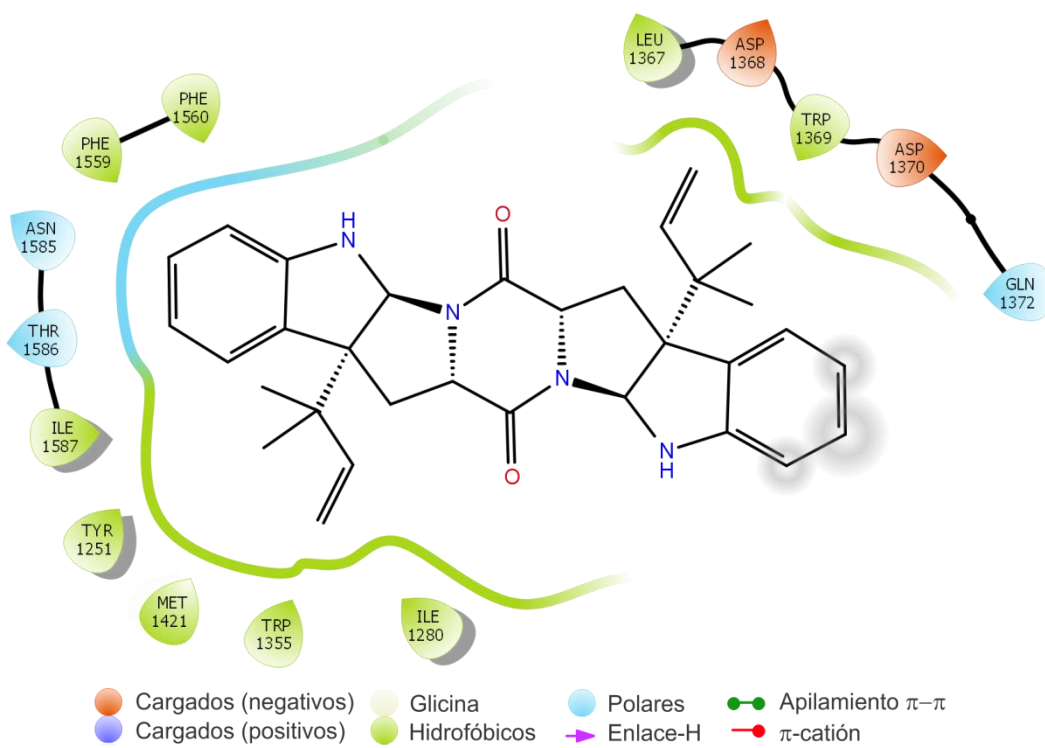
**Tabla B5.** Interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la *ct*-MGAM

Compuesto	Energía libre de unión (kcal/mol)	Interacciones <i>ct</i> -MGAM: 3TOP				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-cación	Apilamiento de anillos
<b>120</b>	-8.4	Asp1157,Lys1460, Asp1526,Thr1586	Tyr1251,Trp1355, Trp1369,Phe1427, Phe1559,Phe1560			Trp1355,Trp1369, Phe1427,Phe1560
<b>72</b>	-7.9	Asp1368,Asp1370, Gln1372,Asn1585, Thr1586	Tyr1251,Ile1280, Trp1355,Leu1367, Trp1369,Met1421, Phe1559,Phe1560, Ile1587			
<b>89</b>	-9.9	Asp1157,Asp1279, Asp1420,Lys1460, Asp1510,Asp1526, His1584,Thr1586	Pro1159,Tyr1251, Trp1355,Trp1369, Met1421,Phe1427, Phe1559,Ph1560	Asp1157, Lys1460		Tyr1251, Trp1355, Phe1559
<b>acarbosa</b>	-7.8	Arg1156,Asp1157, Gln1158,Lys1164, Glu1451,Ser1452, Lys1460,Asp1526, Asn1527,Thr1528, Gln1533,Gln1561	Pro1159,Pro1160, Tyr1167,Gly1525, Ala1529,Phe1559, Phe1560	Gln1533, Phe1560		

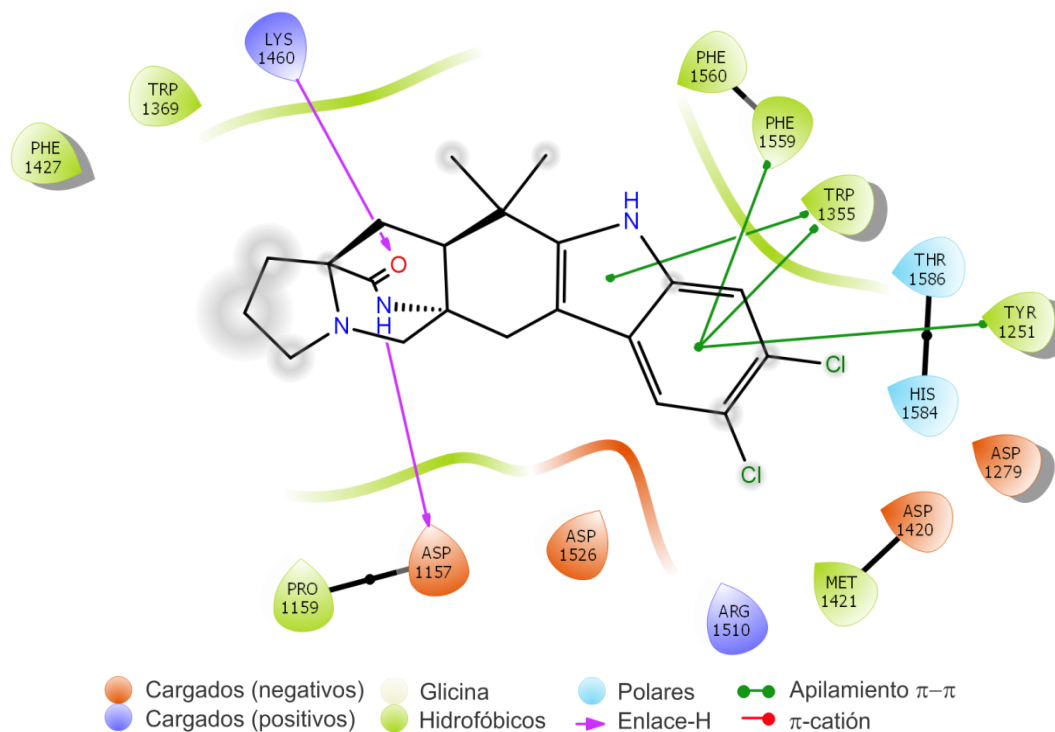




**Figura B16.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **120** con 3TOP.



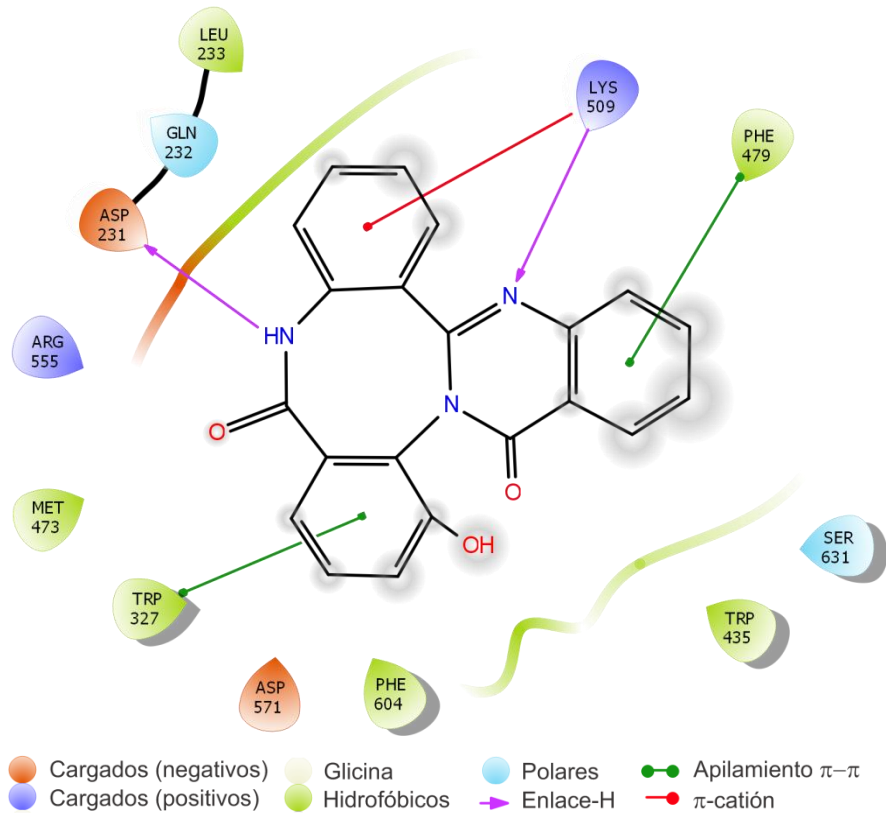
**Figura B17.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **72** con 3TOP.



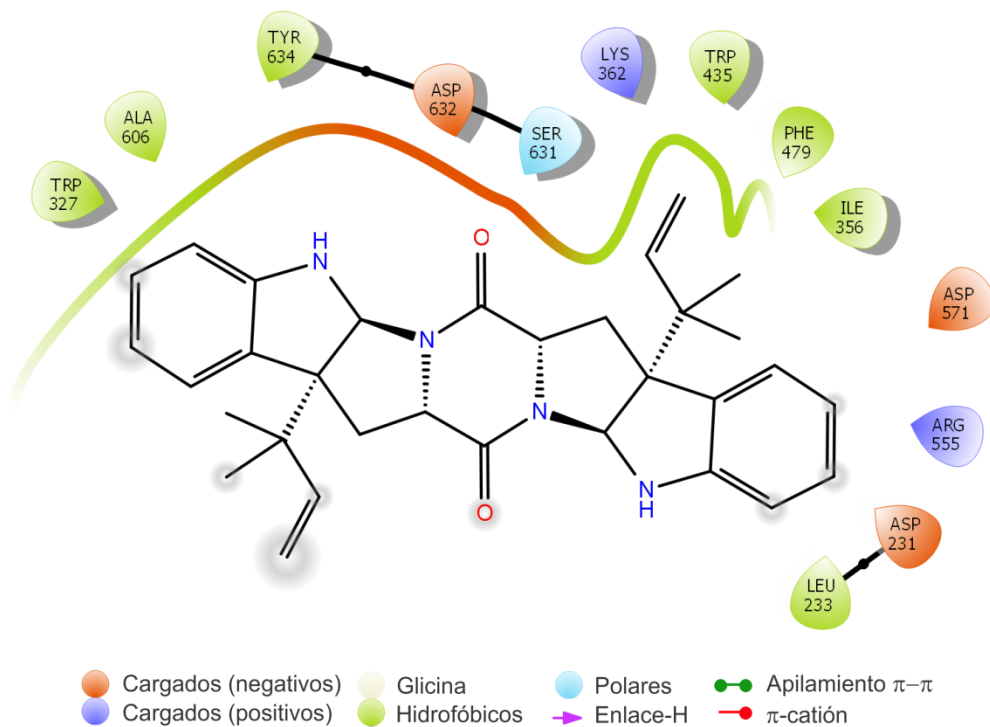
**Figura B18.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **89** con 3TOP.

**Tabla B6.** Interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la *nt*-SI

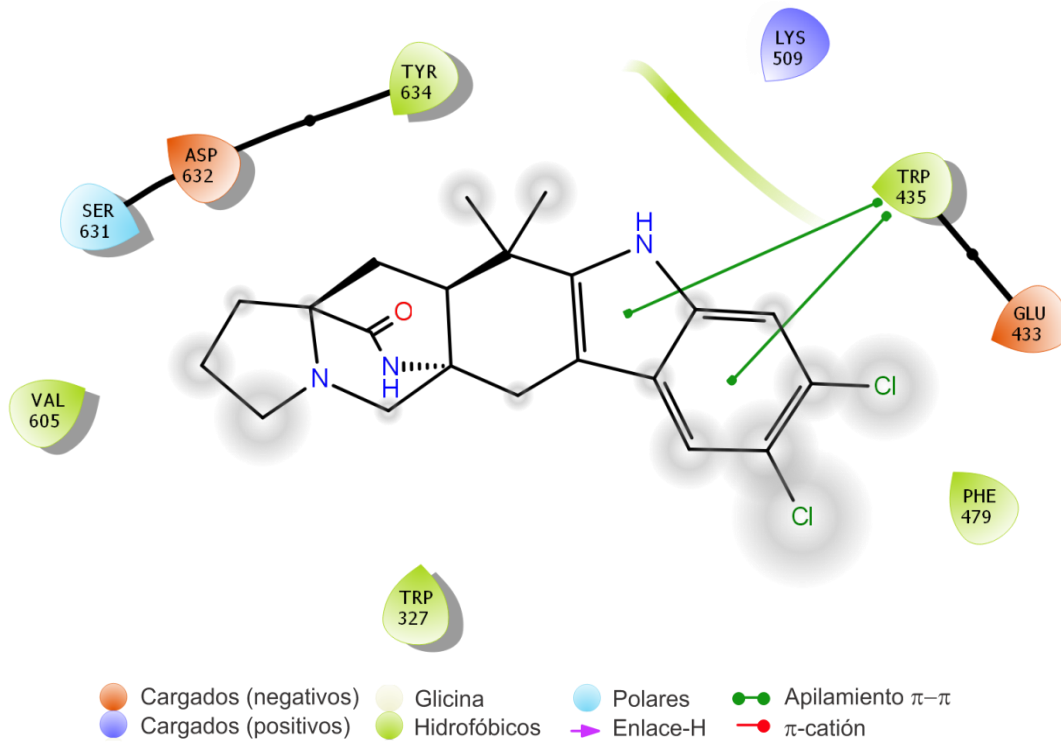
Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones <i>nt</i> -SI: 3LPP				
		Polares	Hidrofóbicas	Enlace de hidrogeno	Pi-catión	Apilamiento de anillos
<b>120</b>	-9.0	Asp231, Gln232, Lys509, Arg555, Asp571, Ser631	Leu233, Trp327, Trp435, Met473, Phe479, Phe604	Asp231, Lys509	Lys509	Trp327, Phe479
<b>72</b>	-7.3	Asp231, Lys362, Arg555, Asp571, Ser631, Asp632	Leu233, Trp327, Ile356, Trp435, Phe479, Ala606, Tyr634			
<b>89</b>	-7.1	Glu433, Lys509, Ser631, Asp632	Trp327, Trp435, Phe479, Val605, Tyr634			Trp435
<b>kotanlolol</b>	-6.1	Asp231, Asp472, Glu475, Lys509, Arg555, Asp571, His629	Leu233, Tyr242, Trp327, Trp435, Trp470, Met473, Trp568, Phe604			



**Figura B19.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **120** con 3LPP.



**Figura B20.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **72** con 3LPP.



**Figura B21.** Interacciones enzima-ligando en 2D de **89** con 3LPP.

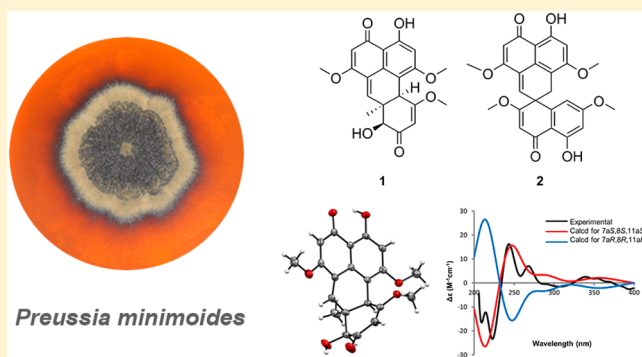
## $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from *Preussia minimoides*\*

Manuel Rangel-Grimaldo, Isabel Rivero-Cruz, Abraham Madariaga-Mazón, Mario Figueroa, and Rachel Mata\*

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

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** Extensive fractionation of an extract from the grain-based culture of the endophytic fungus *Preussia minimoides* led to the isolation of two new polyketides with novel skeletons, minimoidiones A (1) and B (2), along with the known compounds preussochrome C (3), corymbiferone (4), and 5-hydroxy-2,7-dimethoxy-8-methylnaphthoquinone (5). The structures of 1 and 2 were elucidated using 1D and 2D NMR data analysis, along with DFT calculations of  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts. The absolute configuration of 1 was established by a single-crystal X-ray diffraction analysis and TDDFT-ECD calculations. Compounds 1–4 significantly inhibited yeast  $\alpha$ -glucosidase.

