



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y OBTENCIÓN DE DERIVADOS
SEMISINTÉTICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *ASPERGILLUS
TERREUS* (IQ-046), PARA SU USO COMO INHIBIDORES DE α -GLUCOSIDASAS
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
Diego Cristian Coporo Blancas



CDMX.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
VOCAL: Dra. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ
SECRETARIO: Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ
1er. SUPLENTE: Dra. PAULINA DEL VALLE PÉREZ
2° SUPLENTE: M en C. MARÍA EUGENIA MENDOZA JASSO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ

SUSTENTANTE (S):

DIEGO CRISTIAN COPORO BLANCAS

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado a través del proyecto de infraestructura No 295057.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el financiamiento otorgado mediante los proyectos PAPIIT-IA200818/IA203220.

A mi tutor de tesis Dr. José Alberto Rivera Chávez del Instituto de Química-UNAM, por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

A los técnicos académicos del Instituto de Química-UNAM por la ayuda en la realización de diferentes experimentos. En particular a la Dra. Celia Bustos Brito y al M. en C. Antonio Nieto.

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del Instituto de Química y a la Dra. Beatriz Quiroz García.

Y a la Dra. Jacklyn M. Gallagher puesto que sin ella la realización de los experimentos de ESI-MS-AR hubiera sido más complicada.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Diabetes Mellitus.	3
2.1.1 Generalidades.	3
2.1.2 Panorama mundial y nacional.....	3
2.1.3 Tratamiento de la diabetes.	4
2.1.3.1 Sulfonilureas.....	4
2.1.3.2 Biguanidas.	5
2.1.3.3 Tiazolidinas.....	5
2.1.3.4 Incretinas.....	5
2.1.3.5 Inhibidores de α -glucosidasas.....	5
2.2 Enzimas α -glucosidasas.....	5
2.2.1 Generalidades.....	5
2.2.2 Inhibidores de α -glucosidasas.	6
2.3 Productos Naturales.	7
2.4 Género <i>Aspergillus</i>	12
2.5 Modificaciones estructurales.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos.	18
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	19
6.1 Obtención de muestras.....	19
6.2 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos.	19

6.3	Obtención de los extractos orgánicos.	20
6.4	Procedimientos cromatográficos generales.	20
6.5	Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.	21
6.6	Ensayo de inhibición de α -glucosidasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
6.7	Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado.	22
6.8	Estudio químico del hongo IQ-046.	23
6.8.1	Cultivo en mediana escala.	23
6.8.2	Fraccionamiento del Hongo IQ-046.	23
6.8.3	Aislamiento de la butirolactona I (1).	24
6.8.3	Aislamiento de la butirolactona IV (7).	24
6.8.4	Aislamiento de la chrisamida B (8).	24
6.8.5	Aislamiento de la lovastatina (9).	24
6.8.6	Aislamiento del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (10).	25
6.9	Purificación de derivados semisintéticos.	26
6.9.1	Purificación de aspernólida A (2).	26
6.9.2	Purificación de derivados obtenidos empleando anhídrido propiónico (3 y 4).	26
6.9.3	Purificación de la 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (5).	27
6.9.4	Purificación de la asperteretona D (6).	27
6.10	Acoplamiento molecular.	28
6.10.1	Proteína.	28
6.10.2	Ligando.	28
6.10.3	Acoplamiento Molecular.	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	29
7.1	Aislamiento y selección de microorganismos fúngicos.	29
7.1.1	Determinación de la capacidad inhibitoria de los extractos de microorganismos fúngicos.	29
7.2	Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado.	30
7.3	Estudio químico del hongo IQ-046 y modificaciones estructurales.	31
7.3.1	Caracterización de la butirolactona I (1).	32
7.3.1	Preparación de la aspernólida A (2) a partir de butirolactona I (1).	36
7.3.1.1	Mecanismo para la formación del compuesto 2.	39

7.3.2	Preparación del éster 4',4''-dipropiónico de butirolactona I (3).....	40
7.3.2.1	Mecanismo para la formación del compuesto 3.	44
7.3.3	Preparación del $\Delta^{1''',2'''}-3'''$ -hidroxi-4',4''-dipropiónico de butirolactona I (4).	44
7.3.3.1	Mecanismo para la formación del compuesto 4.	49
7.3.4	Obtención de la 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (5).	49
7.3.4.1	Mecanismo para la formación del compuesto 5.	53
7.3.5	Síntesis de asperteretona D (6) a partir de butirolactona I (1).	53
7.3.5.1	Mecanismo para la formación del compuesto 6.	57
7.3.6	Caracterización de la butirolactona IV (7).....	59
7.3.7	Caracterización de la chrisamida B (8).	64
7.3.8	Caracterización de la lovastatina (9).	69
7.3.9	Caracterización del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (10).	73
7.4	Estudios <i>in silico</i> y evaluación <i>in vitro</i>	77
8.	CONCLUSIONES.....	85
9.	PERSPECTIVAS.....	86
10.	REFERENCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de personas con diabetes del 2019 a 2045.	4
Figura 2. Semisíntesis de ixabepilona.	16
Figura 3. Semisíntesis de la cloroberberina.	16
Figura 4. Ubicación del manglar en Tamiahua-El ídolo.	19
Figura 5. Cromatograma para el aislamiento de la butirolactona IV (7).	24
Figura 6. Cromatograma para el aislamiento de la chrisamida B (8).	24
Figura 7. Cromatograma para el aislamiento de la lovastatina (9).	25
Figura 8. Cromatograma para el aislamiento del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (10).	25
Figura 9. Cromatograma para el aislamiento de la aspernólida A (2).	26
Figura 10. Cromatograma para el aislamiento de los derivados 3 y 4.	26
Figura 11. Cromatograma para el aislamiento de la 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (5).	27
Figura 12. Cromatograma para el aislamiento de la asperteretona D (6).	27
Figura 13. Microorganismos aislados de suelo de manglar.	29
Figura 14. Porcentaje de inhibición sobre la enzima α GHY a 200 ppm de los extractos orgánicos de microorganismos fúngicos.	29
Figura 15. Árbol de máxima verosimilitud de las regiones ITS del hongo IQ-046.	30
Figura 16. Moléculas aisladas de <i>Aspergillus terreus</i> (1,7-10) y derivados semisintéticos (2-6).	31
Figura 17. Espectro de masas de alta resolución por electrospray (EM-ESI-AR) en modo positivo del compuesto 1.	33
Figura 18. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz en CDCl ₃ del compuesto 1.	33
Figura 19. Espectro de RMN- ¹³ C a 175 MHz en CDCl ₃ del compuesto 1.	34
Figura 20. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 1.	34
Figura 21. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 1.	35
Figura 22. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto 2.	36
Figura 23. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 2.	37
Figura 24. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz en CDCl ₃ del compuesto 2.	37
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H a 175 MHz en CDCl ₃ del compuesto 2.	38
Figura 26. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 2.	38
Figura 27. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 2.	39
Figura 28. Mecanismo para la formación del compuesto 2.	40
Figura 29. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto 3.	40
Figura 30. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 3.	41
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz en CDCl ₃ del compuesto 3.	41
Figura 32. Espectro de RMN- ¹³ C a 175 MHz en CDCl ₃ del compuesto 3.	42
Figura 33. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 3.	42
Figura 34. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 3.	43
Figura 35. Mecanismo para la formación del compuesto 3.	44
Figura 36. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto 4.	45
Figura 37. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 4.	46
Figura 38. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz en CDCl ₃ del compuesto 4.	46
Figura 39. Espectro de RMN- ¹³ C a 175 MHz en CDCl ₃ del compuesto 4.	47
Figura 40. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 4.	47
Figura 41. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 4.	48
Figura 42. Mecanismo para la formación del compuesto 4.	49
Figura 43. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto 5.	49

Figura 44. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 5 .	50
Figura 45. Espectros de RMN- ¹ H a 700 MHz (arriba) y RMN- ¹³ C a 175 MHz (abajo) en CDCl ₃ del compuesto 5 .	51
Figura 46. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 5 .	52
Figura 47. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 5 .	52
Figura 48. Mecanismo para la formación del compuesto 5 .	53
Figura 49. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto 6 .	54
Figura 50. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 6 .	55
Figura 51. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz en CDCl ₃ del compuesto 6 .	55
Figura 52. Espectros de RMN- ¹³ C a 175 MHz en CDCl ₃ del compuesto 6 .	56
Figura 53. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 6 .	56
Figura 54. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 6 .	57
Figura 55. Mecanismo para la formación del compuesto 6 .	58
Figura 56. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 7 .	59
Figura 57. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz arriba) y RMN- ¹³ C (175 MHz abajo) en CDCl ₃ del compuesto 7 .	60
Figura 58. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 7 .	60
Figura 59. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 7 .	61
Figura 60. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 8 .	65
Figura 61. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz en CDCl ₃ del compuesto 8 .	66
Figura 62. Espectro de RMN- ¹³ C a 175 MHz en CDCl ₃ para el compuesto 8 .	67
Figura 63. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 8 .	67
Figura 64. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 8 .	68
Figura 65. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 9 .	70
Figura 66. Espectro de RMN- ¹ H a 700 MHz (arriba) y RMN- ¹³ C a 175 MHz (abajo) en CDCl ₃ del compuesto 9 .	71
Figura 67. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto 9 .	72
Figura 68. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 9 .	72
Figura 69. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 10 .	74
Figura 70. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz arriba) y RMN- ¹³ C (175 MHz abajo) en CDCl ₃ del compuesto 10 .	75
Figura 71. Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto 10 .	76
Figura 72. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 10 .	76
Figura 73. Reacción de hidrólisis de <i>p</i> NPG en presencia de α -glucosidasa	78
Figura 74. Sitios de unión a α -glucosidasa de las diferentes moléculas.	83
Figura 75. Porcentaje de inhibición de α GHY de los compuestos 1-10 evaluados a 100 ppm.	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Inhibidores de α -glucosidasa con uso en la terapéutica.	7
Tabla 2. Moléculas con potencial antidiabético.	7
Tabla 3. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen fúngico.	9
Tabla 4. Metabolitos fúngicos aislados de humedales.	11
Tabla 5. Productos naturales obtenidos del género <i>Aspergillus</i> sp.	13
Tabla 6. Productos naturales aislados de <i>Aspergillus terreus</i>	14
Tabla 7. Metabolitos con núcleo similar a la butirolactona I (1) producidos por <i>Aspergillus terreus</i>	15
Tabla 8. Extractos orgánicos de los hongos en medio de Arroz y Cereal.	20
Tabla 9. Rendimientos obtenidos del fraccionamiento primario.	23
Tabla 18. Datos espectroscópicos de butirolactona I (1), derivados (2-6) y butirolactona IV (7) en $CDCl_3$	62
Tabla 19. Compuestos nitrados previamente aislados del género <i>Aspergillus</i> sp.	65
Tabla 20. Datos espectroscópicos del compuesto 8 en $CDCl_3$	66
Tabla 21. Datos espectroscópicos del compuesto 9 en $CDCl_3$	70
Tabla 22. Datos espectroscópicos de compuesto 10 en $CDCl_3$	74
Tabla 23. Modelo estructural para los compuestos aislados y conformaciones teóricas.	79

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
μL	Microlitro	IDF	Federación Internacional de Diabetes
μm	Micrómetro	ITS	Espaciador transcrito interno del DNA ribosomal
AcOEt	Acetato de etilo	LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
ADT	AutoDockTools	MeCN	Acetonitrilo
APD	Agar papa dextrosa	MeOH	Metanol
ASTM	Sociedad Americana para la Evaluación de Materiales	meq	Miliequivalente
CCA	Cromatografía en columna abierta	mL	Mililitro
CCF	Cromatografía en capa fina	NCBI	National Center for Biotechnology Information
CDCl_3	Cloroformo deuterado	NH_4^+	Amonio
CH_2Cl_2	Diclorometano	p/v	Peso /volumen
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	PDB	Protein Data Bank
CPD	Caldo papa dextrosa	pH	Potencial de hidrógeno
DM	Diabetes Mellitus	<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido
DMC	Dimetilcarbonato	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DMTI	Diabetes Mellitus Tipo 1	RMN- ^1H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
DMTII	Diabetes Mellitus Tipo 2	RMN- ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono
THF	Tetrahidrofurano	TBAI	Ioduro de tetrabutilamonio
GH	Glucósido-hidrolasas	α GHY	α -Glucosidasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HCl	Ácido clorhídrico	δ	Desplazamiento químico en ppm
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces	δ_{C}	Desplazamiento químico en el espectro de RMN- ^{13}C en ppm
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear	δ_{H}	Desplazamiento químico en el espectro de RMN- ^1H en ppm

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente los seres humanos hemos confiado en la naturaleza para atender distintas necesidades básicas, entre las que destacan el tratamiento de enfermedades; para ello, se han empleado diversos recursos naturales, por ejemplo, plantas, animales y microorganismos. En particular, los hongos microscópicos han contribuido de manera importante al descubrimiento de prototipos estructurales para su uso en la terapéutica, algunos ejemplos relevantes incluyen la lovastatina (*Aspergillus terreus*), un metabolito secundario empleado como hipocolesterolemizante, las cefalosporinas (*Cephalosporium acremonium*) y las penicilinas (*Penicillium chrysogenum*), ambas empleadas como antibióticos, por tan solo mencionar algunos. Las aplicaciones terapéuticas de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de hongos han promovido numerosas investigaciones encaminadas a la obtención de nuevos agentes bioactivos, útiles para el tratamiento de diversos padecimientos.^{1,2} En dichas investigaciones se han empleado diversos enfoques con la finalidad de explorar al máximo su potencial metabólico, enfatizando el estudio de microorganismos obtenidos de regiones poco exploradas o de ambientes extremos, como los encontrados en humedales.