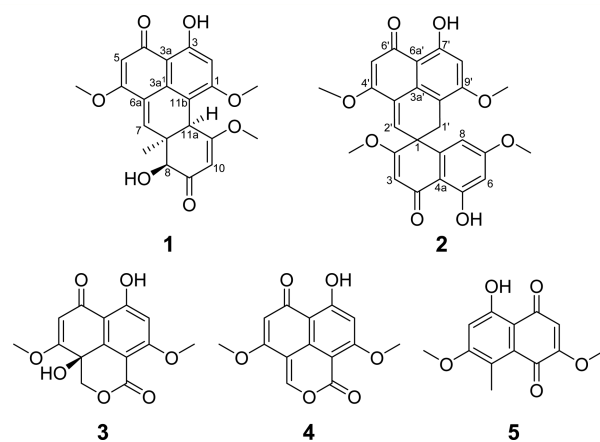


The genus *Preussia* (Sporormiaceae) comprises species isolated from soil, wood, and plant debris. *Sporormiella* Ellis & Everh. is a similar genus, defined originally to include exclusively coprophilous species. Recent studies have demonstrated no difference between the two genera with respect to their habitat and other diagnostic morphological features. Thus, some authors consider it more appropriate to treat them as synonyms.<sup>1,2</sup> *Preussia minimoides* (S.I. Ahmed & Cain) Valdós. & Guarro (Sporormiaceae) [Syn: *Sporormiella minimoides* S.I. Ahmed & Cain] is a prolific producer of many interesting polyketides and depsipeptides.<sup>3</sup> Some of these metabolites possess interesting biological activities, including cytotoxicity (brocaenol A),<sup>4</sup> antibacterial and antifungal activities (sporminarins A and B),<sup>5</sup> and calmodulin inhibitory effects (corymbiferone C, corymbiferone lactone E, and 5-hydroxy-2,7-dimethoxy-8-methylnaphthoquinone).<sup>6</sup>

The search for new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and other antidiabetic drugs from natural sources has increased notably in recent years, considering that type II diabetes mellitus is one of the most challenging health problems of the 21st century. Therefore, as part of an effort to discover new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors useful for the development of antidiabetic drugs, we now report the isolation and structure elucidation of two new polyketides with novel skeletons, namely, minimoidiones A (1) and B (2), from an endophytic isolate of the fungus *P. minimoides* obtained from *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae).<sup>6</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

The defatted extract from moist rice cultures of *P. minimoides* inhibited the activity of yeast  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ GHY) with an  $\text{IC}_{50}$  of 38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Extensive fractionation of this extract yielded two novel polyketides, the benzo[*de*]anthracenedione 1 and the spiro[naphthalenephenalene]dione 2, which were given the



trivial names minimoidiones A and B, respectively. In addition, the known compounds preussochrome C (3),<sup>7</sup> corymbiferone (4),<sup>8</sup> and 5-hydroxy-2,7-dimethoxy-8-methylnaphthoquinone (5)<sup>6</sup> were isolated. Compound 3 was isolated for the first time from *P. minimoides*, and its NMR data were identical to those previously reported. Compounds 4 and 5 were previously obtained from the same isolate and were characterized by comparison with authentic samples.<sup>6</sup>

Minimoidione A (1) was isolated as yellow crystals. Its molecular formula,  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_7$ , established from HRESIMS data, indicated a structure with 12 degrees of unsaturation. The IR ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ) and UV (maxima at 205, 221, 260, and 301 nm) spectra revealed absorptions indicative of conjugated ketone and aromatic moieties. Analysis of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data

**Special Issue:** Special Issue in Honor of Phil Crews

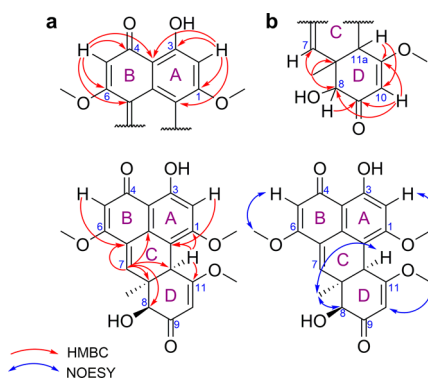
**Received:** June 22, 2016

**Published:** September 27, 2016

indicated the presence of 21 carbon atoms consisting of three methoxy groups, one additional methyl, six methines (four in the aromatic-vinyl region and two aliphatic), 11 non-protonated carbons (two conjugated ketones, eight aromatic or olefinic, and one aliphatic), and two hydroxy groups (Table 1). On the basis of the 1D and 2D NMR data (Figures S4–S7),

**Table 1.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) NMR Data for Compound 1 in  $\text{CDCl}_3$

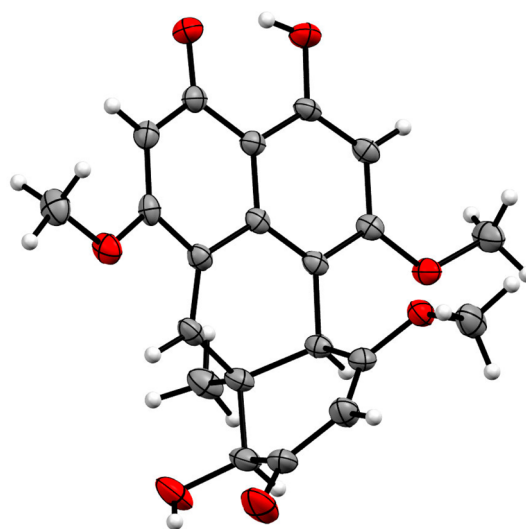
position	$\delta_{\text{C}}$ , type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	HMBC	NOESY
1	163.4 C			
2	99.2 CH	6.49, s	1, 3, 3a, 11b	1-OCH <sub>3</sub>
3	163.1 C			
3a	106.8 C			
3a <sup>1</sup>	130.5 C			
4	190.4 C			
5	101.4 CH	5.65, s	3a, 4, 6, 6a	6-OCH <sub>3</sub>
6	165.1 C			
6a	125.9 C			
7	138.4 CH	6.98, d (1.5)	3a <sup>1</sup> , 6, 7a, 8, 11a	
7a	44.1 C			
8	76.6 CH	4.25, s	7, 7a, 7a-CH <sub>3</sub> , 9	7a-CH <sub>3</sub>
9	196.6 C			
10	100.4 CH	5.50, d (2.0)	8, 9, 11, 11a	11-OCH <sub>3</sub>
11	175.1 C			
11a	41.4 CH	4.28, t (2.0)	1, 10, 11, 11b	7a-CH <sub>3</sub>
11b	108.9 C			
1-OCH <sub>3</sub>	55.9 CH <sub>3</sub>	3.90, s	1	2
6-OCH <sub>3</sub>	55.8 CH <sub>3</sub>	3.80, s	6	5
11-OCH <sub>3</sub>	56.8 CH <sub>3</sub>	3.53, s	11	10
7a-CH <sub>3</sub>	20.9 CH <sub>3</sub>	1.28, s	7, 7a, 8, 11a	8, 11a
3-OH		13.21, s	2, 3, 3a	
8-OH		5.30, s		



**Figure 1.** Partial structures a and b and selected HMBC and key NOESY correlations of minimoidione A (1).

two partial substructures of 1 (a and b; Figure 1) were elucidated. Rings A and B of substructure a were assigned considering the HMBC correlations from H-2 to C-1/C-3/C-3a and from H-5 to C-3a/C-4/C-6/C-6a; the NOESY cross-peaks between H-2 and 1-OCH<sub>3</sub> and from H-5 to 6-OCH<sub>3</sub>; and the presence of a phenolic hydroxy group at  $\delta_{\text{H}}$  13.21 (3-OH), which was chelated with the conjugated ketone group at  $\delta_{\text{C}}$  190.4 (C-4). On the other hand, diagnostic chemical shifts

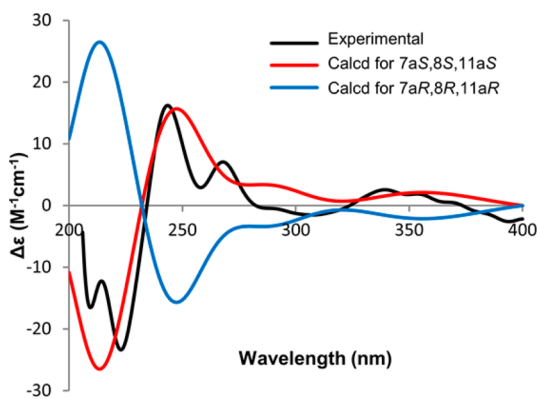
for the presence of a second  $\alpha,\beta$  unsaturated ketone system and the HMBC correlations from H-10 to C-8/C-9/C-11/C-11a, from H-8 to C-7/C-7a/C-9/7a-CH<sub>3</sub>, and from H-11a to C-10/C-11/C-11b assembled ring D of substructure b (Figure 1). Consideration of the molecular formula indicated that these partial structures have to be linked to form an additional ring (ring C). HMBC correlations from H-11a ( $\delta_{\text{H}}$  4.28) to C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  163.4 in ring A)/C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  100.4 at ring D)/C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  175.1 at ring D)/C-11b ( $\delta_{\text{C}}$  108.9 at ring A) and from H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  6.98, ring C) to C-6a/C-7a/C-8/C-11a (Figure 1) confirmed this tetracyclic system. Altogether, these correlations resulted in the planar structure of compound 1. The NOESY (Figure S6) interactions between 7a-CH<sub>3</sub>, H-8, and H-11a indicated that they had the same relative orientation. An X-ray diffraction analysis of 1 with Mo K $\alpha$  radiation confirmed the proposed structure and the relative configuration at the chiral centers. An ORTEP drawing of the crystallographically determined structure of 1 is depicted in Figure 2.



**Figure 2.** ORTEP drawing of compound 1.

The absolute configuration at the stereogenic centers of 1 was deduced by comparison of the experimental and calculated electronic circular dichroism (ECD) spectra of the two possible enantiomers (7aS,8S,11aS and 7aR,8R,11aR), which were calculated using time-dependent density functional theory (TDDFT). The calculated spectrum for the 7aS,8S,11aS isomer showed good agreement with the experimental data (Figure 3).

Minimoidione B (2) was isolated as an optically inactive orange solid that analyzed for  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_8$ , which would require 16 double-bond equivalents. The IR spectrum showed characteristic absorptions for aromatic ring (1623 and 1461  $\text{cm}^{-1}$ ), hydroxy group (3437  $\text{cm}^{-1}$ ), and carbonyl groups (1653  $\text{cm}^{-1}$ ). The 1D and 2D NMR data (Table 2) included signals for four methoxy groups, one methylene, six aromatic or olefinic methines, and 16 nonprotonated carbons, including two conjugated ketone carbonyls, 14 aromatic, six of which were oxygenated, and one aliphatic. Finally, two phenolic chelated hydroxy groups were detected ( $\delta_{\text{H}}$  13.30 and 13.14). As in compound 1, detailed analysis of the 2D NMR spectra, in particular of the HMBC data, led to partial structures c and d indicated in Figure 4. Substructure c (rings A and B), identical to substructure a of compound 1, was elucidated on the basis of the HMBC cross-peaks from H-8' to C-6'a/C-7'/C-9, from H-

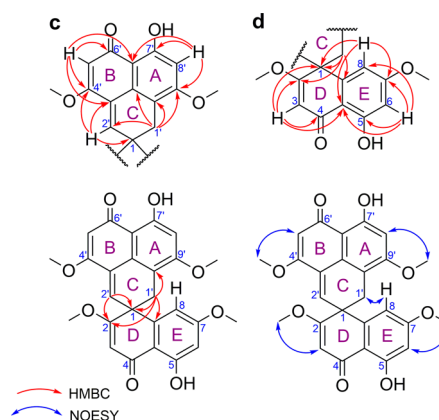


**Figure 3.** Comparison of the experimental ECD spectrum of **1** (black) with those calculated at the B3LYP/6-31+G(d) level for enantiomers **7aS,8S,11aS** (red) and **7aR,8R,11aR** (blue).

**Table 2.**  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) NMR Data for Compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

position	$\delta_{\text{C}}$	type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	HMBC	NOESY
1	44.6	C			
2	177.8	C			
3	100.6	CH	5.70, s	1, 2, 4, 4a	2-OCH <sub>3</sub>
4	189.7	C			
4a	106.7	C			
5	164.6	C			
6	99.9	CH	6.35, d (2.5)	4a, 5, 7, 8	7-OCH <sub>3</sub>
7	164.7	C			
8	106.4	CH	6.24, d (2.5)	1, 4a, 6, 7	7-OCH <sub>3</sub> , 1'
8a	129.2	C			
2-OCH <sub>3</sub>	56.7	OCH <sub>3</sub>	3.80, s	2	3
7-OCH <sub>3</sub>	55.4	OCH <sub>3</sub>	3.67, s	7	6, 8
1'	33.1	CH <sub>2</sub>	3.39, d (18) 3.19, d (18)	1, 2, 2', 3a', 8a, 9', 10'	8
2'	135.0	CH	6.67, s	1, 2, 3', 4'	4'-OCH <sub>3</sub>
3'	126.5	C			
3a'	147.0	C			
4'	164.8	C			
5'	102.1	CH	5.75, s	3', 4', 6', 6a'	4'-OCH <sub>3</sub>
6'	190.1	C			
6a'	106.7	C			
7'	162.4	C			
8'	99.3	CH	6.45, s	7', 6a', 10'	9'-OCH <sub>3</sub>
9'	161.6	C			
10'	109.8	C			
4'-OCH <sub>3</sub>	56.0	OCH <sub>3</sub>	3.84, s	4'	2', 5'
9'-OCH <sub>3</sub>	55.7	OCH <sub>3</sub>	3.79, s	9'	8'
OH-5			13.30, s	5, 6	
OH-7'			13.14, s		

5' to C-3'/C-4'/C-6', and from H-2' to C-1/C-3'/C-4'. Furthermore, the NOESY correlations from H-8' to 9'-OCH<sub>3</sub> and H-5' to 4'-OCH<sub>3</sub> and the chelated phenolic hydroxy group at  $\delta_{\text{H}}$  13.14 (7'-OH) completed the assembly. On the other hand, substructure **d** (including rings D and E and a methylene functionality) was established considering the following HMBC correlations: from H-6 to C-4a/C-5/C-7/C-8, from H-3 to C-1/C-2/C-4/C-4a, from H-8 to C-1/C-4a/C-7, and from H<sub>2</sub>-1' to C-1/C-2/C-8a. The AB system for two *meta*-related protons observed in the  $^1\text{H}$  NMR between H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.35, d,  $J = 2.5$  Hz)

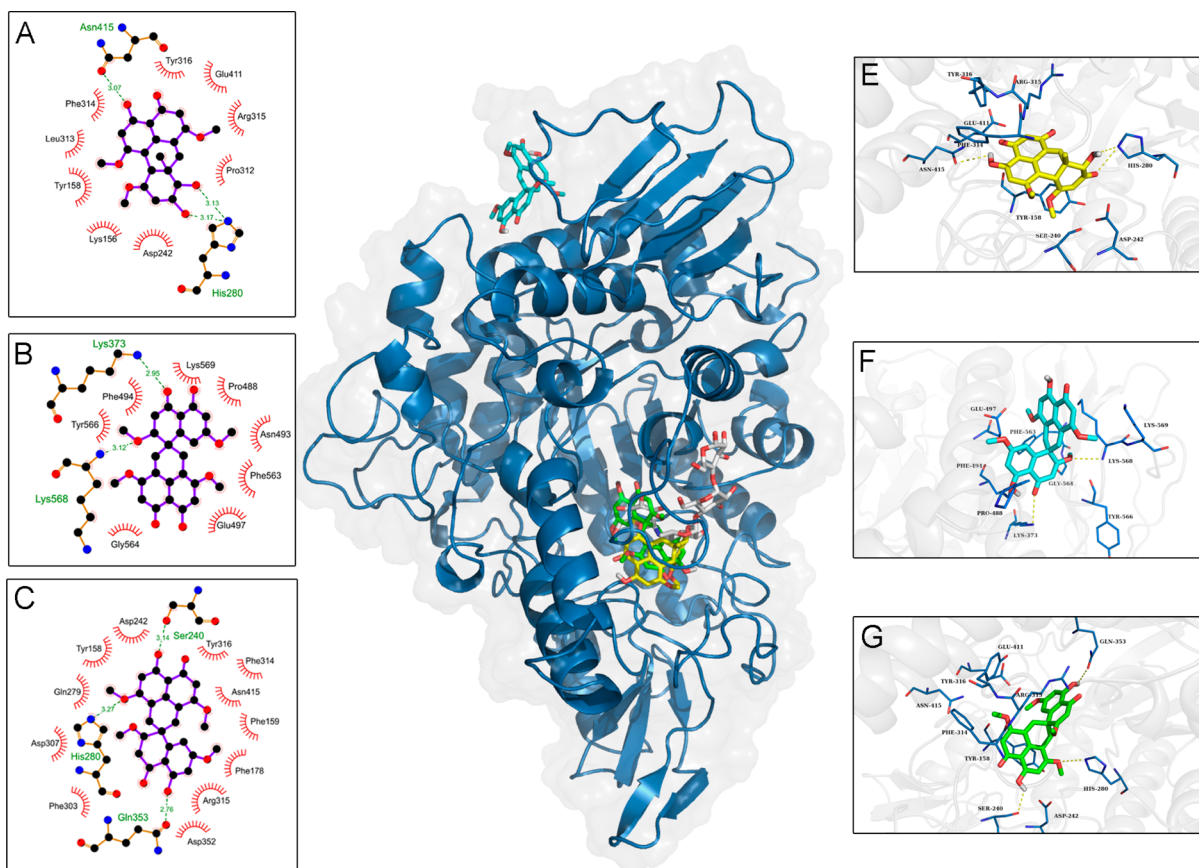


**Figure 4.** Partial structures **c** and **d** and selected HMBC and key NOESY correlations of minimiodione **B** (**2**).

and H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6.24, d,  $J = 2.5$  Hz) and the NOESY correlations between H-3 and H-6 with the methoxy groups at C-2 and C-7, respectively, further supported substructure **d**. These partial structures were linked to form an additional ring (ring C), based on the unsaturation count and the HMBC correlations from H-1a' and H-1b' ( $\delta_{\text{H}}$  3.39 and 3.19, dd,  $J = 18$  Hz) to C-2'/C-3a'/C-9'/C-10' (Figure 4). In addition, the correlations from H-1a' and H-1b' to C-1, from H-2' to C-1, from H-3 to C-1, and from H-8 to C-1 indicated that ring C was linked to ring D in a *spiro* fashion (Figure 4). The only asymmetric center of compound **2** was located at C-1, but the lack of optical activity and molecular symmetry indicated that the compound was a racemic mixture. On the basis of the above considerations, the structure of compound **2** was fully assembled.

All attempts to obtain suitable crystals of **2** for X-ray analysis failed. Therefore, in order to provide further evidence for our structural assignment of **2**,  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts were calculated and compared with the experimental data according to the protocol of Willoughby and collaborators.<sup>9</sup> Basically, this protocol involves a conformational search using molecular mechanics, geometry optimization using DFT, and chemical shift calculations using the GIAO method with the B3LYP/6-311+G(2d,p) level of theory. The computed  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of compound **2** (Tables S5 and S7) were all within 0.28 ppm of the corresponding experimental values. As can be seen in Tables S5 and S8, the matched mean absolute error was <0.17 ppm.<sup>9</sup>

Compounds **1–4** inhibited yeast  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ GHY), with  $\text{IC}_{50}$ 's ranging from 2.9 to 155  $\mu\text{M}$  (Table S9). Among them, compound **2** showed the strongest effect ( $\text{IC}_{50} = 2.9$   $\mu\text{M}$ ). In all cases, the activity was compared to that of an acarbose standard ( $\text{IC}_{50} = 877$   $\mu\text{M}$ ). In order to envisage the putative binding mode of compounds **1** and **2** with  $\alpha$ GHY, docking analyses were carried out using the crystallized structure of  $\alpha$ GHY (pdb code 3A4A).<sup>10,11</sup> The docking protocol was validated reproducing the binding mode of acarbose at the catalytic domain (Figure S23).<sup>12,13</sup> Next, minimiodione **A** (**1**) and the *R* and *S* enantiomers of **2** were docked into the validated  $\alpha$ -glucosidase model. The results predicted that the *R* enantiomer of compound **2** binds in a site different from the catalytic domain [binding energy ( $\Delta G$ ) =  $-7.7$  kcal/mol]. This site was composed mainly by hydrophobic interactions including Pro488, Asn493, Phe494, Glu497, Phe563, Gly564, Tyr566, and Lys569 and hydrogen bonds



**Figure 5.** Model of binding for compounds **1** (yellow sticks) and the two stereoisomers of **2**, *R* (cyan sticks) and *S* (green sticks), with  $\alpha$ GHY (blue cartoon, pdb 3A4A). The insets show details of the binding mode for **1** (A and E), **2R** (B and F), and **2S** (C and G).

between Lys373 and Lys568 (Figure 5C and F). On the other hand, docking of compound **1** and the *S* stereoisomer of **2** suggested that they bind to the catalytic site of  $\alpha$ GHY with higher affinities ( $\Delta G = -8.5$  and  $-10.4$  kcal/mol, respectively). The interactions in this site included hydrophobic contacts with Tyr158, Asp242, Phe314, Arg315, Tyr316, Glu411, and Asn415 and hydrophilic interactions with Ser240, His280, and Gln353 (Figure 5A, E, C, and G).

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR, UV, and ECD spectra were obtained on a PerkinElmer 400 FT-IR, a Shimadzu U160, and a JASCO model J720 spectrophotometer, respectively. Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a PerkinElmer model 343 polarimeter at 20 °C. 1D and 2D NMR spectra were recorded on a 400 MHz Bruker Avance III (operating at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ), a Varian Inova 300 MHz (operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$  and 75 MHz for  $^{13}\text{C}$ ), or a Varian Unity Inova 500 MHz (operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) spectrometer; spectra were recorded using  $\text{CDCl}_3$  and tetramethylsilane as an internal standard. HRESIMS spectra were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer.

ESIMS analyses were performed on an SQD2 single-quadrupole mass spectrometer with an electrospray ion source. Data acquisition and processing was accomplished with the MassLynx software version 4.1 (Waters). HPLC was carried out on a Waters system equipped with a 2535 pump and a 2998 photodiode array detector; data acquisition and management of chromatographic output were performed with the Empower 3 software (Waters). Reagent-grade dichloromethane, *n*-hexane, and methanol and HPLC-grade acetonitrile and methanol (J.T. Baker) were regularly used in the extraction

and isolation procedures. Silica gel 60 (70–230 mesh, Merck) and Sephadex LH-20 (General Electric) were used for column chromatography (CC). TLC analyses were performed on precoated silica gel 60  $\text{F}_{254}$  plates (Merck) using different mobile phases, and visualization of plates was carried out using a 10%  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  solution in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and heating.

**Isolation and Identification of *P. minimoides*.** The endophytic fungus *P. minimoides* was isolated from selected adult and healthy leaves of *H. latiflora*, collected by Sol Cristians in Huetamo (18°31.709' N, 101°4.692' W; 221 masl), State of Michoacan, Mexico, on July 2010. Identification of the plant was secured by the collector; a voucher specimen (131 336) was deposited at the Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), Mexico City, Mexico. The fungus was isolated as previously described.<sup>6</sup> The pure fungal strain was obtained after serial transfers on PDA plates and deposited into the Herbario Nacional de México (MEXU, voucher number 26355). The fungus was identified based on morphological characteristics, such as ascospore morphology.<sup>6</sup> Sequence data [internal transcribed spacer (ITS) and 28S rRNA] were deposited in GenBank as accessions KF5557658 and KF5557659, respectively. Data available at GenBank aligning with MEXU 26355 suggested this fungus is *P. minimoides*.

**Fermentation, Extraction, and Isolation.** Erlenmeyer flasks with 50 mL of potato-dextrose broth (Difco) sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min were individually inoculated with 1  $\text{cm}^3$  agar taken from a stock culture of *P. minimoides* on PDA plates. Cultures grown for 1 week were used to inoculate eight 2.8 L Fernbach flasks containing solid rice medium (200 g of white rice and 400 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ ). *P. minimoides* was cultured at room temperature for 45 days in static conditions with a 12/12 h daily light–dark period. After incubation, the solid medium was extracted exhaustively with a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –MeOH (8:2) via maceration. The extract was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhydrous) and concentrated in vacuo to yield 7.3 g of a



brownish oily residue. The extract was reconstituted with MeOH–MeCN (1:1) and partitioned with *n*-hexane to yield two primary fractions. The MeOH–MeCN fraction (5.4 g) inhibited the activity of the yeast  $\alpha$ -glucosidase with an  $IC_{50}$  of 38  $\mu$ g/mL, and it was further fractionated via silica gel column chromatography, eluting with a gradient of *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100:0  $\rightarrow$  0:100) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (100:0  $\rightarrow$  80:20) to afford nine secondary fractions (F1–F9). Fraction F6 (184.8 mg) was subjected to Sephadex LH-20 CC eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (8:2) to afford six fractions (F<sub>6</sub>I–F<sub>6</sub>VI). Fraction F<sub>6</sub>IV (71.5 mg) was further purified by reversed-phase HPLC (Gemini C<sub>18</sub>, 250  $\times$  21.24 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex) using as mobile phase 30:70 MeCN–H<sub>2</sub>O (acidified with 0.1% formic acid) and increasing linearly to 50% MeCN over 30 min and finally to 100% MeCN for 5 min, at a flow rate of 21.24 mL/min. This process yielded 5.6 mg of **1** as yellow needles. Fraction F4 (184.8 mg) was first washed with *n*-hexane (80 mL); the resulting residue (107.3 mg) was further purified by reversed-phase HPLC (Gemini C<sub>18</sub>, 250  $\times$  21.24 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex) using as mobile phase 60:40 MeCN–H<sub>2</sub>O (acidified with 0.1% formic acid) and increasing linearly to MeCN over 15 min, at a flow rate of 21.24 mL/min; this procedure afforded 11.6 mg of **2** as an orange solid and 20.3 mg of **4** as a yellow powder.

Fraction F9 (425.9 mg) was purified by silica gel chromatography with a gradient of Hex–AcOEt (100:0  $\rightarrow$  0:100) and AcOEt–MeOH (100:0  $\rightarrow$  70:30) to afford seven fractions (F<sub>9</sub>I–F<sub>9</sub>VII). Fraction F<sub>9</sub>IV (48.8 g) was further purified by reversed-phase CC (Gemini C<sub>18</sub>, 250  $\times$  21.24 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex) using as mobile phase 70:30 MeCN–H<sub>2</sub>O (acidified with 0.1% formic acid) and increasing linearly to 50% MeCN over 30 min, at a flow rate of 21.24 mL/min, to obtain 3.2 mg of **3** as a yellow, amorphous solid. Fraction F2 (68.2 mg) was washed with *n*-hexane (30 mL) and then was subjected to Sephadex LH-20 chromatography eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (8:2) to afford five fractions (F<sub>2</sub>I–F<sub>2</sub>V). From fraction F<sub>2</sub>IV spontaneously precipitated 16.3 mg of **5** as an orange powder.