En el caso particular de México el conocimiento de la biodiversidad fúngica se ha clasificado como pobre, debido a que de las ~200,000 especies de hongos estimadas, solo se han estudiado el 5%,³ lo que ha limitado el conocimiento sobre la diversidad química y farmacológica de los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos.⁴

Aunque los metabolitos secundarios de plantas y microorganismos presentan una gran diversidad estructural y farmacológica, en algunos casos sus propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, farmacodinámicas y/o toxicológicas no son las más adecuadas. En estos casos, las modificaciones estructurales (semisíntesis) representan la estrategia de primera elección para resolver dichas complicaciones. Algunas moléculas sintetizadas usando esta estrategia son la artemisona (derivado de artemisinina), un fármaco aprobado en China en 2015 para el tratamiento de la malaria,⁵ y la telavancina (derivado de vancomicina) aprobada en 2009 por la FDA, utilizada para el tratamiento de infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.⁶ Los ejemplos anteriores ponen de manifiesto la importancia de la estrategia de semisíntesis en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Tomando en cuenta la gran diversidad del metabolismo de los microorganismos fúngicos, así como el potencial farmacológico de sus metabolitos secundarios y

derivados semisintéticos, la búsqueda de moléculas con actividad para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (DMTII) a partir de dicha fuente resulta factible.

La DMTII es un desorden crónico degenerativo caracterizado por la concentración elevada de glucosa en sangre. Esta enfermedad afecta alrededor de 500 mil personas en el mundo, siendo México uno de los territorios con mayor prevalencia.⁷ El tratamiento farmacológico de la DMTII tiene como objetivo principal disminuir los niveles de glucosa plasmática, a través de la secreción de hormonas (insulina) que regulan la homeostasis de esta molécula y la absorción de glucosa en tejidos y a nivel intestinal (inhibidores de α -glucosidasas). Sin embargo, en este último grupo la batería de moléculas disponibles es muy limitada, con solo tres fármacos disponibles en el mercado. Por ello, la búsqueda de nuevos inhibidores de estas enzimas es indispensable.

Por las consideraciones anteriores, en este trabajo se realizó un estudio químico sistemático de la especie fúngica *Aspergillus terreus* (IQ-046) aislada de humedales ubicados en la región de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México. Este estudio permitió el aislamiento de butirolactona I (**1**), un metabolito con actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas, butirolactona IV (**7**), chrisamida B (**8**), lovastatina (**9**) y 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida)benzoato (**10**).^{8,9} Adicionalmente, se generaron diversos derivados semisintéticos de butirolactona I (**1**), con la finalidad de mejorar su actividad como inhibidor de las enzimas α -glucosidasas, entre ellos la aspernólida A (**2**), dos derivados acilados con residuos de ácido propiónico (**3** y **4**), un derivado tetrabromado (**5**) y la asperteretona D (**6**). La evaluación de la actividad biológica (*in vitro*) de los metabolitos secundarios aislados y derivados semisintéticos se realizó empleando un método espectrocolorimétrico, mientras que el probable sitio de unión de las moléculas evaluadas con la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* se predijo con estudios de acoplamiento molecular (estudios *in silico*). Los estudios *in silico*, permitieron inferir que el tipo de inhibición de los compuestos **1**, **2**, **6S**, **7** y **8** sobre la enzima α -glucosidasa es de carácter no-competitivo, a diferencia del resto de las moléculas estudiadas. Los resultados de las evaluaciones *in vitro* indicaron que los productos de semisíntesis **5** y **6** tienen mayor actividad en comparación con el producto de partida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes Mellitus.

2.1.1 Generalidades.

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades crónico-degenerativas más comunes. Se caracteriza por una deficiencia en la producción de insulina y/o su acción. Este tipo de deficiencia causa alteraciones en la mayoría de los procesos metabólicos, y por lo regular, conducen a la aparición de complicaciones micro y macrovasculares, tales como, enfermedades cardiovasculares (ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares), nefropatía (insuficiencia renal), neuropatía (pie diabético) y retinopatía (daño en vasos sanguíneos que pueden provocar ceguera), entre otras.¹⁰

Esta enfermedad fue reconocida como un problema de salud desde hace cientos de años. Los datos más antiguos se describen en el papiro de Ebers (1535 A.C) donde se menciona un padecimiento con producción de grandes cantidades de orina. En el siglo II D.C. Areteo de Capadocia acuña el término de “diabetes” para describir una patología que producía en exceso orina y adiciona el término “mellitus” (miel) para referirse a su característica de ser una orina dulce, pegajosa y atraer hormigas.¹¹

Existen dos tipos principales de diabetes, la DM tipo 1 (DMTI) y la DM tipo 2 (DMTII). La DMTI es un desorden autoinmune caracterizado por la destrucción de las células β del páncreas, impidiendo de esta manera la producción de insulina. La DMTII, por otro lado, es consecuencia de una hiperglucemia provocada por una producción deficiente de insulina y la poca capacidad del organismo de responder ante esta hormona. Esta característica se conoce como resistencia a la insulina. La falta de sensibilidad a la acción a la insulina, principalmente en el tejido adiposo, músculo e hígado, tiene como consecuencia la aparición de altos niveles de glucosa en sangre.⁷

2.1.2 Panorama mundial y nacional.

Actualmente la diabetes es considerada una de las mayores emergencias sanitarias, con alrededor de 4.2 millones de muertes en 2019 y con un gasto anual de 760 billones de dólares, además, no se puede omitir que en este año se registraron un poco más de 400 millones de personas con esta enfermedad, y para

el 2045 se espera un aumento de más del 50% a nivel mundial (**Figura 1**).⁷ En particular, México ocupa el sexto lugar en prevalencia, con 12.8 millones pacientes diagnosticados con esta enfermedad, generando gastos económicos importantes para el sector salud (1300 dólares por persona).¹² Por lo anterior, la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para su tratamiento es una actividad primordial, ya que, al incrementar la batería de fármacos disponibles, se puede reducir el costo de los que existen hoy día.

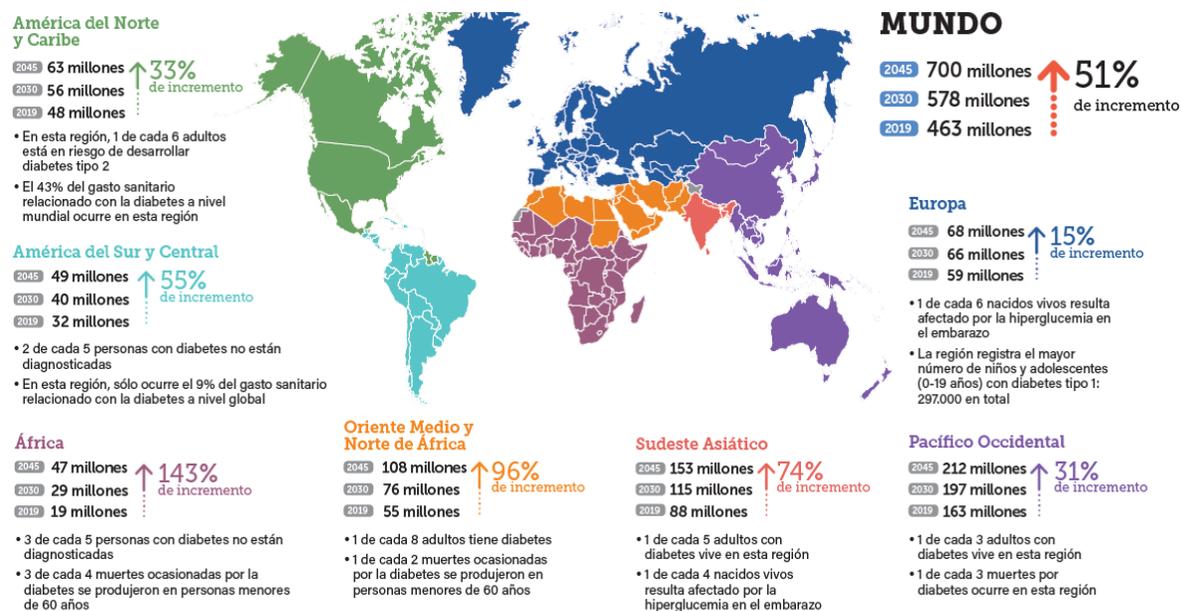


Figura 1. Número de personas con diabetes del 2019 a 2045 (Tomado de IDF ATLAS, 2019).

2.1.3 Tratamiento de la diabetes.

El tratamiento convencional de la DMTII consiste en la regulación de la dieta y la realización de ejercicio, sin embargo aun con el apego a este régimen, es necesario el uso de terapia farmacológica, a mediano o largo plazo.¹³ Los tratamientos farmacológicos para la DMTII son variados y pueden ser clasificados como: sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinas, inhibidores de α -glucosidasa, meglitidinas, incretinas e inhibidores de SGLT2.¹⁴ A continuación se describen los aspectos generales más relevantes de cada uno de estos grupos de medicamentos.

2.1.3.1 Sulfonilureas.

Estos agentes son conocidos como de segunda línea. Actúan sobre las células β pancreáticas induciendo la secreción de insulina y generando una disminución de glucosa en sangre. La molécula representativa de este grupo es la glibenclamida. El principal efecto secundario de las sulfonilureas es la hipoglucemia.¹⁴

2.1.3.2 Biguanidas.

Actualmente el único miembro con uso terapéutico de este grupo es la metformina. Este fármaco incrementa la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMP (PK-AMP), por fosforilación. La PK-AMP activada estimula la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y el metabolismo no oxidativo, reduciendo la lipogénesis y gluconeogénesis. Este proceso incrementa el almacenamiento de glucógeno y reducción en la glucemia. Los problemas que se encuentran asociados a esta molécula son falta de absorción de sales biliares y glucosa, además de la acidosis láctica.¹⁴

2.1.3.3 Tiazolidinas.

Este tipo de fármacos son ligandos del receptor activador de la proliferación del peroxisoma γ (PPAR γ). De manera general las tiazolidinedionas aumentan la absorción de glucosa a través del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) en el músculo esquelético y reducen la gluconeogénesis en el hígado. La estimulación de la lipogénesis a través de PPAR γ reduce las concentraciones circulantes de ácidos grasos no esterificados, a través de la absorción celular y la síntesis de triglicéridos. Los efectos adversos más comunes de las tiazolidinedionas son el incremento de peso y el edema. Algunos ejemplos de estos fármacos son la pioglitazona y rosiglitazona.¹⁴

2.1.3.4 Incretinas.

Las incretinas son hormonas gastrointestinales que se liberan después de la ingesta de alimentos y estimulan la secreción de insulina por las células β pancreáticas, disminuyendo la secreción del glucagón y retrasando el vaciamiento gástrico. El fármaco representativo de este grupo es la exenatida, un análogo del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1).¹⁵

2.1.3.5 Inhibidores de α -glucosidasas.

Los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas intestinales retrasan la tasa de digestión de carbohidratos mediante la inhibición competitiva de las enzimas α -glucosidasas, reduciendo la hiperglucemia posprandial.¹⁴ Este grupo de fármacos es altamente seguro.