**Minimoidione A (1):** (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>) yellow needles; mp 230–232 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  +27.17 (1 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>); UV (MeOH, *c* 1.8)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 221 (–3.8), 243 (1.8), 258 (–0.1), 268 (0.3), 316 (–0.6) nm; IR (FTIR)  $\nu_{max}$  3640, 3119, 1670, 1616, 1246 cm<sup>–1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR in Table 1; HRESIMS *m/z* 385.1270 [M + H]<sup>+</sup>, calcd 385.1282.

**Minimoidione B (2):** (C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>) orange solid; mp 280–281 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  0 (1 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>); IR (FTIR)  $\nu_{max}$  3065, 3916, 2956, 1633, 1587, 1572, 1229, 1214 cm<sup>–1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR in Table 2; HRESIMS *m/z* 463.1375 [M + H]<sup>+</sup>, calcd 463.1387.

**X-ray Crystal Structure Analysis of Compound 1.** Single crystals suitable for X-ray analysis were obtained by recrystallization from CHCl<sub>3</sub>–MeOH (8:2). A yellow crystal having approximate dimensions of 0.273  $\times$  0.118  $\times$  0.076 mm was mounted on a glass fiber. All measurements were made on a Bruker Smart Apex CCD diffractometer equipped with graphite-monochromated Mo  $K\alpha$  radiation ( $\lambda$  = 0.710 73 Å) at 150 K. The structure was solved by the SHELXS-2013 method and refined using full-matrix least-squares on  $F^2$ . Suitable crystals of **1** were obtained by evaporation of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (8:2). Crystallographic data for **1** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) with the accession no. 1475816. These data are available, free of charge, from the CCDC via [http://www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

**Crystal data for 1:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>, MW 384.37, monoclinic, space group  $P2_1/n$ , with unit cell parameters  $a$  = 9.1302(13) Å,  $b$  = 15.476(2) Å,  $c$  = 13.420(2) Å,  $\alpha$  = 90°,  $\beta$  = 109.085(3)°,  $\gamma$  = 90°,  $Z$  = 4,  $T$  = 150(2) K, volume 1792.0(4) Å<sup>3</sup>,  $F(000)$  808, density(calcd) 1.425 Mg/m<sup>3</sup>. Intensity data were collected in the range of 2.382–25.193° using a  $\omega$  scan; 10 832 reflections collected, 3193 independent reflections [ $R(\text{int})$  = 0.1193] were considered, observed, and used in the calculations. The final  $R_1$  values were 0.0568 [ $I > 2\sigma(I)$ ]. The final  $wR_2(F^2)$  values were 0.1138 [ $I > 2\sigma(I)$ ], with a data–restraints–parameters ratio of 3193/2/263. The final  $R_1$  values were 0.1021 (all data). The final  $wR_2(F^2)$  values were 0.1404 (all data).

**Computational Section.** Minimum energy structures for the different stereoisomers were built with Spartan'08 software (Wavefunction Inc.). Conformational analysis was performed with the Monte Carlo search protocol as implemented in the same software under the

MMFF94 molecular mechanics force field. The resulting conformers were minimized using the DFT method at the B3LYP/6-311+G(2d,p) level of theory for NMR chemical shift prediction. NMR shielding tensors were computed with the gauge-independent atomic orbital (GIAO) method and the polarizable continuum model using the integral equation formalism variant (IEFPCM) as the SCRF method.<sup>9</sup> The TDDFT method at the B3LYP/6-31+G(d) level of theory was employed for ECD calculations using the same DFT-minimized conformers. The self-consistent reaction field with conductor-like continuum solvent model was used to perform the ECD calculations of the major conformers of both **1** enantiomers in MeOH. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength ( $R$ ) in dipole velocity ( $R_{\text{vel}}$ ) and dipole length ( $R_{\text{len}}$ ) forms were simulated into an ECD curve. All calculations were performed employing the Gaussian'09 program package (Gaussian Inc.).

The minimized structures for docking simulations were prepared using Autodock Tools package v1.5.4 (ADT, <http://mglttools.scripps.edu/>).<sup>14</sup> For metabolites, addition of Gasteiger charges and number of torsions were set, and nonpolar hydrogens were merged. The crystallographic structure of  $\alpha$ -glucosidase from yeast was obtained from the Protein Data Bank (RCSB; pdb code 3A4A). For the receptor all hydrogens (polar and nonpolar) and Kollman charges were added, and solvation parameters were assigned by default.

Molecular docking studies were achieved with AutoDock Vina v1.1.2.<sup>15</sup> First, a blind docking was performed in order to establish the common site of interaction of the metabolites with the  $\alpha$ -glucosidase. The search space for this preliminary docking was defined as a box size of 54  $\times$  68  $\times$  68 Å in the  $x$ ,  $y$ , and  $z$  dimensions, with a grid spacing of 1.0 Å and the macromolecule set as the center of the box. The default parameters of exhaustiveness and number of modes were not altered. Next, a refined docking was performed with a smaller box of searching space (30  $\times$  25  $\times$  25 Å and 1.0 Å of grid spacing), setting as the center of the grid box the lower state pose obtained from the blind docking. The conformational states from the docking simulations were analyzed using the AutoDockTools program, which also identified the H-bonds and van der Waals interactions between the catalytic site of  $\alpha$ -glucosidase and the ligand. The predicted docked complexes (protein–ligand) were those conformations showing the lowest binding energy. The estimated inhibition constant ( $K_i$ ) was calculated from the docking energy displayed by AutoDock Vina following the equation  $K_i = \exp(\Delta G \times 1000/RT)$ , where  $\Delta G$  is the docking energy,  $R$  is the universal constant of an ideal gas (1.987 19 cal K<sup>–1</sup> mol<sup>–1</sup>), and  $T$  is the temperature (298.15 K). Preparation of the figures was accomplished with the PyMOL visualization tool (PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4, Schrödinger, LLC)<sup>16</sup> and LigPlot<sup>+</sup>.<sup>17</sup>

**Assay for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors.** The fungal extract, fractions, compounds, and acarbose (positive control) were dissolved in MeOH. Aliquots of 0–40  $\mu$ L of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20  $\mu$ L of enzyme stock solution (0.4 units/mL in phosphate buffer solution 100 mM, pH 7). After incubation, 10  $\mu$ L of substrate (pNPG 5 mM) was added and further incubated for 30 min at 37 °C,<sup>18</sup> and the absorbances were determined. For the extract and fractions, the inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the blank (MeOH) according to the following equation:

$$\% \alpha\text{GHY} = \left(1 - \frac{A_{415t}}{A_{415c}}\right) \times 100\%$$

where %  $\alpha$ GHY is the percentage of inhibition,  $A_{415t}$  is the corrected absorbance of the extract, fractions, or compound under testing ( $A_{415 \text{ end}} - A_{415 \text{ initial}}$ ), and  $A_{415c}$  is the absorbance of the blank ( $A_{415 \text{ end blank}} - A_{415 \text{ initial blank}}$ ). The  $IC_{50}$  was calculated by regression analysis, using the following equation:

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

where  $A_{100}$  is the maximum inhibition,  $I$  is the inhibitor concentration,  $IC_{50}$  is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and  $s$  is the cooperative degree.<sup>19</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.jnatprod.6b00574](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00574).

1D and 2D NMR spectra of compounds 1–5, X-ray crystallographic data of 1, calculated DFT B3LYP/6-31+G(d) free energies, population and theoretical averaged rotatory strength values expressed in  $R_{(len)}$  for conformers of 7aR,8R,11aR and 7aS,8S,11aS enantiomers of 1, comparison of computed and experimental <sup>1</sup>H NMR data for 1 and 2 (S and R enantiomers), and inhibitory effect of 14 evaluated with  $\alpha$ GHY (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### ■ Corresponding Author

\*Phone (R. Mata): +52-555-622-5289. E-mail: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx).

### ■ Notes

The authors declare no competing financial interest.

<sup>‡</sup>Taken in part from the Ph.D. thesis of Manuel Rangel-Grimaldo.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT CB 219765, CONACyT INFRA 252226, and PAIP-UNAM 5000-9140. We thank R. del Carmen for his valuable technical assistance. M.R.-G. acknowledges a fellowship from CONACyT (234569) to pursue graduate studies. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system.

## ■ DEDICATION

Dedicated to Professor Phil Crews, of the University of California, Santa Cruz, for his pioneering work on bioactive natural products.

## ■ REFERENCES

- (1) Arenal, F.; Platas, G.; Peláez, F. *Mycotaxon* **2004**, *89*, 137–151.
- (2) Arenal, F.; Platas, G.; Peláez, F. *Fungal Divers.* **2005**, *20*, 1–15.
- (3) Clapp-Shapiro, W. H.; Burgess, B. W.; Giacobbe, R. A.; Harris, G. H.; Mandala, S.; Polishook, J.; Rattray, M.; Thornton, R. A.; Zink, D. L.; Cabello, A.; Diez, M. T.; Martin, I.; Pelaez, F. U.S. Patent 5,801,172 A, 1998.
- (4) Bugni, T. S.; Bernan, V. S.; Greenstein, M.; Janso, J. E.; Maiese, W. M.; Mayne, C. L.; Ireland, C. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2014–2017.
- (5) Mudur, S. V.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 500–506.
- (6) Leyte-Lugo, M.; Figueroa, M.; González, M.; del, C.; Glenn, A. E.; González-Andrade, M.; Mata, R. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 273–278.
- (7) Zhang, F.; Li, L.; Niu, S.; Si, Y.; Guo, L.; Jiang, X.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 230–237.
- (8) Overy, D. P.; Zidorn, C.; Petersen, B. O.; Duus, J. Ø.; Dalsgaard, P. W.; Larsen, T. O.; Phipps, R. K. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3225–3228.

(9) Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 643–660.

(10) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.

(11) Rudnitskaya, A.; Török, B.; Török, M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2010**, *38*, 261–265.

(12) Yamamoto, K.; Nakayama, A.; Yamamoto, Y.; Tabata, S. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3414–3420.

(13) Rivera-Chávez, J.; Figueroa, M.; González, M.; del, C.; Glenn, A. E.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 730–735.

(14) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.

(15) Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.

(16) Seeliger, D.; de Groot, B. L. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2010**, *24*, 417–422.

(17) Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. *Protein Eng., Des. Sel.* **1995**, *8*, 127–134.

(18) Rivera-Chávez, J.; González-Andrade, M.; González, M.; del, C.; Glenn, A. E.; Mata, R. *Phytochemistry* **2013**, *94*, 198–205.

(19) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000; p 416.

# $\alpha$ -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from *Malbranchea circinata*

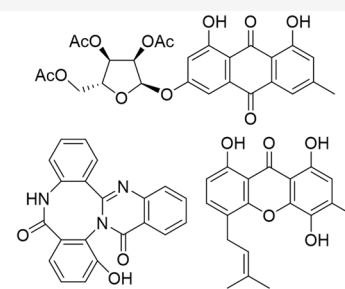
Manuel Rangel-Grimaldo,<sup>†,‡,§</sup> Martha L. Macías-Rubalcava,<sup>†,§</sup> Martin González-Andrade,<sup>§</sup> Huzefa Raja,<sup>||</sup> Mario Figueroa,<sup>†,||</sup> and Rachel Mata<sup>\*,†,||</sup>

<sup>†</sup>Facultad de Química, <sup>‡</sup>Instituto de Química, and <sup>§</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

<sup>||</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North Carolina 27402, United States

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** During a search for new  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from fungal sources, eight new secondary metabolites, including two anthranilic acid-derived peptides (1 and 2), four glycosylated anthraquinones (3–6), 4-isoprenylravenelin (7), and a dimer of 5,8-dihydroxy-4-methoxy- $\alpha$ -tetralone (8), along with four known compounds (9–12), were isolated from solid rice-based cultures of *Malbranchea circinata*. The structural elucidation of these metabolites was performed using 1D and 2D NMR techniques and DFT-calculated chemical shifts. Compounds 1–3, 9, and 10 showed inhibitory activity to yeast  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ GHY), with  $IC_{50}$  values ranging from 57.4 to 261.3  $\mu$ M ( $IC_{50}$  acarbose = 585.8  $\mu$ M). The effect of 10 (10.0 mg/kg) was corroborated *in vivo* using a sucrose tolerance test in normoglycemic mice. The most active compounds against PTP-1B were 8–10, with  $IC_{50}$  values from 10.9 to 15.3  $\mu$ M ( $IC_{50}$  ursolic acid = 27.8  $\mu$ M). Docking analysis of the active compounds into the crystal structures of  $\alpha$ GHY and PTP-1B predicted that all compounds bind to the catalytic domains of the enzymes. Together, these results showed that *M. circinata* is a potential source of antidiabetic drug leads.



The genus *Malbranchea* contains about 30 species, which are saprotrophic fungi isolated from decaying vegetation, soil, or animal dung worldwide.<sup>1</sup> The members of this genus produce an array of bioactive compounds including eremophilanes,<sup>2</sup> the malbrancheamides,<sup>2–4</sup> a unique family of indole terpenoid alkaloids with vasorelaxant and calmodulin inhibitor properties whose biosynthetic pathway was elegantly elucidated through complementary approaches;<sup>5</sup> pyrrole alkaloids and modified steroids with cytotoxic effects;<sup>6</sup> terpenoids with antifungal, phytotoxic, and cytotoxic activities;<sup>7–9</sup> and polyketides and peptides with antidiabetic properties.<sup>10,11</sup>

According to the International Federation of Diabetes, over the past decade the global prevalence of type-2 diabetes mellitus (T2DM) has nearly quadrupled since 1980, particularly in low- and middle-income countries.<sup>12</sup> In this scenario, it is essential to provide new therapeutic alternatives, including those arising from fungal sources. Hence, we previously reported that assay-guided fractionation of solid-substrate cultures of *Malbranchea flavorosea* led to the isolation of some polyketides and peptide-type compounds with *in vitro* and *in vivo*  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties.<sup>10,11</sup> Here, *Malbranchea circinata* Sigler & Carmichel (Myxotrichaceae) from the American Type Culture Collection (strain no. 34526) was selected for investigation because its rice-based culture

extract showed activity against  $\alpha$ -glucosidases and the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B). The latter is critical for insulin signaling due to its ability to dephosphorylate and inactivate the insulin receptor, and inhibition of PTP-1B is an attractive target to improve insulin sensitivity in different cell types.<sup>13–15</sup>  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors are currently used in the treatment of patients with T2DM since these agents delay the absorption of carbohydrates from the small intestine and lower the effect on postprandial blood glucose and insulin levels. In this work we describe the isolation and structure elucidation of two anthranilic acid derivatives (1 and 2), four glycosylated anthraquinones (3–6), a prenylated xanthone (7), and a dimer of 5,8-dihydroxy-4-methoxy- $\alpha$ -tetralone (8), along with four known compounds (9–12). All isolates were tested for their inhibitory properties against both  $\alpha$ -glucosidase and PTP-1B.

## RESULTS AND DISCUSSION

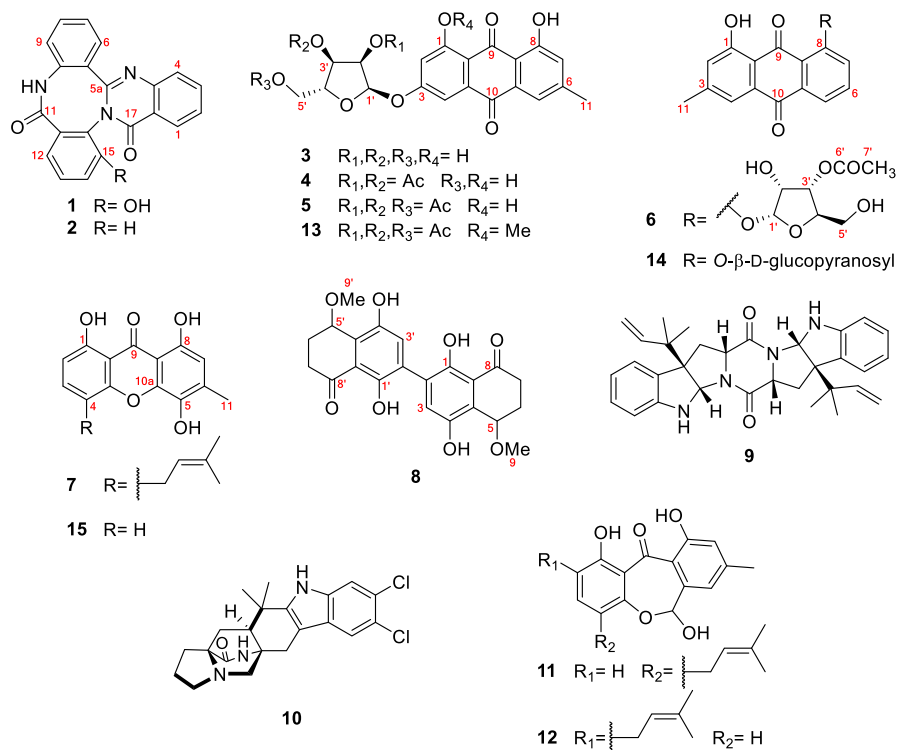
The defatted extract from moist rice cultures of *M. circinata* inhibited the activity of the  $\alpha$ -glucosidase from yeast ( $IC_{50}$  = 360.7  $\pm$  0.2  $\mu$ g/mL) and PTP-1B ( $IC_{50}$  = 5.3  $\pm$  0.3  $\mu$ g/mL).

**Special Issue:** Special Issue in Honor of Jon Clardy

**Received:** November 7, 2019

**Published:** January 3, 2020

Chart 1

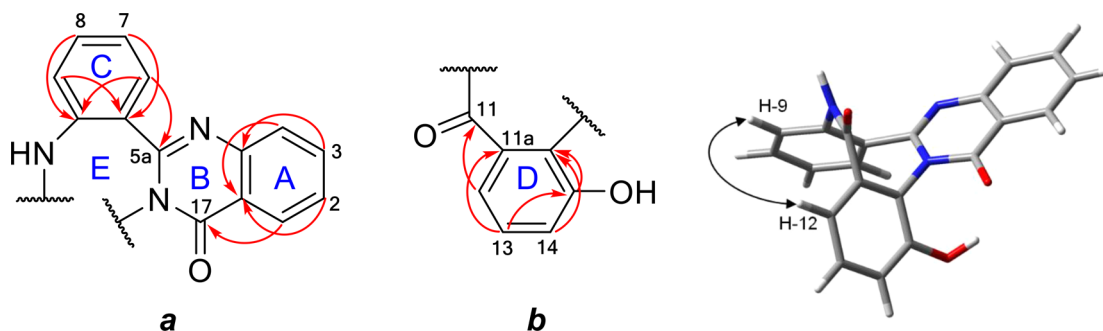
Table 1. <sup>1</sup>H (700 MHz) and <sup>13</sup>C (175 MHz) NMR Data of Compounds 1 and 2 in CD<sub>3</sub>OD

position	1				2			
	δ <sub>C</sub>	type	δ <sub>H</sub> , mult. (J in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H→ <sup>13</sup> C	δ <sub>C</sub>	type	δ <sub>H</sub> , mult. (J in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H→ <sup>13</sup> C
1	126.6	CH	8.31, dd (8.0, 1.5)	3,4,4a,17	126.6	CH	8.32, dd (8.0, 1.5)	3,4a,17
2	127.6	CH	7.65, ddd (8.0, 7.2, 1.5)	4,4a,17,17a	127.7	CH	7.67, ddd (8.0, 7.2, 1.1)	4,4a,17,17a
3	135.0	CH	7.93, ddd (7.6, 7.2, 1.5)	1,4a, 17a	135.1	CH	7.95, ddd (8.3, 7.2, 1.5)	1,4a
4	126.8	CH	7.8, dd (7.6, 1.5)	2,3,4a,17,17a	126.9	CH	7.81, dd (8.3, 1.1)	2,3,17a
4a	147.3	C			147.1	C		
5a	154.5	C			153.8	C		
5b	133.8	C			133.7	C		
6	128.5	CH	7.63, dd (7.6, 1.6)	5a,8,9a	129.0	CH	7.60, dd (7.6, 1.5)	5a,8,9a
7	127.6	CH	7.40, ddd (8.0, 7.6, 1.1)	5b,9	127.7	CH	7.39, ddd (8.0, 7.6, 1.1)	5b,9
8	131.1	CH	7.47, ddd (8.0, 7.6, 1.6)	6,9a	131.1	CH	7.47, ddd (8.0, 7.6, 1.5)	6,9a
9	126.1	CH	7.18, dd (8.0, 1.1)	5a,5b,7	125.9	CH	7.20, dd (8.0, 1.1)	5a,5b,7
9a	136.3	C			136.3	C		
11	170.8	C			170.5	C		
11a	134.2	C			133.3	C		
12	116.9	CH	6.90, dd (7.6, 1.3)	11, 11a	127.3	CH	7.48–7.50, m	11,11a,14
13	130.9	CH	7.29, dd (8.3, 7.6)	11,11a,12,15,15a	129.8	CH	7.48–7.50, m	11a,14
14	117.8	CH	6.92, dd (8.3, 1.3)	12,15,15a	130.8	CH	7.48–7.50, m	12
15	152.6	C			128.2	CH	7.33, m	13
15a	121.7	C			134.1	C		
17	161.0	C			161.7	C		
17a	120.5	C			120.6	C		

Extensive fractionation of the active organic extract led to the isolation of eight new natural products (**1–8**), together with the known compounds amaumine (**9**),<sup>16,17</sup> malbrancheamide (**10**),<sup>3</sup> and the epimeric mixture of arugosin N (**11**) and its C-8 prenyl derivative, 1,6,10-trihydroxy-8-methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)dibenz[*b,e*]oxepin-11(6*H*)-one (**12**)<sup>18</sup> (Supporting Information, S1–S51).

Compound **1** was isolated as colorless crystals. Its molecular formula, C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, established from the HRESIMS,

indicated an index of hydrogen deficiency (IHD) of 17. The IR spectrum revealed absorptions for amide and aromatic groups (2927, 1684, 1591, and 1566 cm<sup>-1</sup>). Analysis of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 1 and Figures S1 and S2) indicated the presence of 18 aromatic carbons (11 protonated and seven nonprotonated, one of which was oxygenated), two amide carbonyls, and one imine group. Based on COSY spectra (Figure S5), the 11 protons were part of two 1,2-disubstituted and one 1,2,3-trisubstituted benzene ring. HMBC correlations



**Figure 1.** Selected key HMBC ( $\rightarrow$ ) correlations of substructures *a* and *b* and NOE ( $\leftrightarrow$ ) correlation between H-9 and H-12 of **1**.

**Table 2.** NMR Data of Compounds 3–5

position	<b>3<sup>a</sup></b>				<b>4<sup>b,c</sup></b>			<b>5<sup>a,c</sup></b>		
	$\delta_C^d$	type	$\delta_{H^1}$ , mult. (J in Hz) <sup>c</sup>	HMBC <sup>d</sup> <sup>1</sup> H $\rightarrow$ <sup>13</sup> C	$\delta_C$	$\delta_{H^1}$ , mult. (J in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H $\rightarrow$ <sup>13</sup> C	$\delta_C$	$\delta_{H^1}$ , mult. (J in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H $\rightarrow$ <sup>13</sup> C
1	165.0	C			164.8			165.0		
2	109.1	CH	6.97, d (2.5)	1,4	109.8	6.90, d (2.5)	1,4,9a	109.9	6.91, d (2.5)	1,4,9a
3	164.7	C			163.3			163.3		
4	108.2	CH	7.55, d (2.5)	3,4a,10	109.8	7.47, d (2.5)	3,4a,10	110.1	7.48, d (2.5)	3,4a,10
4a	135.0	C			135.2			135.4		
5	120.8	CH	7.67, dq (1.7, 0.7)	7,8a,9,11	121.4	7.62, dq (1.7, 0.9)	7,8a,9,10,11	121.6	7.64, dq (1.7, 0.7)	7,8a,10,11
6	148.8	C			148.7			148.9		
7	124.1	CH	7.13, dq (1.7, 0.7)	5,8,8a,9,11	124.6	7.08, dq (1.7, 0.9)	5,8,8a,11	124.8	7.10, dq (1.7, 0.7)	5,8,8a,9,11
8	161.8	C			162.6			162.8		
8a	113.4	C			113.6			113.8		
9	190.1	C			190.9			191.2		
9a	110.8	C			111.2			111.5		
10	182.4	C			181.8			182.0		
10a	132.9	C			133.1			133.3		
11	21.7	CH <sub>3</sub>	2.48, s		22.2	2.45, s		22.3	2.46, s	
1'	101.8	CH	5.88, d (4.5)	3,3',4'	98.3	6.07, d (4.5)	3,3',4'	98.3	6.04, d (4.5)	3,3',4'
2'	74.7	CH	4.38, dd (6.9, 4.5)	4'	71.2	5.20, dd (7.0, 4.5)	4',2'-COCH <sub>3</sub>	71.0	5.18, dd (7.0, 4.5)	4',2'-COCH <sub>3</sub>
3'	70.5	CH	4.27, m	1',5'	70.0	5.42, m	1',5',3'-COCH <sub>3</sub>	70.0	5.36, m	1',5',3'-COCH <sub>3</sub>
4'	83.9	CH	4.28, m	2',5'	84.2	4.32, m	2',5'	81.4	4.45, m	2',5'
5'	62.7	CH <sub>2</sub>	3.90, m	3',4'	62.0	3.89, dd (12.2, 3.2)	3',4'	63.4	4.34, dd (12.3, 3.2)	3',5'-COCH <sub>3</sub>
			3.81, m	3',4'		3.85, dd (12.2, 3.2)	3',4'		4.26, dd (12.3, 3.2)	3',5'-COCH <sub>3</sub>
2'-COCH <sub>3</sub>					169.9			170.0		
2'-COCH <sub>3</sub>					20.5	2.16, s	2'-COCH <sub>3</sub>	20.9	2.15, s	2'-COCH <sub>3</sub>
3'-COCH <sub>3</sub>					170.6			170.5		
3'-COCH <sub>3</sub>					20.8	2.20, s	3'-COCH <sub>3</sub>	21.0	2.19, s	3'-COCH <sub>3</sub>
5'-COCH <sub>3</sub>								170.6		
5'-COCH <sub>3</sub>								20.6	2.13, s	5'-COCH <sub>3</sub>
1-OH			12.29, s	2,9a		12.23, s	2,9a		12.26, s	2,9a
9-OH			12.09, s	7,8a		12.05, s	7,8a		12.07, s	7,8a

<sup>a</sup><sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz). <sup>b</sup><sup>1</sup>H (700 MHz) and <sup>13</sup>C (175 MHz). <sup>c</sup>CDCl<sub>3</sub>. <sup>d</sup>CDCl<sub>3</sub> + drops of CD<sub>3</sub>OD.

(Figure 1 and Figure S4) and NMR chemical shifts (Table 1) suggested a quinazolinone moiety attached to an aromatic ring (ring C) through the imine carbon (substructure *a*), which is present in a few anthranilic acid alkaloids including sclerotigenin,<sup>19</sup> circumdatin F,<sup>20</sup> asperlicins,<sup>21,22</sup> and benzo-

malvins.<sup>23–25</sup> The protons of ring C (H-6–H-9) showed the following HMBC correlations (Figure 1): H-6 to C-5a, C-8, and C-9a; H-7 to C-5b and C-9; H-8 to C-6 and C-9a; and H-9 to C-7, C-5a, and C-5b. On the other hand, correlations from H-12 to C-11, C-11a, and C-15; H-13 to C-11, C-12, C-15,

and C-15a; and H-14 to C-12 and C-15, as well as the spin system H-12–H-1, typical of a 1,2,3-trisubstituted aromatic ring, supported a 3-hydroxyanthranilic acid residue (sub-structure *b*). Thereby, the extra ring required to fulfill the unsaturation number required by the molecular formula was identified connecting fragments *a* and *b* through C-11 and N-10 and between C-15a and N-16. A NOESY correlation between H-9 and H-12 (distance of 4.3 Å) supported these joining points due to the bending of ring E as observed in the most stable conformation of compound **1** (Figures 1 and S78). Altogether, these data suggest that **1** is a tripeptide formed by two anthranilic acid units and one 3-hydroxyanthranilic acid unit.