2.2 Enzimas α -glucosidasas.

2.2.1 Generalidades.

Las glucósido-hidrolasas (GH) son enzimas capaces de hidrolizar enlaces glucosídicos de polisacáridos, oligosacáridos o glicoconjugados, para producir

glucosa y monosacáridos relacionados. Estas enzimas son específicas para cada tipo de enlace y su actividad depende de la posición de los grupos hidroxilo, así como la configuración de los grupos involucrados en los enlaces glucosídicos.¹⁶

Las α -glucosidasas (EC. 3.2.1.20) forman parte de las familias GH13 y GH31, las cuales están distribuidas en una gran variedad de organismos. Los diversos orígenes les confieren diferencias significativas en el reconocimiento de su sustrato. Las enzimas de tipo I pertenecen a la familia GH13, las cuales muestran mayor afinidad por sustratos heterogéneos, tales como sacarosa y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) y presentan muy poca actividad hacia los sustratos maltosa y almidón. Estas enzimas se obtienen de bacterias, levaduras e insectos. Las enzimas pertenecientes a la familia GH31 de tipo II, se encuentran en microorganismos fúngicos. Estas enzimas hidrolizan con mayor facilidad sustratos homogéneos y poliméricos, tales como el almidón y glucógeno. A nivel estructural, las enzimas de tipo I y II difieren en la región catalítica, por ejemplo, las de tipo I presentan cuatro regiones, mientras que las de tipo II únicamente tienen dos.^{17,18}

En mamíferos estas enzimas se localizan en las microvellosidades del intestino delgado, lugar donde se realiza el último paso de la digestión de carbohidratos, y son las responsables de la liberación de glucosa.¹⁹ De forma general las enzimas α -glucosidasas participan en tres procesos bioquímicos; degradación de glucógeno en los lisosomas, la biosíntesis de glicoproteínas en el retículo endoplásmico y degradación de los polisacáridos en la dieta.

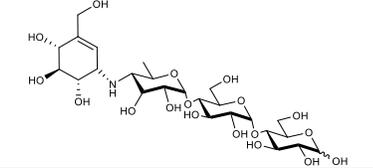
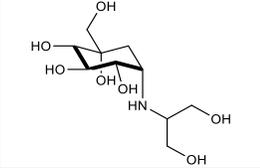
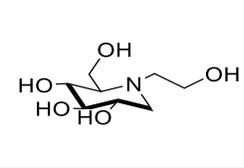
2.2.2 Inhibidores de α -glucosidasas.

Los inhibidores de α -glucosidasas para el tratamiento de la diabetes son importantes, puesto que estas moléculas retrasan considerablemente la liberación de glucosa proveniente de la dieta. Además, su uso a largo plazo reduce los niveles de hemoglobina glucosilada, y al no absorberse por el tracto gastrointestinal no existen efectos adversos sistémicos, como los presentados por hipoglucemiantes orales.²⁰⁻²³

Los inhibidores de enzimas de α -glucosidasas que actualmente se encuentran disponibles en el mercado se muestran en la **Tabla 1**. La acarbosa es un pseudo-tetrasacárido, formado por un dímero conocido como acarviosina y dos unidades de glucosa, esta molécula fue aislada por primera vez de *Actinoplanes* sp.²⁴ Otra molécula que comparte mecanismo de acción con la acarbosa es la voglibosa, un derivado de validamicina A, compuesto aislado de *Streptomyces higroscopicus*; y por último, el miglitol, un fármaco derivado de la desoxinojirimicina aislada de *Morus alba*. Los efectos secundarios de estos medicamentos se producen por la

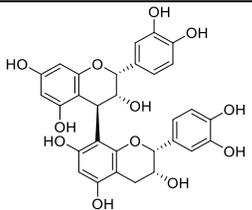
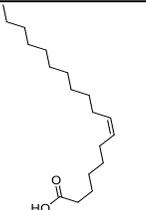
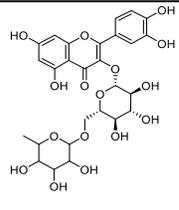
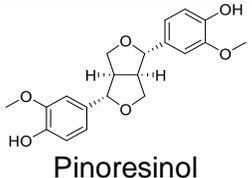
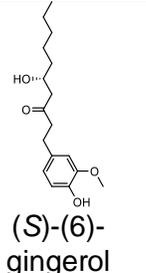
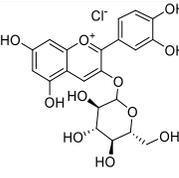
acumulación de carbohidratos en el intestino y el colon, donde son degradados por bacterias, causando flatulencias, diarrea, dolor y distensión abdominal.^{23,25,26}

Tabla 1. Inhibidores de α -glucosidasa con uso en la terapéutica.²³⁻²⁶

		
Acarbosa	Voglibosa	Miglitol

Considerando lo anterior, la búsqueda de nuevas moléculas dirigidas a esta diana terapéutica a partir de fuentes naturales es prometedora, especialmente considerando que los medicamentos que actualmente se emplean en la terapéutica tienen su origen en productos naturales.²⁷ En la **Tabla 2** se resumen algunas moléculas obtenidas a partir de dichas fuentes con actividad antidiabética.^{27,28}

Tabla 2. Moléculas con potencial antidiabético.^{27,28}

Molécula	Fuente	Molécula	Fuente	Molécula	Fuente
 Procianidina B2	<i>Vitis vinífera</i> (Uva)	 Ácido 7(Z)-octadecenoico	<i>Stichopus japonicus</i> (Pepino de mar)	 Rutina	<i>Passiflora ligularis</i> (Granadilla dulce)
 Pinoresinol	<i>Sesamum indicum</i> (Ajonjolí)	 (S)-(6)-gingerol	<i>Zingiber officinale</i> (Jengibre)	 3-O-glucosido de la cianidina	<i>Vaccinium myrtillus</i> (Arandano)

2.3 Productos Naturales.

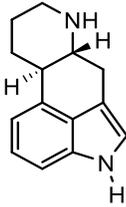
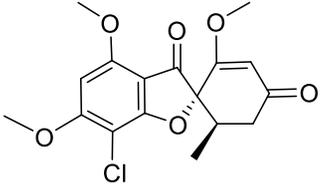
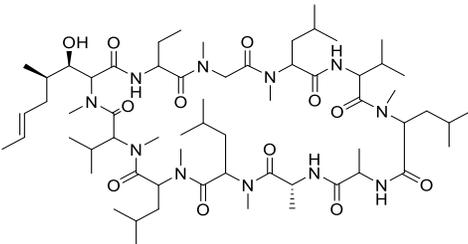
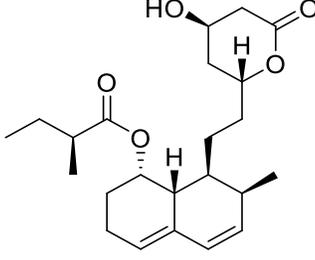
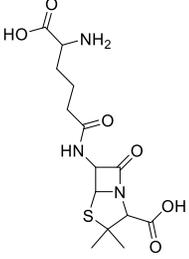
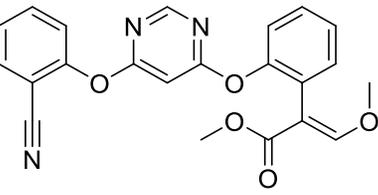
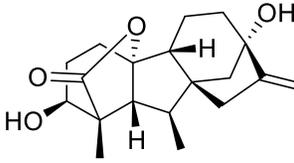
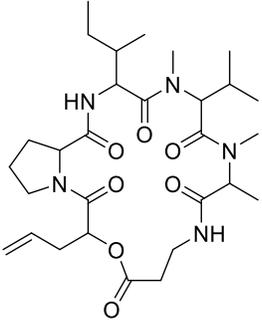
Desde el inicio de la humanidad, las fuentes naturales han tenido presencia como remedios para enfermedades. Algunos documentos importantes que compilan dicha

información son los Papiros de Smith y de Ebers, con más de 700 recetas y remedios para múltiples padecimientos.²⁹

Sin duda alguna, una de las fuentes más promisorias en la búsqueda de nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos son los productos naturales, en especial aquellos derivados de microorganismos. Así, por ejemplo, desde la obtención de la penicilina a partir de *Penicillium chrysogenum* a principios del siglo XX, los microorganismos fúngicos se han convertido en una de las principales fuentes de obtención de moléculas biodinámicas. De tal forma que la investigación química y farmacológica del reino fúngico es de gran interés.^{1,30}

Debido a su amplio genoma, los hongos tienen gran capacidad de producir una amplia gama de productos naturales, de tal manera que a la fecha se tiene registro de alrededor de 15,800 moléculas obtenidas a partir de esta fuente natural.^{30,31} Algunos metabolitos fúngicos presentan actividades sobre diversas dianas terapéuticas, tales que han permitido el desarrollo de agentes antifúngicos (griseofulvina y azoxistrobina), inmunosupresores (ciclosporina A), hipocolesterolemiantes (mevastatina) y vasoconstrictores (ergolina), entre otros (**Tabla 3**).^{1,30,32,33} Sin embargo, a pesar de que los productos naturales han sido tradicionalmente una fuente importante de fármacos, *per se* o como moléculas líderes para el desarrollo de productos más eficaces, en las décadas comprendidas entre 1990 y 2010, la industria farmacéutica se inclinó por el desarrollo de nuevos fármacos a partir de moléculas generadas a través del uso de técnicas de química combinatoria y el escrutinio de librerías sintéticas mediante procesos de evaluaciones farmacológicas de alto rendimiento (High-Throughput Screening, HTS por sus siglas en inglés). Las razones principales de este cambio de estrategia incluyen: (i) el tiempo y costo involucrado en los procesos de aislamiento y caracterización de productos naturales; (ii) los bajos rendimientos de estos productos; (iii) el aislamiento continuo de compuestos conocidos; (iv) la complejidad de muchas sustancias naturales que dificulta su síntesis adecuada; (v) y finalmente, en muchos casos las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos resultan incompatibles con los sistemas biológicos.^{30,31,34}

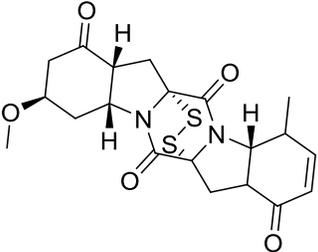
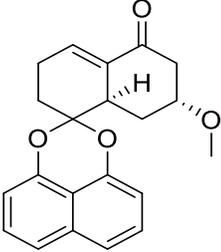
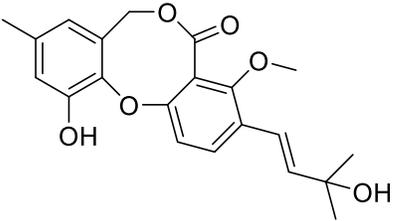
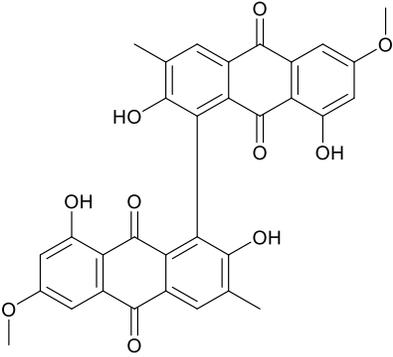
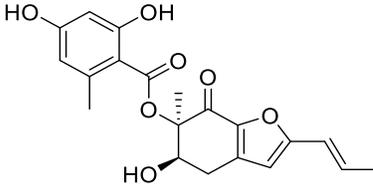
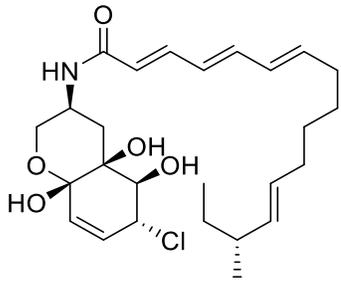
Tabla 3. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen fúngico. ^{1,30,32,33}

 <p>Ergolina (Vasoconstrictor) <i>Claviceps purpurea</i></p>	 <p>Griseofulvina (Antifúngico) <i>Penicillium griseofulvum</i></p>	 <p>Ciclosporina A (Inmunosupresor) <i>Trichoderma polysporum</i></p>	 <p>Mevastatina (Hipocolesteromiante) <i>Penicillium citrinum</i></p>
 <p>Penicilina (Antibiótico) <i>Penicillium chrysogenum</i></p>	 <p>Azoxistrobina (Antifúngico) <i>Strobilurus tenacellus</i></p>	 <p>Giberelina (Hormona de crecimiento de plantas) <i>Gibberella fujikuroi</i></p>	 <p>Destruxina A (Antineoplásico) <i>Metarhizium anisopliae</i></p>