Compound **2** was isolated as colorless crystals. Its molecular formula was deduced as C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> based on the molecular ion peak in the HRESIMS (IHD = 17). Detailed analysis of the 1D and 2D NMR data (Table 1), in particular of the HMBC correlations, indicated that this compound was closely related to **1**: the key differences were observed in ring D, which was disubstituted in compound **2**. Thus, the 1,2,3-trisubstituted benzene ring observed in **1** (protons H-12 to H-14) was replaced by a 1,2-disubstituted aromatic system in **2** (protons H-12 to H-15) (Table 1). Furthermore, a difference of 16 Da and the diamagnetically shifted signal of C-15 from  $\delta_C$  152.6 in **1** to  $\delta_C$  128.2 in **2** suggested that **2** lacks the phenolic group at C-15. Thus, compound **2** was proposed as the 15-deoxy derivative of **1**.

In order to provide further evidence for the NMR structural assignment of **1** and **2**, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts were calculated and compared with the experimental data. Basically, the protocol involves a conformational search using molecular mechanics, geometry optimization using density functional theory (DFT) with M06-2X/6-31+G(d), and chemical shift calculations using the GIAO method with the B3LYP/6-311+G(2d,p) level of theory.<sup>26,27</sup> Comparisons of computed and experimental NMR chemical shifts of **1** and **2** gave a mean absolute error (MAE) lower than 0.11 ppm for <sup>1</sup>H and lower than 2.0 ppm for <sup>13</sup>C (Tables S3 and S4).

There is no precedent in nature of tripeptides like **1** and **2**. However, it was reported that heating of anthranilic acid with phosphorus pentoxide in refluxing xylene<sup>28</sup> or polyphosphoric acid in an argon current<sup>29</sup> furnished compound **2**. Its UV profile ( $\lambda_{\max}$  280 and 306 nm)<sup>28</sup> was similar to those of **1** and **2** ( $\lambda_{\max}$  280, 306, and 320 nm); however, there are insufficient NMR data available for comparison purposes and we could not duplicate the synthesis of **2**.

Compounds **3–5** were isolated as dark orange glassy solids; their molecular formulas were determined as C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>, C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, and C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub> by HRESIMS (IHD = 12, 14, and 15, respectively). Their NMR spectra (Table 2, Figures S15–S35) were similar to those of 3-O-( $\alpha$ -D-ribofuranosyl)-questin (**13**)<sup>30</sup> previously isolated from the endophytic fungus *Eurotium rubrum*. In the case of **3**, the signals due to a methoxy group ( $\delta_H$  3.97, s, OMe-12) in **13** were replaced by resonances for a chelated hydroxy group ( $\delta_H$  12.29, s, OH-1), which was also supported by the difference of 14 Da in their molecular weight. In addition, the <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3** showed signals for a second chelated phenolic hydroxy proton at  $\delta_H$  12.09 (OH-9) and for an  $\alpha$ -D-ribofuranosyl unit (Table 2) as in compound **13**. Finally, the HMBC correlation of the anomeric proton at  $\delta_H$  5.88 (d, *J* = 4.5 Hz, H-1') with the signal at  $\delta_C$  164.7 supported the *O*- $\alpha$ -glycosidic linkage to C-3. Acid hydrolysis of **3** afforded ribose, which was identified by TLC

coelution with an authentic sample. The negative optical rotation sign of the monosaccharide was consistent with *D*-ribose.

Based on its NMR data (Table 2 and Figures S15–S35), compounds **4** and **5** showed the same aglycone as **3**; however their ribofuranosyl unit was di- and triacetylated, respectively. Thus, the <sup>13</sup>C and HSQC spectra **4** revealed the presence of two additional carbonyl groups at  $\delta_C$  169.9 (C-6') and  $\delta_C$  170.6 (C-8') and two methyl groups at  $\delta_C$  20.5 (C-7') and  $\delta_C$  20.8 (C-9'). The HMBC connectivities of H-2' to C-4' and 2'-COCH<sub>3</sub>, 2'-COCH<sub>3</sub> to 2'-COCH<sub>3</sub>, H-3' to C-1', C-5', and 3'-COCH<sub>3</sub>, and 3'-COCH<sub>3</sub> to 3'-COCH<sub>3</sub> (Table 2) confirmed the position of the acetyl groups at C-2' and C-3'. The NMR spectra of **5** showed signals for methyl ( $\delta_C$  20.6, 4'-COCH<sub>3</sub>) and a third carbonyl ( $\delta_C$  170.6, 4'-COCH<sub>3</sub>) group, and the HMBC correlations from H-5' to C-4' and 4'-COCH<sub>3</sub> and from 4'-COCH<sub>3</sub> to 4'-COCH<sub>3</sub> indicated that this acyl unit was at C-5' of the carbohydrate moiety. The *D*-monosaccharide configuration of **4** and **5** was assumed on biogenetic grounds.

Compound **6** was isolated as orange glassy solid. Its molecular formula was determined by HRESIMS as C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> (IHD = 13). The NMR data (Table 3 and Figures

**Table 3.** <sup>1</sup>H (700 MHz) and <sup>13</sup>C (175 MHz) NMR Data of Compound **6** in CDCl<sub>3</sub>

position	$\delta_C$	type	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H→ <sup>13</sup> C
1	162.9	C		
2	124.7	CH	7.14, dq (1.8, 0.9)	1,4,9a,11
3	148.4	C		
4	120.6	CH	7.65, dq (1.8, 0.9)	2,9a,10,11
4a	132.4	C		
5	122.0	CH	8.08, dd (7.7, 1.2)	6,7,10
6	136.0	CH	7.78, dd (8.0, 7.7)	5,8,10a
7	122.4	CH	7.70, dd (8.0, 1.2)	5,6,8,8a
8	158.1	C		
8a	121.5	C		
9	189.0	C		
9a	114.9	C		
10	182.4	C		
10a	135.5	C		
11	22.1	CH <sub>3</sub>	2.48, s	2,3,4
1'	102.9	CH	5.85, d (4.4)	8,3',4'
2'	72.0	CH	4.56, m	4'
3'	71.4	CH	5.29, dd (7.0, 2.1)	1',4',5',6'
4'	85.4	CH	4.38, m	2'
5'	62.6	CH <sub>2</sub>	3.91, m	3'
6'	170.8	C		
7'	21.0	CH <sub>3</sub>	2.22, s	6'
1-OH			12.84, s	1,2,3,9a

S36–S42) for this compound were nearly identical to those of known chrysophanein (**14**) (Table 3).<sup>31</sup> However, compound **6** possesses a 3'-acetyl- $\alpha$ -D-ribofuranosyl moiety ( $\delta_H$  5.85, d, *J* = 4.4 Hz, H-1'; 4.56, m, H-2'; 5.29, dd, *J* = 7.0, 2.1 Hz, H-3'; 4.38, m, H-4'; 3.91, m, H-5'; 2.22, s, H<sub>3</sub>-7') rather than the  $\beta$ -D-glucopyranosyl group at C-8. The placement of the ribofuranosyl moiety at C-8 through an *O*-glycosidic linkage was based on the HMBC correlations of the  $\alpha$ -anomeric proton H-1' with C-8 ( $\delta_C$  158.1). On the other hand, HMBC connectivities from H-3' and H-7' to C-6' indicated the position of the acetyl groups at C-3' (Table 3). Therefore,

compound **6** was named chrysophanol *O*-3'-acetyl- $\alpha$ -D-ribofuranoside.

Compound **7** was isolated as a yellow solid. Its molecular formula was deduced as C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, based on its molecular ion peak in the HRESIMS (IHD = 11). The 1D and 2D NMR data (Table 4 and Figures S43–S49) were consistent with those of

**Table 4.** <sup>1</sup>H (700 MHz) and <sup>13</sup>C (175 MHz) NMR Data of Compound **7** in CDCl<sub>3</sub>

position	$\delta_C$	type	$\delta_H$ , mult. (J in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H→ <sup>13</sup> C
1	159.9	C		
2	110.7	CH	6.73, d (8.4)	1,4,9,9a
3	137.7	CH	7.48, d (8.4)	1, 1',4a,9a
4	119.0	C		
4a	153.0	C		
5	134.1	C		
6	135.4	C		
7	111.7	CH	6.64, s	5,8,8a,9,10a
8	153.1	C		
8a	105.8	C		
9	185.9	C		
9a	107.6	C		
10a	142.3	C		
11	16.7	CH <sub>3</sub>	2.41, s	6,7
1'	28.5	CH <sub>2</sub>	3.53, dd (6.8, 1.2)	3,3',4,4',4a,5'
2'	121.9	CH	5.34, m	4,4',5'
3'	133.5	C		
4'	17.9	CH <sub>3</sub>	1.83, s	2',3',5'
5'	25.6	CH <sub>3</sub>	1.81, s	2',3',4'
1-OH			11.85, s	1,2,9a
5-OH			5.15, s	5,6
8-OH			11.03, s	7,8,8a

the 1,4,8-trihydroxy-3-methylxanthone ravenelin (**15**),<sup>32</sup> except for the following key changes: the presence of signals for an isoprene unit ( $\delta_C/\delta_H$  C-1'/H-1', 28.5/3.53; C-2'/H-2', 121.9/5.34; C-3', 133.5; C-4'/H<sub>3</sub>-4', 17.9/1.83; and C-5'/H<sub>3</sub>-5', 25.6/1.81) and two aromatic protons ( $\delta_C/\delta_H$  C-2/H-2, 110.7/6.73, and C-3/H-3, 137.7/7.48) as a pair of *ortho*-coupled doublets. The position of the isoprene unit at C-4 ( $\delta_C$  119.0) was confirmed by the key HMBC correlations from H-1' to C-3, C-4, and C-4a ( $\delta_C$  153.0) and from H-2' to C-4. Moreover, the HMBC correlation from 1-OH to C-1, C-2, and C-9a supported this proposal. On the basis of these considerations, compound **7** was given the trivial name 4-isoprenylravenelin.

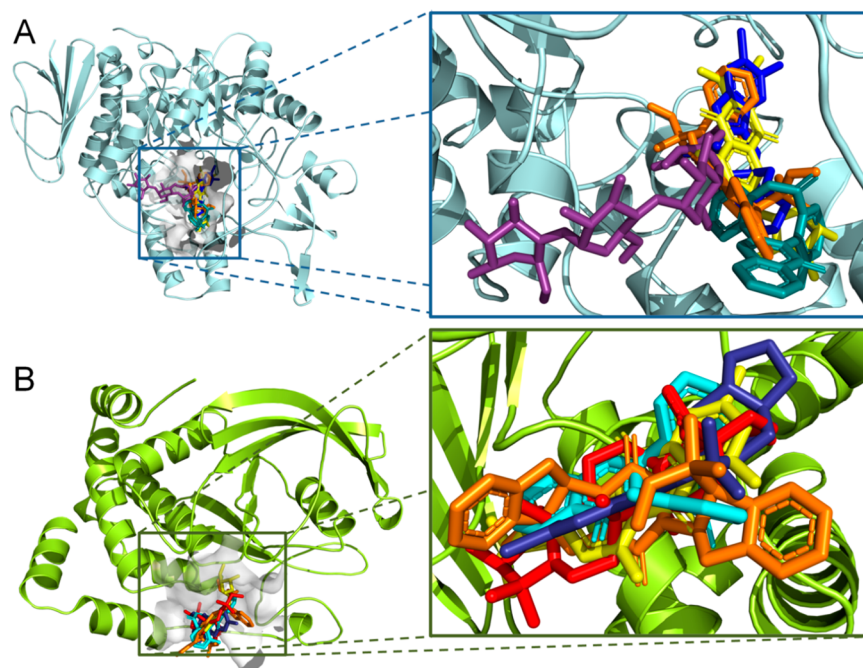
Compound **8** (yellow solid) was isolated as a racemic mixture since it was optically inactive, and the CD showed no Cotton effect. The molecular formula was established as C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub> according to its HRESIMS peak (IHD = 12). Detailed analysis of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 5 and Figures S50–S56) indicated that this compound could be a homodimer related to 5,8-dihydroxy-4-methoxy- $\alpha$ -tetralone.<sup>33</sup> The HMBC correlations (Table 5) from H-3 and H-3' to C-1, C-2, C-2', and C-4, and C-1', C-2, C-2', and C-4', respectively; from H<sub>3</sub>-9 and H<sub>3</sub>-9' to C-5 and C-5', respectively; from H-5 and H-5' to C-4a, C-7, and C-9, and C-4a', C-7', and C-9', respectively; from H-6 and H-6' to C-4a, C-5, C-7, and C-8, and C-4a', C-5', C-7', and C-8', respectively; and from H-7 and H-7' to C-5, C-6, and C-8, and C-5', C-6', and C-8', respectively, supported this affirmation. Furthermore, the HMBC connectivities between the chelated phenolic OH-1 and OH-1' to C-1, C-2, and C-8a, and C-1', C-2', and C-8a',

**Table 5.** <sup>1</sup>H (700 MHz) and <sup>13</sup>C (175 MHz) NMR Data of Compound **8** in CDCl<sub>3</sub>

position	$\delta_C$	type	$\delta_H$ , mult. (J in Hz)	HMBC <sup>1</sup> H→ <sup>13</sup> C
1	154.5	C		
2	126.4	C		
3	128.4	CH	7.15, s	1,2,2',4
4	147.0	C		
4a	124.4	C		
5	76.4	CH	4.96, dd (10.5, 4.9)	4a,7,9
6	26.5	CH <sub>2</sub>	2.51, dddd (13.3, 10.5, 4.9, 1.0) 2.21, m	4a,5,7,8 4a,5,7
7	35.5	CH <sub>2</sub>	2.89, ddd (17.5, 12.6, 4.2) 2.62, dddd (17.5, 12.6, 4.2, 1.0)	5,6,8 5,6,8
8	203.2	C		
8a	115.2	C		
9	55.5	CH <sub>3</sub>	3.58, s	5
1'	154.5	C		
2'	126.4	C		
3'	128.4	CH	7.15, s	1',2,2',4'
4'	147.0	C		
4a'	124.4	C		
5'	76.4	CH	4.96, dd (10.5, 4.9)	4a',7',9'
6'	26.5	CH <sub>2</sub>	2.51, ddd (13.3, 10.5, 4.9, 1.0) 2.21, m	4a',5',7',8' 4a',5',7'
7'	35.5	CH <sub>2</sub>	2.89, ddd (17.5, 12.6, 4.2) 2.62, ddd (17.5, 12.6, 4.2, 1.0)	5',6',8' 5',6',8'
8'	203.2	C		
8a'	115.1	C		
9'	55.5	CH <sub>3</sub>	3.58, s	5'
1-OH			12.55, s	1,2,8a
4-OH			7.88, s	3,4
1'-OH			12.54, s	1',2',8a'
4'-OH			7.86, s	3',4'

respectively; and the nonchelated phenolic OH-4 and OH-4' to C-3 and C-4, and C-3' and C-4', respectively, confirmed that the two identical units were linked throughout C-2–C-2'. The conformation of the cyclohexenone ring was determined as a half-chair form on the basis of the NOESY correlation between H-5 and H-5' with one of the methylene protons of H-7 and H-7', respectively; the *J* values of H-7 and H-7' (Table 5) suggested a  $\beta$ - and  $\alpha$ -quasi-axial orientation with respect to the cyclohexenone ring. Interestingly, the chelated and nonchelated phenolic OH groups were not equivalent, probably due to a rotational barrier or the presence of atropoisomerism. Previously, related monomers of **8** were isolated as enantiomeric mixtures from *Juglans mandshurica* Maxim. var. *sieboldiana* Makino (Juglandaceae).<sup>33</sup> In that work, both enantiomers were separated by chiral HPLC, and CD and OR values were obtained. However, the amount of **8** obtained in this work (0.8 mg) precluded separation by this means.