La eficacia limitada de las técnicas de HTS y química combinatoria para la generación de moléculas líderes, así como la prevalencia global de enfermedades degenerativas como el cáncer, la artritis reumatoide, la DM, y padecimientos infecciosos resistentes a tratamientos de última generación, han traído como consecuencia un interés renovado por la búsqueda de productos naturales con estructuras novedosas para solventar estos graves problemas de salud contemporáneos. Cabe hacer notar que en este proceso de búsqueda, algunas de las estrategias más exitosas involucran el estudio de organismos provenientes de nichos ecológicos poco explorados, la implementación de métodos analíticos que permitan detectar rápidamente la presencia de moléculas conocidas, la implementación de bibliotecas de productos naturales y el desarrollo de ensayos biológicos que permitan evaluar el potencial farmacológico de moléculas nuevas o reposicionar moléculas con estructura conocida y finalmente, la obtención de análogos estructurales con propiedades farmacocinéticas deseadas a través de procesos de síntesis parcial, biotransformación y/o biosíntesis dirigida.^{4,35}

Los humedales, por ejemplo, son regiones ricas en biodiversidad fúngica, lo cual implica que son una fuente valiosa para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos. Algunas moléculas aisladas a partir de especies fúngicas asociadas a humedales son: brocalia A, retidenona E, viritina A (citotóxicos), aspergifuranona (inhibidor de enzimas α -glucosidasa), alterporriol V (antimicrobiano), dehidroisopenicilida (hipocolesteromiente), entre otros (**Tabla 4**).^{4,36} En el caso de México, el estudio químico de estos ecosistemas ha sido prácticamente nulo, proyectándose como un nicho prometedor para el hallazgo de nuevos esqueletos con potencial para el desarrollo de fármacos.⁴

Tabla 4. Metabolitos fúngicos aislados de humedales.^{4,35}

 <p>Brocacina A (citotóxico) <i>Penicillium brocae</i></p>	 <p>Ritidenona E (citotóxico) <i>Rhytidhysteron rufulum</i></p>	 <p>Dehidroisopenicilida (hipocolesteromiante) <i>Penicillium pinophium</i></p>
 <p>Alterporriol V (antimicrobiano) <i>Stemphylium sp.</i></p>	 <p>Aspergifuranona (Inhibidor de enzimas α- glucosidasas) <i>Aspergillus sp.</i></p>	 <p>Varitina A (citotóxico) <i>Aspergillus vesicolor</i></p>

2.4 Género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* se compone de más de 340 especies y está dividido en 6 subgéneros y 18 secciones. *Aspergillus* sp. se distribuye ampliamente tanto en hábitats extremos, como en suelos, sedimentos marinos, así como en material en descomposición, y representa uno de los géneros con la mayor cantidad de aislamientos.³⁷⁻³⁹ La relevancia de este género radica en la utilidad de algunas especies para la producción de sake (*A. oryzae*), ácido cítrico (*A. niger*), lovastatina (*Aspergillus terreus*), y por otra parte, la producción de micotoxinas de importancia en la industria alimentaria y la salud.⁴⁰

Desde el punto de vista químico, este género posee un alto potencial metabólico y proporciona un recurso significativo para el descubrimiento de moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos y/o agroquímicos. Actualmente se conoce que las especies del género biosintetizan una variedad importante de esqueletos carbonados, entre los que destacan los policétidos, péptidos, terpenos y alcaloides, por tan solo mencionar algunos; por tal motivo, el género representa una fuente invaluable para la obtención de moléculas novedosas y funcionales (**Tabla 5**).⁴¹⁻⁴³

En particular las especies localizadas en la sección *Terrei*, son conocidas por producir compuestos únicos y diferentes al resto de las especies del género, algunos ejemplos incluyen las butirrolactonas, la aspochalasininas, los asterriquinoles, las citreoviridinas, las citrininas, las geodinas, las mevinolinas y los ácidos terreicos. En esta sección se encuentra la especie *A. terreus*, un organismo ubicuo con elevado potencial metabólico (**Tabla 6**),^{42,44,45} capaz de producir butirrolactona I (**1**), que es quizá el compuesto marcador de la especie; esta molécula ha dado origen a una gran cantidad de derivados, mismos que han demostrado poseer actividad biológica similar a la del producto natural, destacándose aquélla como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas (**Tabla 7**).^{31,46,47}

Tabla 5. Productos naturales obtenidos del género *Aspergillus* sp.⁴¹⁻⁴³

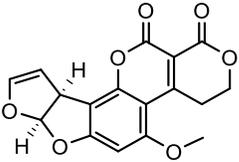
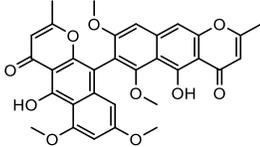
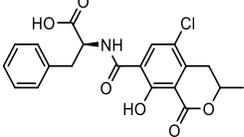
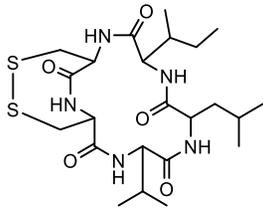
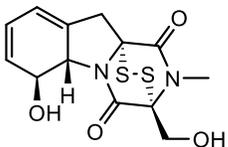
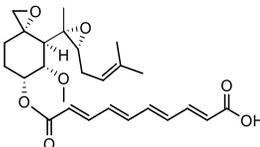
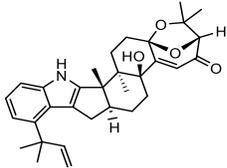
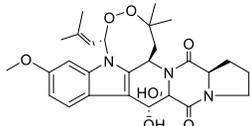
 <p>Aflatoxina G1 (Cancerígeno) <i>A. parasiticus</i></p>	 <p>Aurasperona A (Antibacteriano) <i>A. niger</i></p>	 <p>Ocratoxina A (Nefrotóxico) <i>A. ochraceus</i></p>	 <p>Malformina A (Inhibidor de interleucina 1β) <i>A. niger</i></p>
 <p>Gliotoxina (Inmunosupresor) <i>A. fumigatus</i></p>	 <p>Fumagilina (Antibacteriano) <i>A. fumigatus</i></p>	 <p>Aflaterma (Insecticida) <i>A. flavus</i></p>	 <p>Verruculogen (Insecticida) <i>A. nidulans</i></p>

Tabla 6. Productos naturales aislados de *Aspergillus terreus*.^{42,44,45}

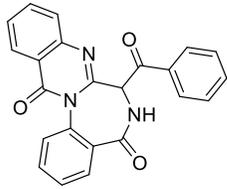
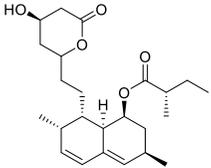
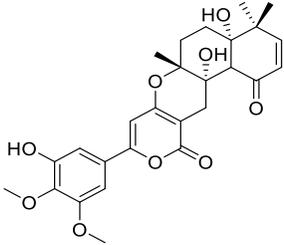
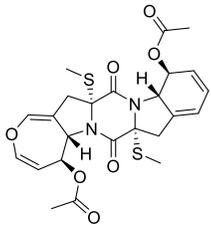
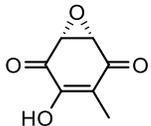
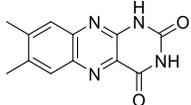
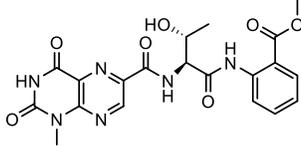
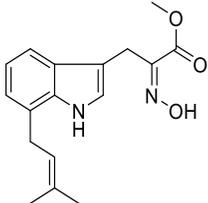
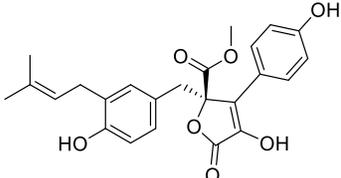
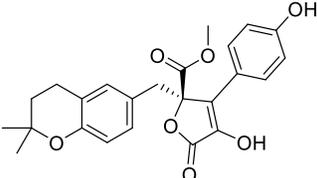
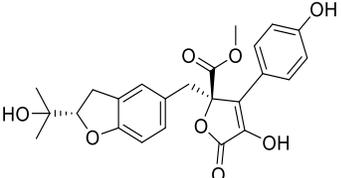
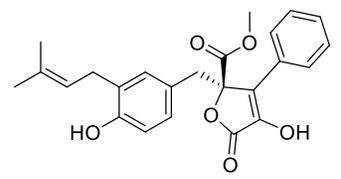
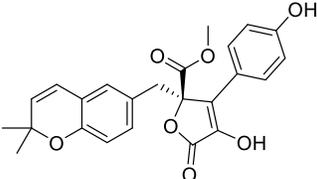
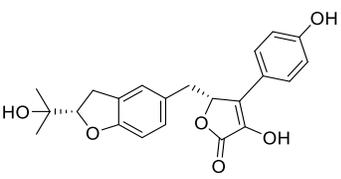
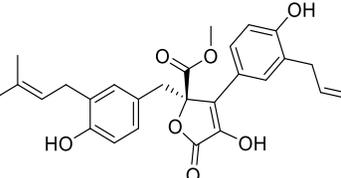
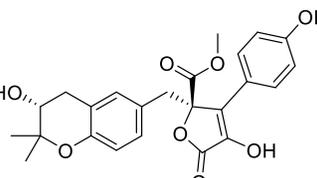
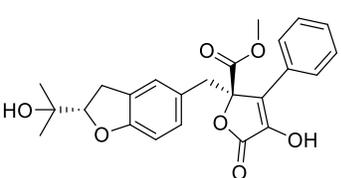
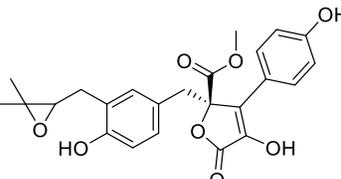
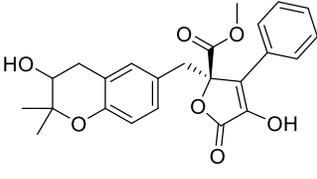
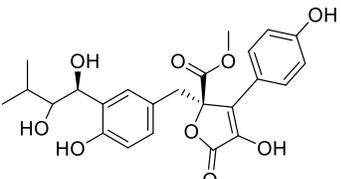
 <p>Novobenzomalvina C</p>	 <p>Lovastatina (9)</p>	 <p>Territrema D</p>	 <p>Bisdetiobis(metil)-acetilapoaranotina</p>
 <p>Ácido terreico</p>	 <p>Lumicroma</p>	 <p>Terrelumamida A</p>	 <p>Luteórida E</p>

Tabla 7. Metabolitos con núcleo similar a la butirolactona I (1) producidos por *Aspergillus terreus*.^{31,46,48}

 <p>Butirolactona I (1)</p>	 <p>Aspernólida A (2)</p>	 <p>Butirolactona IV (7)</p>
 <p>Versicolactona B</p>	 <p>Aspernólida E</p>	 <p>Aspérlida C</p>
 <p>(+)-3',3'-di-(dimetilalil)- butirolactona II</p>	 <p>Butirolactona V</p>	 <p>Aspérlida B</p>
 <p>Butirolactona III</p>	 <p>Aspérlida A</p>	 <p>Aspernólida D</p>

2.5 Modificaciones estructurales.

Los productos naturales son una fuente valiosa para el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que poseen una diversidad estructural única, sin embargo, no siempre poseen las características fisicoquímicas, farmacológicas y/o toxicológicas apropiadas para ser empleados de forma directa en medicina humana o veterinaria. En este sentido, las modificaciones estructurales son la herramienta de primera elección para enfrentar dicha problemática, puesto que permiten resolver las limitaciones de solubilidad, inestabilidad química, toxicidad, problemas en el proceso de liberación, absorción, metabolismo y eliminación (LADME), y en algunos casos, incrementan la potencia y selectividad de los productos de partida. Esta estrategia ha contribuido significativamente (40%) al desarrollo de medicamentos, especialmente en el periodo de 1981 a 2010.^{5,6}

El descubrimiento de nuevas moléculas provenientes de fuentes naturales con afinidad y selectividad sobre distintas dianas terapéuticas ha incrementado el interés por desarrollar nuevos fármacos usando productos naturales como estructura base. Un ejemplo exitoso es la ixabepilona (**Figura 2**)^{5,6} usada para el tratamiento de cáncer de mama, obtenida por semisíntesis a partir de epothilona B (*Soragium cellulosum*), una molécula con excelente actividad antineoplásica pero con propiedades farmacocinéticas pobres, que impedían ejercer su efecto terapéutico.

Además, las modificaciones estructurales de productos naturales han contribuido al desarrollo de nuevos candidatos para el tratamiento de distintas enfermedades, algunos ejemplos son la berberina (*Berberis aristata*), una molécula que posee diversas actividades biológicas (antifúngico, antineoplásico, antiinflamatorio, antihiper glucémico y antihiperlipidémico), que dio origen a la cloroberberina (**Figura 3**), un producto menos tóxico que el prototipo, con posible aplicación en pacientes hiperglucémicos.^{5,49,50}

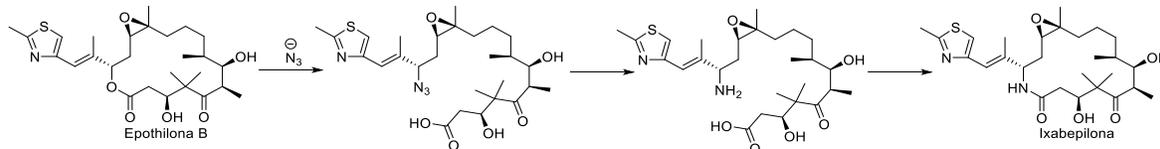


Figura 2. Semisíntesis de ixabepilona.

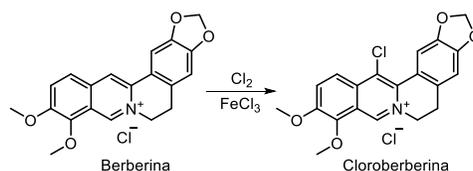


Figura 3. Semisíntesis de la cloroberberina.

3. JUSTIFICACIÓN

México ocupa el sexto lugar de prevalencia en DMTII a nivel mundial. Esta enfermedad y sus complicaciones representaron la segunda causa de muerte en la población mexicana en 2016, constituyendo uno de los mayores problemas de salud pública en nuestro país. Por esta razón, la búsqueda de compuestos que prevengan la aparición de complicaciones asociadas a esta enfermedad y aumenten la calidad y expectativa de vida de los pacientes, es una actividad primordial. La estrategia planteada en este proyecto de investigación tuvo como objetivo principal contribuir al descubrimiento de nuevos agentes antihiper glucémicos, a través del estudio químico de microorganismos fúngicos de hábitats inexplorados y la generación de análogos estructurales como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

4. HIPÓTESIS

El estudio químico del hongo *Aspergillus terreus* (IQ-046) en conjunto con herramientas de semisíntesis, permitirá incrementar la diversidad estructural y farmacológica de los metabolitos secundarios producidos por este microorganismo, en la medida de lo posible, obtener nuevos candidatos para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de la DMTII.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Obtener metabolitos secundarios y derivados semisintéticos con actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas a partir de *Aspergillus terreus* (IQ-046), para el tratamiento de la DMTII.

5.2 Objetivos específicos.

- Aislar microorganismos del sedimento de humedal de la región de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México.
- Cultivar la especie fúngica *Aspergillus terreus* (IQ-046) en mediana escala para obtener la mayor cantidad del extracto posible.
- Realizar el estudio químico del extracto orgánico de la especie fúngica *A. terreus* (IQ-046).
- Determinar la estructura de los metabolitos secundarios aislados de *A. terreus* (IQ-046).
- Realizar la modificación estructural de un metabolito secundario caracterizado previamente (Butirolactona I, **1**).
- Evaluar el potencial de los derivados semisintéticos y productos naturales como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.
- Determinar los probables sitios de unión de los productos aislados con la enzima α -glucosidasa (Código PDB: 3A4A), a través de estudios de acoplamiento molecular.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Obtención de muestras.

Las muestras biológicas (sedimento) para el aislamiento de microorganismos fúngicos se recolectaron en los humedales ubicados en la región de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México, coordenadas geográficas: latitud 21°25'01.7"N y longitud 97°26'56.7"O (**Figura 4**).

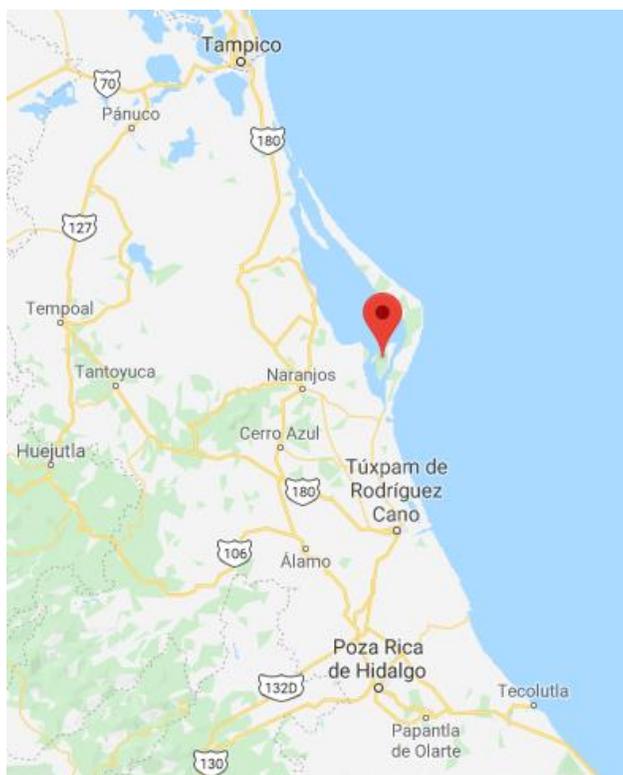


Figura 4. Ubicación del manglar en Tamiahua-El ídolo (21°25'01.7"N 97°26'56.7"O).

6.2 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos.

Los hongos IQ-046 a IQ-050 se aislaron de una muestra de sedimento. Para lograr el aislamiento de microorganismos fúngicos, se preparó una suspensión de 1 g de sedimento en 9 mL de agua estéril. A partir de la solución stock se prepararon las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} p/v. A continuación, 200 μ L de cada suspensión se vertieron en una caja Petri con Agar papa-dextrosa (APD) y amoxicilina (500 mg/L). Este último paso se realizó por duplicado. Las cajas se dejaron en crecimiento por aproximadamente 48-72 horas a temperatura ambiente, y se monitoreó el crecimiento de los organismos fúngicos tratando de tomar un inóculo cada vez que

se observara un nuevo crecimiento. Una vez aislados los microorganismos fúngicos, se les asignó una clave de identificación alfanumérica.

Para cada microorganismo se prepararon dos cultivos semilla en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL con 15 mL de medio caldo papa dextrosa (CPD, marca MCDLab®). Posteriormente, los cultivos semilla se vertieron a dos matraces estériles uno con 12 g de arroz y otro con 10 g de cereal (Cheerios®). Los cultivos se dejaron crecer por 30 días a temperatura ambiente con periodos normales de luz-oscuridad.

6.3 Obtención de los extractos orgánicos.

Después del periodo de fermentación se obtuvo el extracto orgánico. Este procedimiento consistió en añadir 60 mL de una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂:MeOH a cada matraz, para luego fragmentar la biomasa y posteriormente dejar en maceración durante 12 horas a temperatura ambiente. Una vez terminado el periodo de maceración se procedió a filtrar al vacío cada cultivo, lavando los residuos fúngicos con 90 mL de CH₂Cl₂. Posteriormente, se realizó un reparto con 75 mL de agua destilada. Cada fracción orgánica se concentró a presión reducida, mientras que las fracciones acuosas fueron desechadas. Finalmente se reconstituyó cada extracto orgánico con 100 mL de hexano y se realizó un segundo reparto empleando una mezcla 1:1 de MeCN:MeOH, de este segundo reparto se conservaron las fracciones de MeCN:MeOH, las cuales se concentraron a presión reducida. Las fracciones de hexano fueron descartadas. El rendimiento de los extractos obtenidos se resume en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Extractos orgánicos de los hongos en medio de arroz y cereal.

Microorganismo Fúngico	Medio	Código	Rendimiento (mg)	Medio	Código	Rendimiento (mg)
IQ-046	Cereal	01001-20-3	445	Arroz	01001-20-8	273
IQ-047		01001-20-4	179.5		01001-20-9	90.0
IQ-048		01001-20-5	79.0		01001-20-10	124.2
IQ-049		01001-27-1	245.1		01001-20-7	268.8
IQ-050		01001-27-3	179.1		01001-27-4	65.9

6.4 Procedimientos cromatográficos generales.

Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF), se realizaron empleando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de Merck (tamaño de partícula 3.5 a 7.0 ASTM y 0.25 mm de espesor). Para la elución de las muestras se utilizaron diversas mezclas de disolventes orgánicos (hexano, CH₂Cl₂, MeOH y AcOEt). La visualización de las placas se realizó empleando una lámpara de UV a 250 y 365

nm. Se empleó sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico concentrado como agente revelador.

Los análisis de cromatografía en columna abierta (CCA) se realizaron con gel sílice como fase estacionaria (Macherey-Nagel 230-400) y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de hexano:CH₂Cl₂.

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizaron en un equipo marca Waters®, equipado con un detector UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un auto-muestreador (2707) y un módulo de colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo, así como la adquisición y manejo de los datos se efectuó con el programa Empower versión 3.0 Waters. Los análisis cromatográficos de tipo analítico se hicieron en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 (5 µm, 250 × 10 mm). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La detección de los compuestos se realizó a diferentes longitudes de onda (200-800 nm).

6.5 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H, 700 MHz) y de carbono (RMN-¹³C, 175 MHz) se registraron en un equipo Bruker AVANCE III HD 700 MHz, empleando las señales residuales de cloroformo deuterado (CDCl₃) como referencia para los desplazamientos químicos (δ).

Los espectros de masas se obtuvieron empleando ionización por “electrospray” (EM-ESI-AR), en modo positivo y negativo, las determinaciones fueron llevadas a cabo en un espectrometro de masas Thermo Q-Exactive (Thermo Fischer Inc., MA, EUA.). El control del instrumento y el análisis de datos se realizaron con el programa Excalibur 3.0 (Thermo). El registro de los espectros se llevó a cabo en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, UNCG, Carolina del Norte, EUA.

6.6 Ensayo de inhibición de α-glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los estudios de inhibición *in vitro* se efectuaron con la enzima α-glucosidasa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich®), a una concentración de 1 U/mL. Como sustrato se empleó *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (*p*-NPG) a una concentración final de 0.5 mM. Los ensayos se realizaron en solución amortiguadora de fosfato 100 mM, pH 7.0. Se utilizó una solución 30 mM de acarbosa como control positivo. Las determinaciones se realizaron mediante un ensayo espectrofotométrico a 405 nm en placas de 96 pozos a 37°C. Para llevar a cabo la reacción, a cada pozo se le adicionaron 83 µL de buffer de fosfatos, 5 µL de enzima,

10 µL de sustrato y 2 µL de muestra (10 mg/mL), control positivo o metanol (blanco). Las absorbancias se registraron en un lector de placas Synergy HT. La obtención y análisis de datos se hizo con el programa Gen 5 y GraphPad Prism 6.0. El extracto orgánico y las fracciones se evaluaron a 200 ppm, mientras que los compuestos puros se valoraron a 100 ppm. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición } \alpha\text{GHY} = \left(1 - \frac{A_{405} \text{ Muestra}}{A_{405} \text{ Blanco}} \right) * 100$$

Donde % de Inhibición de αGHY representa el porcentaje de inhibición enzimática de la enzima α-glucosidasa de levadura; A_{405} Muestra representa la medición al tiempo cero menos la lectura después de 30 minutos y A_{405} Blanco representa la medición después de 30 min de incubación a 37°C menos la lectura al tiempo cero.

6.7 Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado.

La identificación taxonómica del hongo seleccionado (IQ-046) se realizó mediante la secuenciación molecular de la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADNr. La región ITS se amplificó usando los cebadores: forward ITS1 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y reversa con ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') por la técnica de PCR. Las concentraciones finales para las reacciones de PCR para una solución de 25 µL fueron las siguientes: 10 ng de ADNr del microorganismo, 0.8 pM de cada cebador, 0.2 mM de dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brasil). Las condiciones de reacción fueron 94 °C durante 10 min; 35 ciclos de 45 a 94 °C, 45 a 58 °C y 60 a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) El material genético obtenido se secuenció en un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) utilizando el cebador ITS1.