All compounds were evaluated for their inhibitory effects against both  $\alpha$ -glucosidase and PTP-1B. Compounds **1–3**, **9**, and **10** showed inhibitory activity against yeast  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ GHY), with IC<sub>50</sub> values of 116.8 ± 7.2, 144.5 ± 4.9, 261.3 ± 7.8, 57.4 ± 0.2, and 71.3 ± 0.7  $\mu$ M, respectively (positive control acarbose, IC<sub>50</sub> = 585.8 ± 0.1  $\mu$ M). The most active compounds, **9** and **10**, were also evaluated against intestinal rat  $\alpha$ -glucosidase enzymes. The calculated IC<sub>50</sub> values were 742.6 ± 7.3 and 458.7 ± 6.6  $\mu$ M, respectively, vs acarbose (IC<sub>50</sub>



**Figure 2.** Putative binding mode for **1** (cyan sticks), **3** (yellow sticks), **9** (orange sticks), **10** (blue sticks), acarbose (purple sticks), and ursolic acid (red sticks) with (A)  $\alpha$ GHY (skyblue cartoon, pdb code 3A4A) and (B) PTP-1B (green cartoon, pdb code 1SUG).

$151.1 \pm 6.1 \mu\text{M}$ ). The effect of **10** was corroborated *in vivo* using a sucrose tolerance in normoglycemic mice at doses of 3.2 and 10.0 mg/kg. As can be seen in Figure S60, **10** at the dose of 10 mg/kg decreases the postprandial peak in a similar way to that of acarbose (positive control). In order to predict the binding manner of the inhibitors with  $\alpha$ GHY, docking analyses were carried out using the crystallized structure of  $\alpha$ GHY (pdb code 3A4A).<sup>34,35</sup> The docking protocol was validated reproducing the binding mode of acarbose at the catalytic domain,<sup>36</sup> and the results predicted that **1–3**, **9**, and **10** could bind to the catalytic domain (Figure 2 and Figures S61–S65).

Likewise, **1–10** showed moderate inhibitory activity against PTP-1B (Table S5). The most active compounds were **7–10**, with  $\text{IC}_{50}$  values of  $13.9 \pm 1.3$ ,  $10.9 \pm 0.6$ ,  $15.3 \pm 0.4$ , and  $14.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$ , respectively (positive control ursolic acid,  $\text{IC}_{50} = 27.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ). In the same fashion, docking analyses of **7–10** using the crystallized structure of PTP-1B (pdb code 1SUG),<sup>37</sup> validated with ursolic acid,<sup>38</sup> indicated that these compounds bind into the catalytic site (Figure 2 and Figures S66–S74).

In summary, *M. circinata* is a new source of  $\alpha$ -glucosidase and PTP-1B inhibitors that could be useful for the development of antidiabetic drugs. Specifically, malbrancheamide (**10**) possesses vasodilating and antidiabetic effects and holds promise for the design of novel therapies for metabolic syndrome, a cluster of related conditions that increases the risk for developing cardiovascular disease and T2DM.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** IR spectra were recorded using a Bruker Tensor 27 FT-IR spectrophotometer (Bruker Corp., Billerica, MA, USA). Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a PerkinElmer model 343 polarimeter at 20 °C (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD with TCI CryoProbe 700 H-C spectrometer at 700 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 175 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), using tetramethylsilane as an internal standard. High-resolution mass

spectra (HRMS) were acquired with a JEOL AccuTOF-DART JMS-T100LC (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) spectrometer in positive mode. Flash chromatography was accomplished on a CombiFlash Rf+ Lumen system (Teledyne Technologies, Inc., Lincoln, NE, USA) using RediSep Rf gold silica gel columns (Teledyne) and eluting with a gradient of *n*-hexane,  $\text{CHCl}_3$ , and MeOH. Analytical and preparative HPLC separations were conducted on Gemini  $\text{C}_{18}$  columns (5  $\mu\text{m}$ , 110 Å, 250 × 4.6 mm i.d. and 5  $\mu\text{m}$ , 110 Å, 250 × 21.2 mm i.d., respectively; Phenomenex, Torrance, CA, USA) in a Waters HPLC system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a 2535 quaternary pump, a 2707 autosampler, and the 2998 PDA and 2424 ELSD detectors. Data management and acquisition were performed with the Empower 3 software (Waters). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 (70–230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) or Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Thin-layer chromatographic (TLC) analyses were performed on silica gel 60  $\text{F}_{254}$  plates (Merck), and visualization of the plates was carried out using a  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$  (10%) solution in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Reagent-grade *n*-hexane,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and MeOH, HPLC-grade MeCN, and  $\text{H}_2\text{O}$  were purchased from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA).

**Fungal Strain and Identification.** The fungal strain *Malbranchea circinata* Sigler & Carmichael (type strain ATCC 34526)<sup>39</sup> was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). In order to place this fungus into a phylogenetic context and since the type strain was deposited over 40 years ago in the ATCC, we sequenced ATCC 34526 for the ITS rDNA (ITS1, 5.8S and ITS2), as well as the partial 28S rDNA, using primer combinations ITS1F and ITS4<sup>40,41</sup> and LROR and LR6<sup>42,43</sup> using methods outlined previously (Supporting Information).<sup>44</sup> The sequence data are deposited in GenBank with accession numbers ITS: MN627784, MN627785; LSU: MN627782, MN627783.

**Fermentation, Extraction, and Isolation.** *M. circinata* ATCC 34526 was cultivated on potato dextrose agar plates. Seed cultures of the fungus were prepared using agar plugs (0.5  $\text{cm}^3$ ), which were inoculated in potato-dextrose broth (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) medium and incubated at room temperature for 10 days at 100 rpm. Next, *M. circinata* was grown in six 2 L Fernbach flasks containing rice medium (200 g and 400 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  each). After incubation for 41 days, the cultures were extracted exhaustively with 700 mL of 1:1  $\text{CHCl}_3$ –MeOH. The mixture was shaken for 3 h in a reciprocating



shaker and filtered; then equal volumes of H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub> were added to the filtrate to a total volume of 1 L. After shaking, the mixture was transferred into a separatory funnel and the organic layer was drawn off and evaporated to dryness; the resulting residue was partitioned in a separatory funnel between 180 mL of 1:1 MeOH–MeCN and 180 mL of *n*-hexane, and then the bottom layer was collected and evaporated to dryness. The defatted extract (2.86 g) was dissolved in a mixture of CHCl<sub>3</sub>–MeOH, adsorbed onto a minimal amount of Celite, and fractionated via flash chromatography on a 70 g silica gel column, using a gradient solvent system of *n*-hexane–CHCl<sub>3</sub>–MeOH at a flow rate of 40 mL min<sup>-1</sup> and 35.0 column volumes (CVs) over 109.4 min. Fractions were collected every 23 mL and pooled according to UV and ELSD profiles to obtain 14 fractions (F1–F14).

F1 (121.4 mg) was subjected to silica gel CC eluting with *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75:25 → 0:100) to afford eight fractions (F1<sub>I</sub>–F1<sub>VIII</sub>). From fraction F1<sub>II</sub> (eluted with 75:25 *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 13.9 mg of **6** was obtained. Fraction F1<sub>V</sub> (eluted with 65:35 *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) yielded 11.8 mg of the tautomeric mixture of **11** and **12**. F2 (248.6 mg) was first subjected to flash chromatography on a 12 g silica gel column using a gradient solvent system of *n*-hexane–CHCl<sub>3</sub>–MeOH at a flow rate 30 mL min<sup>-1</sup> and 54.0 CVs over 30.2 min, to yield seven fractions (F2<sub>I</sub>–F2<sub>VII</sub>). F2<sub>IV</sub> (146.6 mg) was further purified by preparative RP-HPLC using as mobile phase 65:35 MeCN–H<sub>2</sub>O [0.1% formic acid (FA)] and increasing linearly to 100% MeCN over 15 min, at a flow rate of 21.24 mL min<sup>-1</sup>. This procedure afforded 15.7 mg of **9** (*t*<sub>R</sub> = 8.2 min). F3 (159.1 mg) was purified by silica gel CC with a gradient of *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (40:60 → 0:100 → 85:15) to afford six fractions (F3<sub>I</sub>–F3<sub>VI</sub>). F3<sub>III</sub> eluted with 25:75 *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> afforded 23.7 mg of **5**. F5 (86.9 mg) was purified by silica gel CC with a gradient of *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (30:70 → 0:100 → 70:30) to afford four fractions (F5<sub>I</sub>–F5<sub>IV</sub>). F5<sub>II</sub> eluted with 20:80 *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> afforded 3.7 mg of **4**. F7 (265.7 mg) was fractionated by flash chromatography on a 12 g silica gel column eluted with a gradient of *n*-hexane–CHCl<sub>3</sub>–MeOH at a 30 mL min<sup>-1</sup> flow rate and 60.3 CVs over 30.2 min, to yield three major fractions (F7<sub>I</sub>–F7<sub>III</sub>). F7<sub>II</sub> (179.4 mg) was purified by preparative RP-HPLC using a gradient of 75:25 MeCN–H<sub>2</sub>O (0.1% FA) and increasing linearly to 100% MeCN in 15 min, at a flow rate of 21.24 mL min<sup>-1</sup>, to obtain 15.9 mg of **10** (*t*<sub>R</sub> = 5.3 min) and 2.0 mg of **2** (*t*<sub>R</sub> = 6.5 min). F8 (215.7 mg) was subject to silica gel CC with a gradient of *n*-hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (20:80 → 0:100 → 70:30). This process yielded 10 fractions (F8<sub>I</sub>–F8<sub>X</sub>). F8<sub>VI</sub> (51.7 mg) was further fractionated via Sephadex LH-20 eluted with 3:7 acetone–MeOH to afford six fractions (F8<sub>VI-A</sub>–F8<sub>VI-F</sub>). F8<sub>VI-B</sub> (7.1 mg) and F8<sub>VI-D</sub> (5.9 mg) were further purified by preparative TLC using 98:2 CHCl<sub>3</sub>–MeOH and 97:3:0.1 CHCl<sub>3</sub>–MeOH–FA as mobile phases, to obtain 1.2 mg of **8** and 1.6 mg of **7**, respectively. Finally, F9 (72.3 mg) was purified by preparative RP-HPLC using a gradient of 70:30 MeCN–H<sub>2</sub>O (0.1% FA) and increasing linearly to MeCN in 12 min, at a flow rate of 21.24 mL min<sup>-1</sup>, to obtain 1.2 mg of **1** (*t*<sub>R</sub> = 5.2 min) and 3.4 mg of **3** (*t*<sub>R</sub> = 6.8 min).

**Compound 1:** white crystalline solid; mp 287 °C; HPLC-UV [(MeCN in H<sub>2</sub>O + 0.1% FA)] λ<sub>max</sub> 280, 306, 320 nm; FTIR ν<sub>max</sub> 2927, 1684, 1591 1566 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 1; HRESIMS *m/z* 356.10324 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 356.10352).

**Compound 2:** white solid; mp 282 °C; HPLC-UV [(MeCN in H<sub>2</sub>O + 0.1% FA)] λ<sub>max</sub> 280, 306, 320 nm; FTIR ν<sub>max</sub> 2927, 1684, 1591 1566 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 1; HRESIMS *m/z* 340.10942 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 340.10860).

**Compound 3:** orange glassy solid; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 268 (3.66), 225 (3.91) nm; FTIR ν<sub>max</sub> 3330, 2954, 2921, 1628, 1593, 1545 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 2; HRESIMS *m/z* 403.10315 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> 403.10291).

**Compound 4:** orange glassy solid; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 270 (3.06), 223 (3.22) nm; FTIR ν<sub>max</sub> 3564, 1741, 1630, 1215 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 2; HRESIMS *m/z* 487.12352 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>11</sub> 487.12404).

**Compound 5:** dark orange glassy solid; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +209.1 (*c* 0.09, CHCl<sub>3</sub>); FTIR ν<sub>max</sub> 3560, 1745, 1677, 1223 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 2; HRESIMS *m/z* 529.13605 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>O<sub>12</sub> 529.13460).

**Chrysophanol O-3'-acetyl-α-D-ribofuranoside (6):** orange glassy solid; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 268 (4.43), 344 (3.99), 405 (3.38) nm; FTIR ν<sub>max</sub> 3450, 1660, 1632, 1582, 1485, 1250, 1226, 1190 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 3; HRESIMS *m/z* 429.11742 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>O<sub>9</sub> 429.11856).

**4-Isoprenyl ravenelin (7):** dark orange glassy solid; FTIR ν<sub>max</sub> 3560, 1745, 1677, 1223 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 4; HRESIMS *m/z* 327.12308 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub> 327.12325).

**Compound 8:** yellow glassy solid; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> 0 (*c* 0.08, CHCl<sub>3</sub>); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 368 (3.24), 262 (3.59), 228 (3.79), 207 (3.84) nm; FTIR ν<sub>max</sub> 3560, 1745, 1677, 1223 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR see Table 5; HRESIMS *m/z* 415.13951 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>8</sub> 415.13929).

**Acid Hydrolysis of Compound 3.** A 2 mg amount of compound **3** dissolved in 1 mL of water was refluxed with 1 mL of HCl (1 M) for 1 h. The reaction mixture was diluted with H<sub>2</sub>O (2 mL) and extracted twice with EtOAc (4 mL). The H<sub>2</sub>O phase was concentrated to dryness to yield α-D-ribofuranoside as detected by TLC with an authentic sample. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -10 (*c* 0.09, H<sub>2</sub>O).