La secuencia ITS del microorganismo IQ-046 fue comprada con la biblioteca GenBank empleando una búsqueda con BLAST. Se obtuvo una colección de muestras relacionadas taxonómicamente con el hongo, empleando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias de ADN se alinearon con CLUSTAL X, se confirmaron visualmente en BIOEDIT. El análisis de las secuencias por máxima verosimilitud se realizó con el programa PhyML. Se seleccionó el modelo GTR + G + I (α = 0.401 para la distribución gamma; A = 0.18, C = 0.31, G = 0.28, T = 0.23; p-inv = 0.281) para la construcción del árbol. Se ejecutaron mil réplicas de arranque para evaluar la confianza en cada nodo. *Histoplasma capsulatum* se utilizó como grupo control. La secuencia para la región

ITS del aislado fúngico IQ-046 se encuentra en la base de datos GenBank con el número de acceso MT254737. El procedimiento anterior se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez del IPICYT, San Luis Potosí, México.

6.8 Estudio químico del hongo IQ-046.

6.8.1 Cultivo en mediana escala.

Para la realización de cultivos a mediana escala el hongo seleccionado se cultivó en cuatro placas de APD por un periodo de cinco días. Posteriormente el hongo IQ-046 se transfirió a ocho tubos cónicos con 15 mL de medio CPD. El hongo se dejó crecer en este medio durante cinco días con periodos normales de luz-oscuridad a temperatura ambiente. Al término de este periodo de tiempo cada tubo se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 10 g de cereal. El crecimiento en este medio se llevó a cabo durante 28 días con periodos normales de luz-oscuridad a temperatura ambiente. La preparación del extracto orgánico se realizó de acuerdo con la estrategia indicada en el punto 6.3.

6.8.2 Fraccionamiento del Hongo IQ-046.

Aproximadamente 2.5 g del extracto orgánico se fraccionaron mediante CCA en una columna de vidrio empacada con gel de sílice como fase estacionaria, y como fase móvil diversas mezclas de disolventes orgánicos con polaridad creciente entre hexano y AcOEt. De este fraccionamiento se obtuvieron 193 fracciones, las cuales se agruparon en 28 con base en su similitud cromatográfica (**Tabla 9**).

Tabla 9. Rendimientos obtenidos del fraccionamiento primario.

Eluatos	Fracción	Rendimiento (mg)	Eluatos	Fracción	Rendimiento (mg)
1-10	F ₁	4.2	49-71	F ₇	8.8
11-14	F ₂	4	72-77	F ₈	2.6
15-18	F ₃	27.5	78-79	F ₉	1
19-33	F ₄	14.7	80-83	F ₁₀	3.9
34-43	F ₅	3.5	84-85	F ₁₁	0.9
44-48	F ₆	1.9	86-91	F ₁₂	2.6
92-101	F ₁₃	28.7	148-157	F ₂₁	30
102-111	F ₁₄	526.7	158-162	F ₂₂	5.8
112-115	F ₁₅	240.7	163-175	F ₂₃	34.7
116-117	F ₁₆	92.8	176-181	F ₂₄	21.1
118-121	F ₁₇	132.4	182-186	F ₂₅	12.3
122-127	F ₁₈	192	187	F ₂₆	1.8
128-133	F ₁₉	26.8	188-189	F ₂₇	2.4
134-147	F ₂₀	148.8	190-193	F ₂₈	5.2

6.8.3 Aislamiento de la butirolactona I (1).

La butirolactona I (1) se aisló como un sólido vítreo amarillo a partir de las fracciones F₁₄-F₁₆. Su estructura se elucidó por comparación de sus constantes espectroscópicas (RMN-¹H, RMN-¹³C, mono y bidimensionales) y espectrométricas (EM-ESI-AR), con las reportadas en la literatura.⁵¹⁻⁵⁴

6.8.3 Aislamiento de la butirolactona IV (7).

La butirolactona IV (7.9 mg) se aisló y purificó por CLAE en modo semipreparativo, a partir de la fracción F₂₀ (17 mg). La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 45% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua durante 10 min, con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 5**).

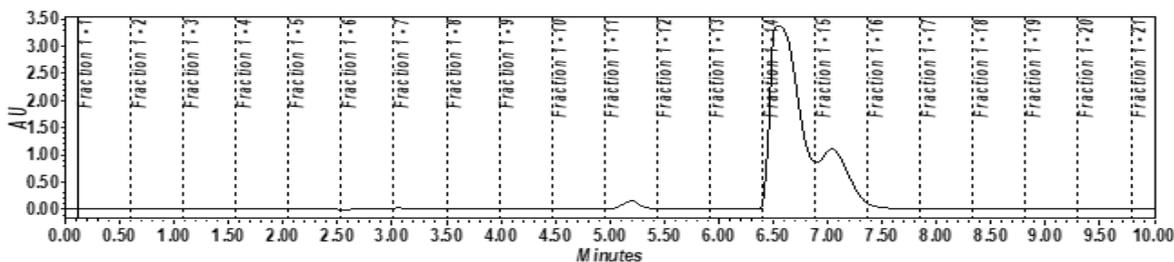


Figura 5. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento de la butirolactona IV (7).

6.8.4 Aislamiento de la chrisamida B (8).

La chrisamida B (4.6 mg) se aisló y purificó por CLAE en modo semipreparativo a partir de la fracción F₂₃. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 45% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua durante 25 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 6**).

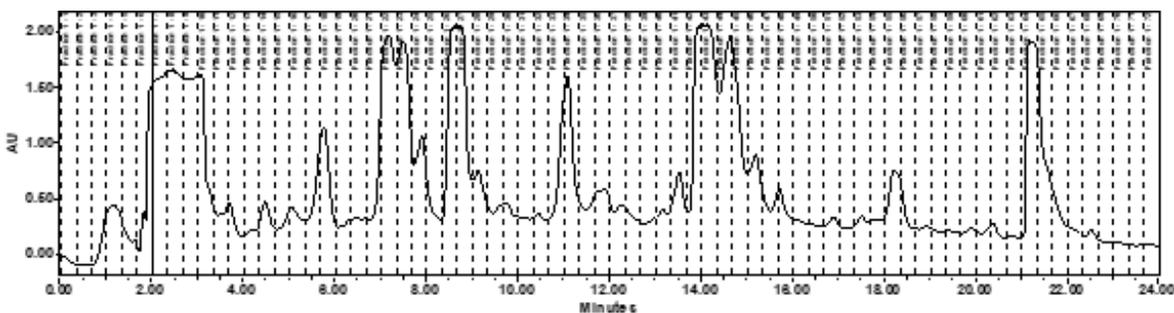


Figura 6. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento de la chrisamida B (8).

6.8.5 Aislamiento de la lovastatina (9).

La lovastatina (8.5 mg) se aisló y purificó por CLAE en modo semipreparativo a partir de la fracción F₂₁. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex

Gemini NX-C18 y como fase móvil 50% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua hasta 70% durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 7**).

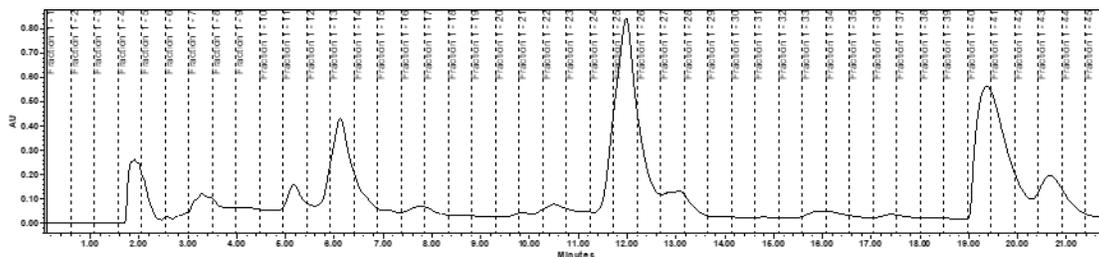


Figura 7. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento de la lovastatina (**9**).

6.8.6 Aislamiento del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (**10**).

El 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (1.3 mg) se aisló y purificó por CLAE en modo semipreparativo a partir de la fracción F₂₂. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 20% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua hasta 80% durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 8**).

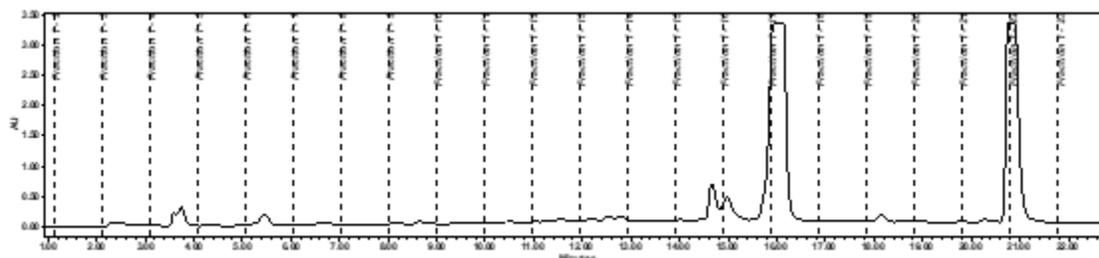


Figura 8. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (**10**).

6.9 Purificación de derivados semisintéticos.

6.9.1 Purificación de aspernólida A (2).

La aspernólida A (4.6 mg) se purificó por CLAE en modo semipreparativo. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 40% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua hasta 60% durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 9**).

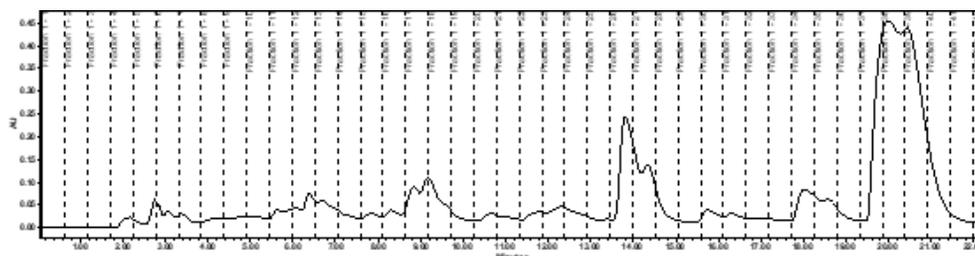


Figura 9. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento de la aspernólida A (2).

6.9.2 Purificación de derivados obtenidos empleando anhídrido propiónico (3 y 4).

Los derivados (3 y 4) se purificaron por CLAE en modo semipreparativo. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 40% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua hasta 60% durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 10**).

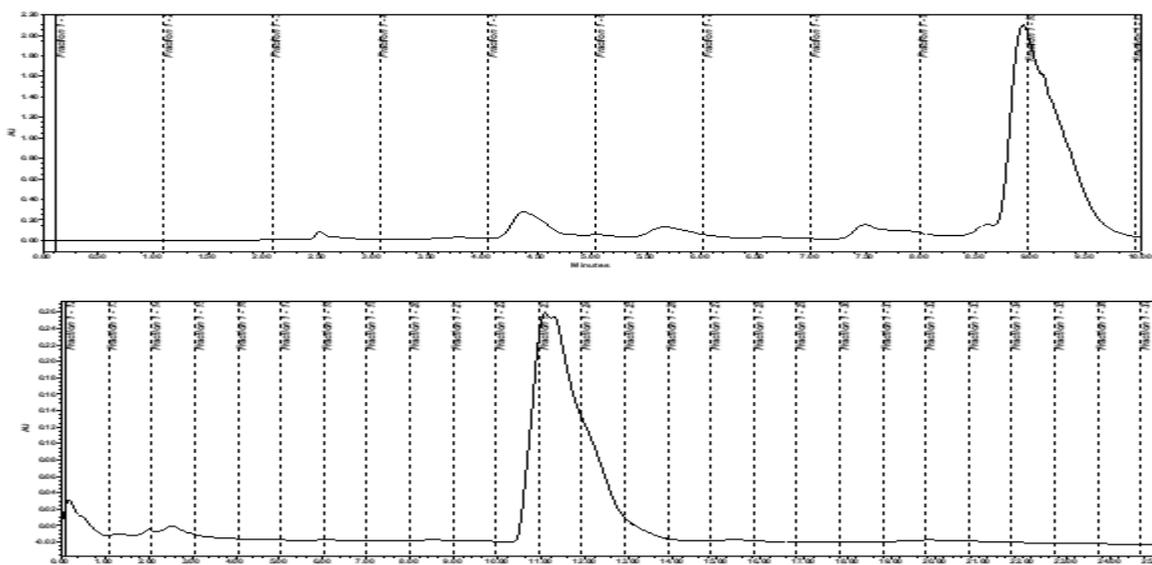


Figura 10. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo para el aislamiento de los derivados 3 y 4.

6.9.3 Purificación de la 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (5).

La 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (1.0 mg) se purificó por CLAE en modo semipreparativo. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 40% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua y 30% de MeOH durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 11**).

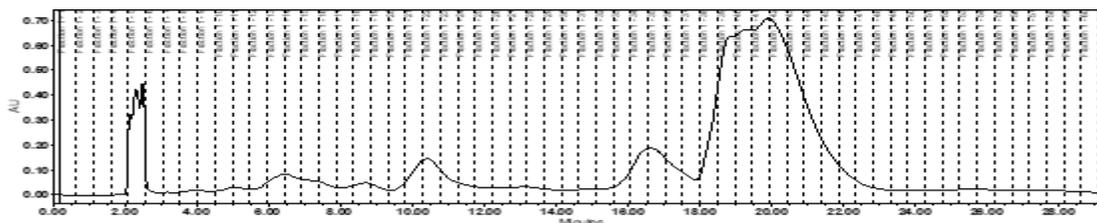


Figura 11. Cromatograma por CLAE (254 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento de la 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (5).

6.9.4 Purificación de la asperteretona D (6).

La asperteretona D (1.4 mg) se purificó por CLAE en modo semipreparativo. La fase estacionaria consistió en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 y como fase móvil 40% de MeCN en ácido fórmico al 0.1 % en agua hasta 100% durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min. (**Figura 12**).

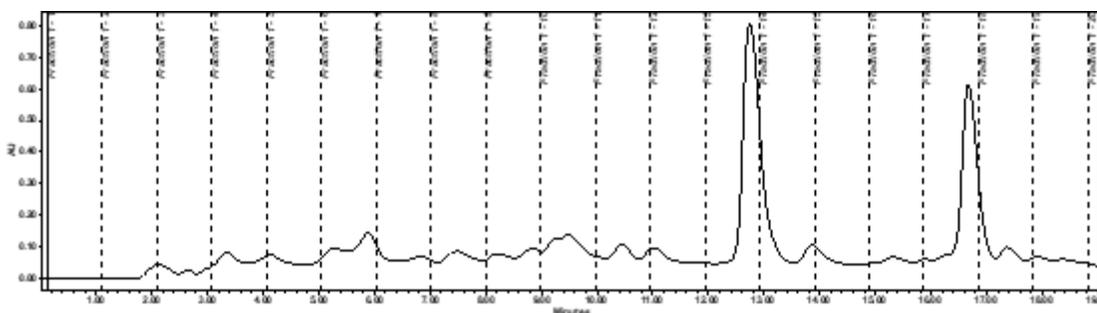


Figura 12. Cromatograma por CLAE (300 nm) en modo semipreparativo, para el aislamiento de la asperteretona D (6).

6.10 Acoplamiento molecular.

6.10.1 Proteína.

La estructura cristalográfica de la enzima α -glucosidasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, α GHY), se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB), con el código 3A4A. La proteína fue preparada para los cálculos de acoplamiento molecular empleando la interfaz gráfica AutoDock (AutodockTool 1.5.6, ADT), en esta plataforma se añadieron los átomos de hidrógeno polares y las cargas de Kollman. Los archivos fueron guardados en un formato apropiado para su posterior uso en Autogrid 4.0 y AutoDock 4.0.

6.10.2 Ligando.

Los ligandos fueron construidos en ChemBioDraw Ultra 13.0 y guardados en formato “.mol”. Posteriormente se optimizó la geometría con el modelo semiempírico AM1 mediante el programa Spartan'10 (www.wavefunction.com). Las moléculas fueron guardadas en formato “.pdb”.

6.10.3 Acoplamiento Molecular.

La predicción de las conformaciones accesibles por ligandos se realizó con el programa AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>) empleando un Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Para la predicción de los sitios y conformaciones de unión de menor energía, se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego en una región de búsqueda (grid) de $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}$ centrada en la proteína. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA, un tamaño de población de 150 individuos, 2.5×10^6 evaluaciones energéticas y 100 corridas. Los resultados fueron analizados utilizando la interfaz ADT 1.5.6 y PyMol 2.2.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento y selección de microorganismos fúngicos.

De las muestras de sedimento de humedal recolectadas se aislaron un total de cinco microorganismos fúngicos, entre los cuales se observan diferencias morfológicas (**Figura 13**), poniendo en evidencia la amplia diversidad fúngica de la zona, misma que se ve reflejada en la diversidad química de los metabolitos secundarios producidos por las especies, como resultado de las complejas interacciones ecológicas.^{55,56}

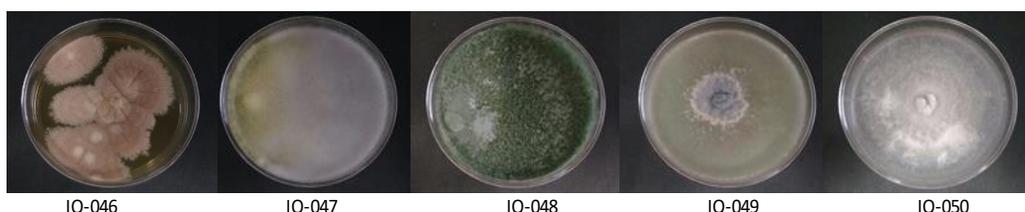


Figura 13. Microorganismos aislados de suelo de manglar.

7.1.1 Determinación de la capacidad inhibitoria de los extractos de microorganismos fúngicos.

Cada uno de los extractos orgánicos obtenidos de los microorganismos fúngicos cultivados en arroz (A) y cereal (C) se evaluaron como inhibidores de la enzima α GHY (**Figura 14**), a una concentración de 200 ppm. Con base en los resultados obtenidos se seleccionó el microorganismo IQ-046 para su posterior estudio químico, tomando en cuenta su excelente actividad biológica y rendimiento.

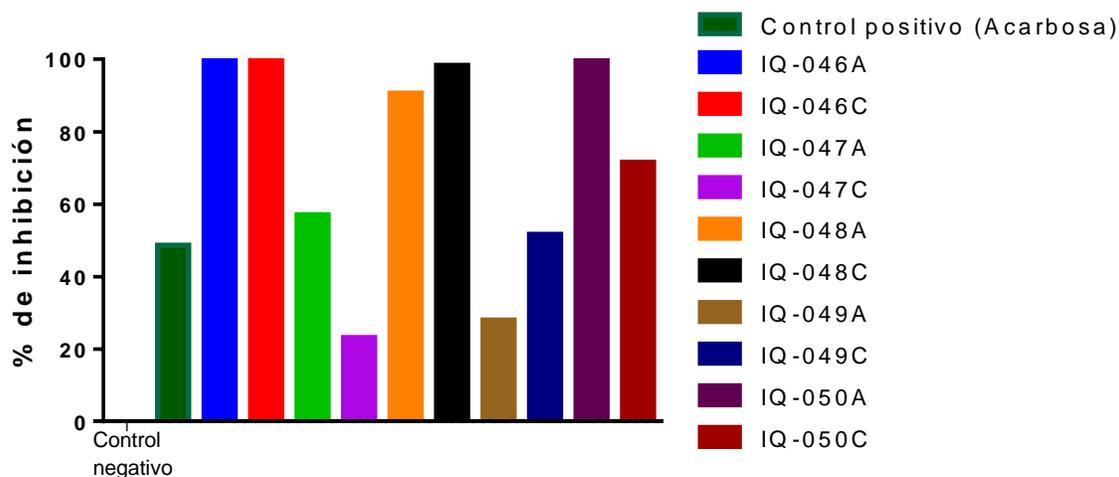


Figura 14. Porcentaje de inhibición sobre la enzima α GHY a 200 ppm de los extractos orgánicos de microorganismos fúngicos, obtenidos de dos medios de cultivo; arroz (A) y cereal (C). Se empleó como control positivo la acarbosa.

7.2 Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado.

El análisis filogenético de las secuencias ITS1 de IQ-046 (**Figura 15**) permitió clasificar a este microorganismo como miembro del género *Aspergillus*, con un 99% de homología. Adicionalmente, la distancia estimada (similitud del 97%) entre la especie *A. terreus* y el hongo seleccionado, permitieron identificar el hongo IQ-046 como *A. terreus*.

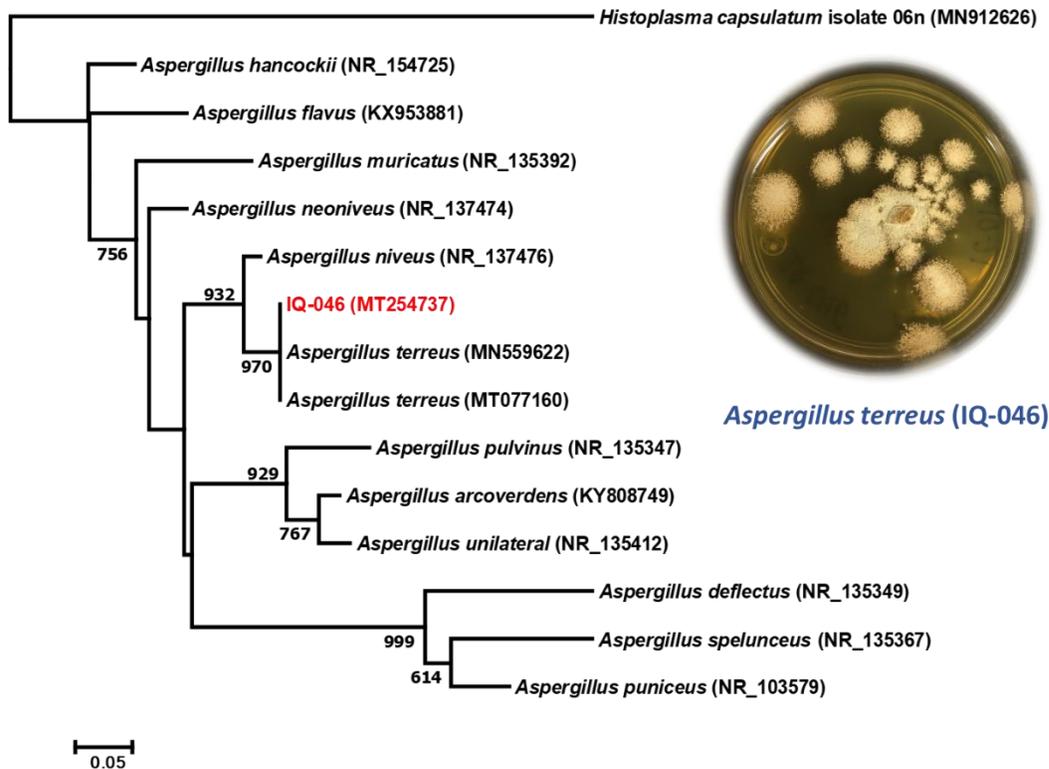


Figura 15. Árbol de máxima verosimilitud de las regiones ITS del hongo IQ-046. *Histoplasma capsulatum* se utilizó como control. La barra de escala indica 5% de divergencia de secuencia estimada. La confianza de cada nodo fue evaluada por 1000 réplicas.

7.3 Estudio químico del hongo IQ-046 y modificaciones estructurales.

El estudio químico del microorganismo IQ-046 permitió el aislamiento de cinco metabolitos secundarios de distintos orígenes biogénicos: la butirolactona I (**1**), la butirolactona IV (**7**), la crisamida B (**8**), la lovastatina (**9**) y un derivado de ácido antranílico (**10**). Todos los metabolitos aislados se caracterizaron por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos reportados en la literatura.^{9,48,61,51-54,57-60} Adicionalmente se logró la semisíntesis de cinco derivados (**2-6**) de butirolactona I (**1**), mediante distintos métodos (**Figura 16**).