**Computational Section.** Minimum energy structures for the different structures were built with Spartan'10 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). Conformational analysis was performed with the Monte Carlo search protocol as implemented in the same software under the MMFF94 molecular mechanics force field. The two most stable conformers were submitted to the Gaussian 09 program (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA)<sup>45</sup> calculation for their geometry optimization performed using the M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. The resulting NMR shielding tensors were computed with the gauge-independent atomic orbital (GIAO) method and the polarizable continuum model using the integral equation formalism variant (IEFPCM) as the SCRF method using the DFT method at the B3LYP/6-311+G(2d,p) level of theory.

**Assay for α-Glucosidase Inhibitors.** The fungal extract, fractions, compounds, and acarbose (positive control) were dissolved in MeOH or phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH 7). Aliquots of 0–10 μL of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20 μL of enzyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) stock solution (0.4 units/mL) in PBS. After incubation, 10 μL of substrate (pNPG 5 mM) was added and incubated a further 20 min at 37 °C, and the absorbances were determined. For the extract and fractions, the inhibitory activity was determined as percentage in comparison to the blank (PBS) according to the following equation:

$$\% \alpha \text{GHY} = \left( 1 - \frac{A_{415t}}{A_{415c}} \right) \times 100\%$$

where % αGHY is the percentage of inhibition, A<sub>415t</sub> is the corrected absorbance of the extract, fractions, or compound under testing (A<sub>415 end</sub> - A<sub>415 initial</sub>), and A<sub>415c</sub> is the absorbance of the blank (A<sub>415 end blank</sub> - A<sub>415 initial blank</sub>). The IC<sub>50</sub> was calculated by regression analysis, using the following equation:

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

where A<sub>100</sub> is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC<sub>50</sub> is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and s is the cooperative degree.

**Expression and Purification of the Enzyme hPTP-1B.** Recombinant hPTP-1B was expressed from the PTPN1 gene (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 1 from *Homo sapiens*, gene ID: 5770). The gene was optimized for overexpression in *E. coli* and subcloned into the pET28 vector to obtain the pET28-PTPN1 system by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The overexpression system was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells with karamycin resistance,

inducing expression with 1 mM of IPTG for 8 h and purifying the enzyme using a His Trap excel column from General Electric. The overexpression and purification process was followed by PAGE-SDS, obtaining a yield of about 90 mg per liter with a purity of 98%.<sup>46</sup>

**Assay for PTP-1B inhibitors.** The fungal extract, fractions, compounds, and positive control were dissolved in DMSO, MeOH, or Tris buffer solution (Tris, 20 mM, pH 7). Aliquots of 0–10  $\mu$ L of testing materials (triplicated) were incubated for 5 min with 20  $\mu$ L of enzyme stock solution (22 nm) in Tris. After incubation, 10  $\mu$ L of substrate (*p*NPP 5 mM) was added and incubated a further 15 min at 25 °C, and the absorbances were determined. For the extract and fractions, the inhibitory activity was determined as percentage in comparison to the blank (Tris) according to the following equation:

$$\%PTP1B = \left(1 - \frac{A_{415t}}{A_{415c}}\right) \times 100\%$$

where % PTP1B is the percentage of inhibition,  $A_{415t}$  is the corrected absorbance of the extract, fractions, or compound under testing ( $A_{415 \text{ end}} - A_{415 \text{ initial}}$ ), and  $A_{415c}$  is the absorbance of the blank ( $A_{415 \text{ end blank}} - A_{415 \text{ initial blank}}$ ). The  $IC_{50}$  was calculated by regression analysis, using the following equation:

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

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

**Sucrose Tolerance Test of Malbrancheamide (10).** ICR male mice 3–4 weeks old (25–30 g body weight) were purchased from Envigo-UNAM. Mice were housed in a room with a 12 h light:dark cycle and controlled for temperature and humidity with free access to standard laboratory rodent diet (Teklad 2018S, Envigo) and water *ad libitum* until the beginning of each experiment. Mice were treated according to the International Ethical Guidelines for the care and use of laboratory animals and following the recommendations of the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). The Animal Studies Committee of Facultad de Química, UNAM, approved the experimental protocol (FQ/CICUAL/292/18). After 4 h of food deprivation, mice were divided into five groups (I–V) of six animals each. The animals of group I were administered with VEH (saline solution with 0.05% Tween 80) and group II with reference drug (acarbose 5 mg/kg). Groups III–V were treated orally with **10** at the doses of 3.1 and 10 mg/kg. Thirty minutes later, sucrose (3 g/kg) was orally administered to each animal. Blood glucose concentrations were determined at 30, 60, 90, and 120 min postadministration of the carbohydrate load. The percentage of glycemic variation (%) was determined with respect to the basal level as follows:

$$\%variation \text{ of glycemia} = \left[\frac{(G_t - G_i)}{G_i}\right] \times 100$$

where  $G_i$  is the basal glycemia and  $G_t$  is the different glycemia values after treatment administration.<sup>10,47</sup>

**Docking Studies.** The minimized structures for docking simulations were prepared using Autodock Tools package v1.5.4 (ADT, <http://mglttools.scripps.edu/>).<sup>48</sup> For metabolites, addition of Gasteiger charges and number of torsions were set, and nonpolar hydrogens were merged. The crystallographic structure of  $\alpha$ -glucosidase from yeast and PTP-1B from human was obtained from the Protein Data Bank (pdb code 3A4A and 1SUG, respectively). For the receptor polar hydrogens and Kollman charges were added, and solvation parameters were assigned by default. Molecular docking studies were achieved with AutoDock v1.1.2.15. First, a blind docking was performed in order to establish the common site of interaction of the metabolites with the  $\alpha$ -glucosidase and PTP1B. The search space for this preliminary docking was defined as a box size of 90  $\times$  90  $\times$  90 Å in the  $x$ ,  $y$ , and  $z$  dimensions, with a grid spacing of 0.375 Å, and the

macromolecule was set as the center of the box. The default parameters of exhaustiveness and number of modes were not altered. Next, a refined docking was performed with a smaller box of searching space (50  $\times$  50  $\times$  50 and 0.375 Å of grid spacing), setting as the center of the grid box the lower state pose obtained from the blind docking. The conformational states from the docking simulations were analyzed using the AutoDockTools program, which also identified the H-bonds and van der Waals interactions between the catalytic site of  $\alpha$ -glucosidase or PTP1B and the ligand. The predicted docked complexes (protein–ligand) were those conformations showing the lowest binding energy. Preparation of the figures was accomplished with the PyMOL visualization tool (PyMOL Molecular Graphics System v1.7.4, Schrödinger, New York, NY, USA<sup>49,50</sup> and Maestro (Schrödinger)).<sup>51</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b01108>.

1D and 2D NMR spectra of **1–8** and <sup>1</sup>H NMR of **9–12**; phylograms of the most likely tree based on the analyses of the ITS and LSU regions; docking analyses showing the interactions of the active compounds with  $\alpha$ -glucosidase and PTP-1B (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: +52-55-5622-5289. E-mail: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx).

### ORCID

Manuel Rangel-Grimaldo: 0000-0003-1261-3317

Martha L. Macías-Rubalcava: 0000-0001-9650-0920

Martin González-Andrade: 0000-0002-8910-3035

Huzefa Raja: 0000-0002-0824-9463

Mario Figueroa: 0000-0001-7004-0591

Rachel Mata: 0000-0002-2861-2768

### Author Contributions

<sup>‡</sup>Taken in part from the Ph.D. thesis of Manuel Rangel-Grimaldo.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320. M.R.G. acknowledges the fellowship from CONACYT (294309) to pursue graduate studies. This study made use of UNAM's NMR lab, LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACYT-0224747, and UNAM. The authors also recognize the valuable support of I. Rivero-Cruz and A. Vázquez-Pérez from Facultad de Química, M. I. Velásquez-López from Facultad de Medicina, and B. Quiroz García, M. A. Peña González, E. Huerta Salazar, J. Pérez Flores, M. C. García-González, and R. Patiño Maya from Instituto de Química, for recording NMR, IR, UV, and MS spectra. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system (LANCAD-UNAM-DGTIC-313).

## ■ DEDICATION

Dedicated to Dr. Jon Clardy of Harvard Medical School for his pioneering work on bioactive natural products.

## ■ REFERENCES

- (1) Mata, R.; Figueroa, M.; Rivero-Cruz, I.; Macías-Rubalcava, M. L. *Planta Med.* **2018**, *84*, 594–605.
- (2) Martínez-Luis, S.; González, M. C.; Ulloa, M.; Mata, R. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1012–1016.
- (3) Martínez-Luis, S.; Rodríguez, R.; Acevedo, L.; González, M. C.; Lira-Rocha, A.; Mata, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1817–1822.
- (4) Figueroa, M.; González, M. D. C.; Mata, R. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22* (8), 709–714.
- (5) Miller, K. A.; Welche, T. R.; Greshock, T. J.; Ding, Y.; Sherman, D. H.; Williams, R. M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3116–3119.
- (6) Yang, Y. L.; Liao, W. Y.; Liu, W. Y.; Liaw, C. C.; Shen, C. N.; Huang, Z. Y.; Wu, S. H. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 11573–11580.
- (7) Wakana, D.; Itabashi, T.; Kawai, K. I.; Yaguchi, T.; Fukushima, K.; Goda, Y.; Hosoe, T. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 585–588.
- (8) Wakana, D.; Hosoe, T.; Wachi, H.; Itabashi, T.; Fukushima, K.; Yaguchi, T.; Kawai, K. I. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 217–219.
- (9) Wakana, D.; Hosoe, T.; Itabashi, T.; Fukushima, K.; Kawai, K. *Mycotoxins* **2008**, *58*, 1–6.
- (10) Verastegui-Omaña, B.; Rebolgar-Ramos, D.; Pérez-Vásquez, A.; Martínez, A. L.; Madariaga-Mazón, A.; Flores-Bocanegra, L.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 190–195.
- (11) Rebolgar-Ramos, D.; Macías-Rubalcava, M. L.; Figueroa, M.; Raja, H. A.; González-Andrade, M.; Mata, R. *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 862–871.
- (12) International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019. <http://diabetesatlas.org>.
- (13) Ezzat, S. M.; El Bishbishy, M. H.; Habtemariam, S.; Salehi, B.; Sharifi-Rad, M.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. *Molecules* **2018**, *23*, 3334–3362.
- (14) Tamrakar, A. K.; Maurya, C. K.; Rai, A. K. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 1101–1115.
- (15) Zhang, Z. Y.; Lee, S. Y. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2003**, *12*, 223–233.
- (16) Takase, S.; Kawai, Y.; Uchida, I.; Tanaka, H.; Aoki, H. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3037–3048.
- (17) Elsebai, M. F.; Rempel, V.; Schnakenburg, G.; Kehraus, S.; Müller, C. E.; König, G. M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 866–869.
- (18) Sun, T. Y.; Kuang, R. Q.; Chen, G. D.; Qin, S. Y.; Wang, C. X.; Hu, D.; Wu, B.; Liu, X. Z.; Yao, X. S.; Gao, H. *Molecules* **2016**, *21*, 1184–1196.
- (19) Witt, F. A.; Bergman, J. J. *Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 351–355.
- (20) Rahbæk, L.; Breinholt, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 904–905.
- (21) Xu, Y.-J.; Pieters, L. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1056–1072.
- (22) Tseng, M. C.; Yang, H. Y.; Chu, Y. H. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 419–427.
- (23) Sun, H. H.; Barrow, C. J.; Sedlock, D. M.; Gillum, A. M.; Cooper, R. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 515–522.
- (24) Clevenger, K. D.; Ye, R.; Bok, J. W.; Thomas, P. M.; Islam, M. N.; Miley, G. P.; Robey, M. T.; Chen, C.; Yang, K.; Swyers, M.; Wu, E.; Gao, P.; Wu, C. C.; Keller, N. P.; Kelleher, N. L. *Biochemistry* **2018**, *57*, 3237–3243.
- (25) Jang, J. P.; Jang, J. H.; Soung, N. K.; Kim, H. M.; Jeong, S. J.; Asami, Y.; Shin, K. S.; Kim, M. R.; Oh, H.; Kim, B. Y. *J. Antibiot.* **2012**, *65* (4), 215–217.
- (26) Willoughby, P. H.; Jansma, M. J.; Hoye, T. R. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 643–660.
- (27) Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1839–1862.
- (28) Chatterjee, A.; Ganguly, M. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3358.
- (29) Siling, S. A.; Ponomarev, I. I. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1978**, *27*, 1643–1649.
- (30) Li, D. L.; Li, X. M.; Wang, B. G. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *19*, 675–680.
- (31) Kubo, I.; Murai, Y.; Soediro, I.; Soetarno, S.; Sastrodihardjo, S. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1063–1065.
- (32) van Eijk, G.; Gerbertus, W.; Roeymans, H. *Exp. Mycol.* **1981**, *5*, 373–375.
- (33) Machida, K.; Matsuoka, E.; Kasahara, T.; Kikuchi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53* (8), 934–937.
- (34) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (35) Rudnitskaya, A.; Török, B.; Török, M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2010**, *38*, 261–265.
- (36) Yamamoto, K.; Nakayama, A.; Yamamoto, Y.; Tabata, S. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3414–3420.
- (37) Pedersen, A. K.; Peters, G. H.; Møller, K. B.; Iversen, L. F.; Kastrup, J. S. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (9), 1527–1534.
- (38) Jiang, C. S.; Liang, L. F.; Guo, Y. W. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 1217–1245.
- (39) Sigler, L.; Carmichael, J. W. *Mycotaxon* **1976**, *4*, 349–488.
- (40) White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. W. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Application*; Academic Press: San Diego, 1990; pp 315–322.
- (41) Gardes, M.; White, T. J.; Fortin, J. A.; Bruns, T. D.; Taylor, J. W. *Can. J. Bot.* **1991**, *69*, 180–190.
- (42) Vilgalys, R.; Hester, M. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 4283–4286.
- (43) Rehner, S. A.; Samuels, G. J. *Can. J. Bot.* **1995**, *73*, 816–823.
- (44) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 756–770.
- (45) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2013.
- (46) Puius, Y. A.; Zhao, Y.; Sullivan, M.; Lawrence, D. S.; Almo, S. C.; Zhang, Z. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 13420–13425.
- (47) Lozano-González, M.; Ovalle-Magallanes, B.; Rangel-Grimaldo, M.; De La Torre-Zavala, S.; Noriega, L. G.; Tovar-Palacio, C.; Tovar, A. R.; Mata, R. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 7756–7762.
- (48) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- (49) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.1*; Schrödinger, 2015.
- (50) Seeliger, D.; De Groot, B. L. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2010**, *24*, 417–422.
- (51) Schrödinger Release 2019-3: *Maestro*; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2019.