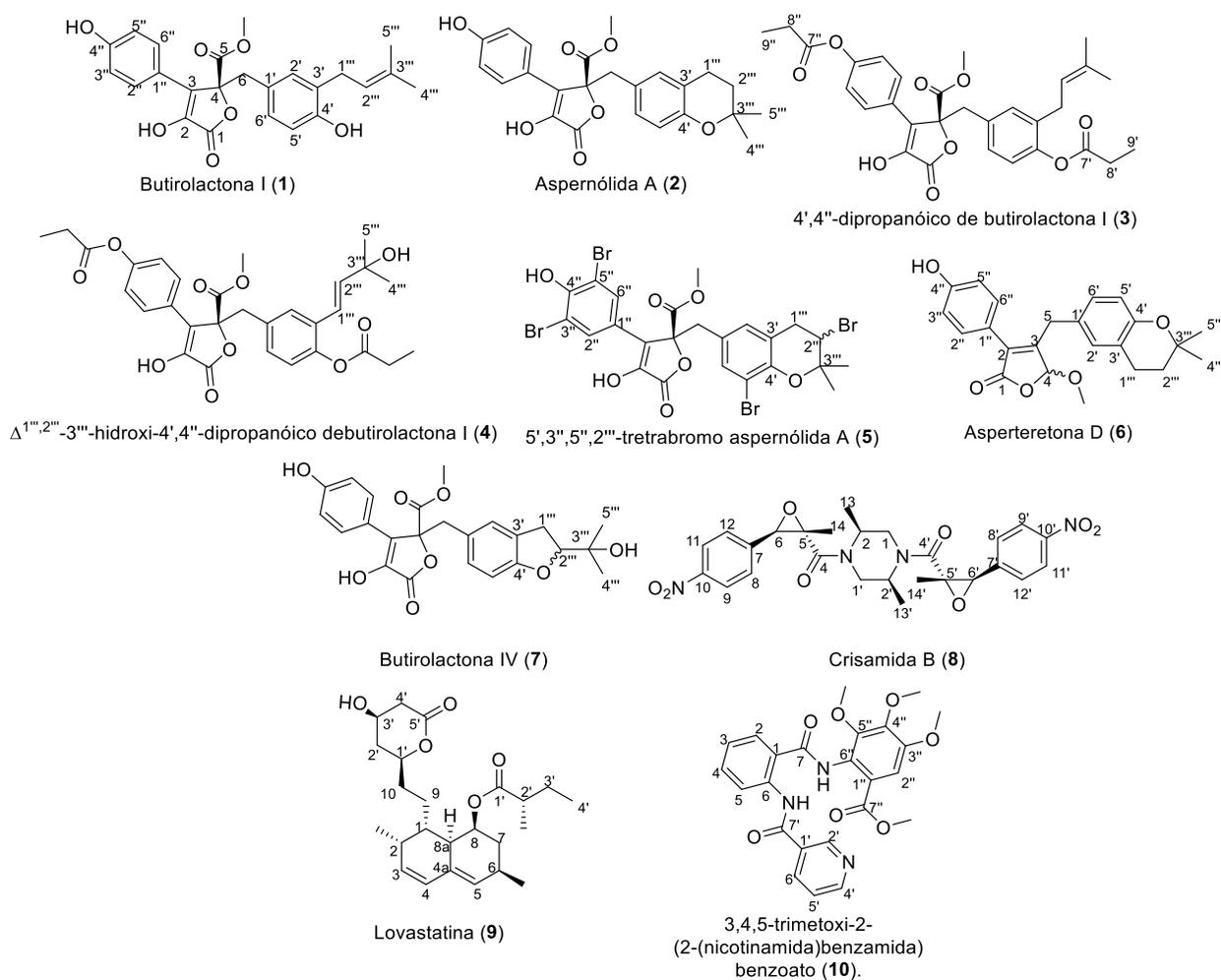


Figura 16. Moléculas aisladas de *Aspergillus terreus* (**1,7-10**) y derivados semisintéticos (**2-6**).

7.3.1 Caracterización de la butirolactona I (1).

La fórmula molecular calculada para este producto fue de $C_{24}H_{24}O_7$, a través del análisis por EM-ESI-AR de la muestra en modo positivo m/z 447.1412 $[M + Na]^+$ (**Figura 17**). En los espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C , y bidimensionales (HSQC y HMBC) (**Figuras 18-21** y **Tabla 10**) se observaron las siguientes señales:

En el espectro de RMN- 1H (**Figura 18**) la señal en δ_H 7.63 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2''/6'') y 6.91 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3''/5'') evidencian la presencia de un anillo aromático *p*-sustituido. Por otro lado, las señales en δ_H 6.60 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, H-6'), 6.54 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5') y 6.52 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2') corresponden a la presencia de un sistema aromático tri-sustituido. En δ_H 3.78 (3H, s, 5-OCH₃) se observa una señal simple intensa, la cual es asignable a un grupo metoxilo de una función éster, además las señales en δ_H 3.56 (2H, d, $J = 14.7$ Hz, H₂-6) y 3.50 (2H, d, $J = 14.7$ Hz, H₂-6) corresponden a un metileno con protones diasterotópicos. En δ_H 3.14 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H₂-1'''), se observa una señal asignable al metileno de la posición 1''' acoplado al metino en δ_H 5.10 (1H, dddd, $J = 8.7, 5.7, 2.8, 1.4$ Hz, H-2'''), finalmente, se observan dos señales para grupos metilo en δ_H 1.69 (3H, s, H₃-5''') y 1.65 (3H, s, H₃-4''').

En el espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 19**), es posible apreciar un conjunto de 24 señales, de las cuales 12 corresponden a carbonos aromáticos siendo dos de estas señales base de oxígeno, además de señales a campos bajos las cuales corresponden a carbonilos de éster en δ_C 169.6 (C-1) y 169.9 (C-5). Se observan tres señales olefínicas en δ_C 137.4 (C-2), 128.3 (C-3) y 121.6 (C-2'''), dos señales que pertenecen a metilenos en δ_C 38.7 (C-6) y 29.5 (C-1'''), y dos señales en δ_C 17.9 y 25.9 corresponden a metilos (C-4''' y C-5''', respectivamente), y por último, dos señales de carbonos unidos oxígeno en δ_C 53.8 (5-OCH₃) y 86.3 (C-4). La estructura química de la butirolactona I (1) se confirmó a través del análisis detallado de los espectros bidimensionales de HSQC y HMBC (**Figuras 18-21** y **Tabla 10**) y por comparación de los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C con los reportados en la literatura.⁵¹⁻⁵⁴

Tomando como referencia estudios previos en los que se demuestra el potencial de la butirolactona (1) como inhibidor de la enzima α -glucosidasa de levadura, se prepararon derivados semisintéticos con la finalidad de aumentar su afinidad hacia esta diana terapéutica. A continuación, se describe la preparación de los derivados de butirolactona I (1) y su caracterización estructural mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

01001-143-6 #1559 RT: 4.90 AV: 1 NL: 1.07E7
T: FTMS + c ESI Full ms [13]

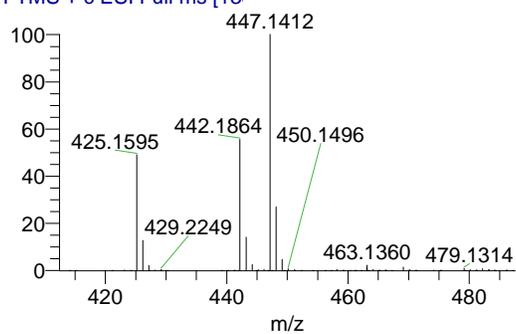


Figura 17. Espectro de masas de alta resolución por electro spray (EM-ESI-AR) en modo positivo del compuesto 1.

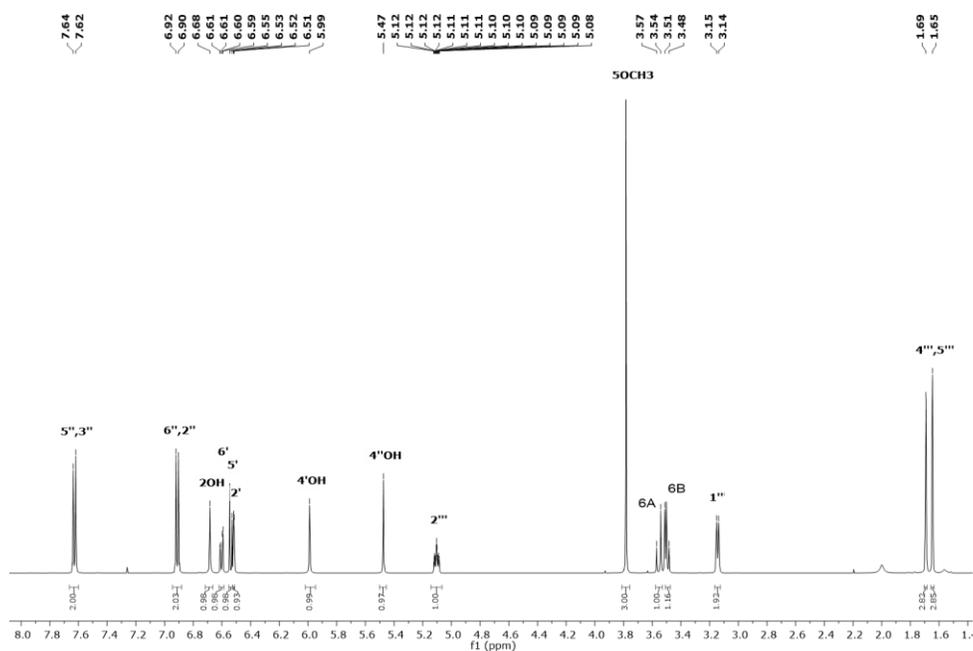


Figura 18. Espectro de RMN-¹H a 700 MHz en CDCl₃ del compuesto 1.

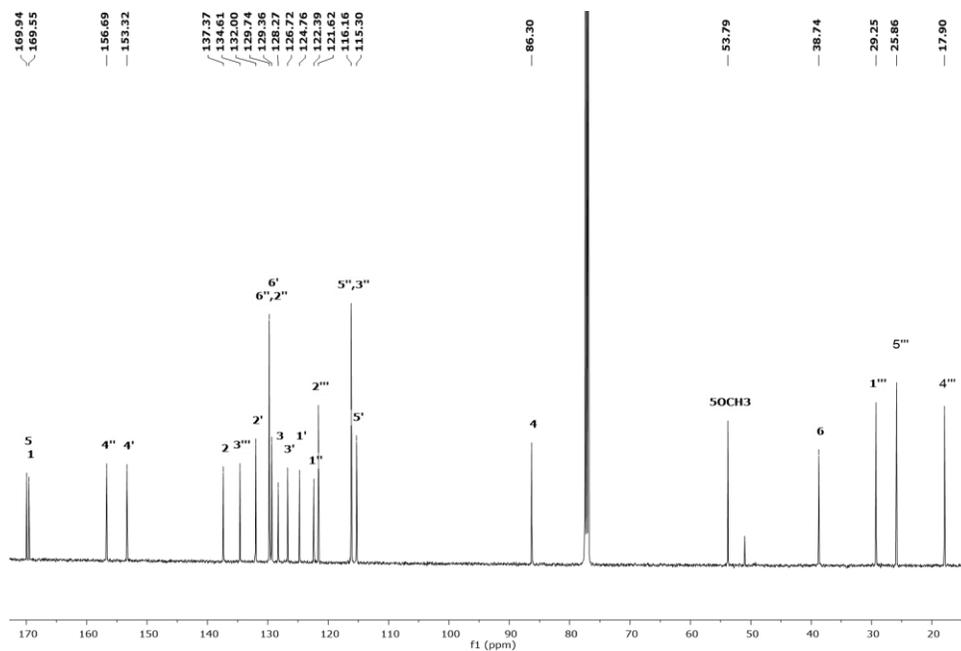


Figura 19. Espectro de RMN-¹³C a 175 MHz en CDCl₃ del compuesto **1**.

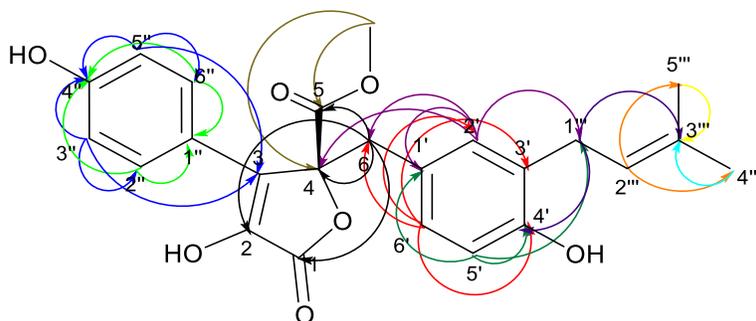


Figura 20. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **1**.

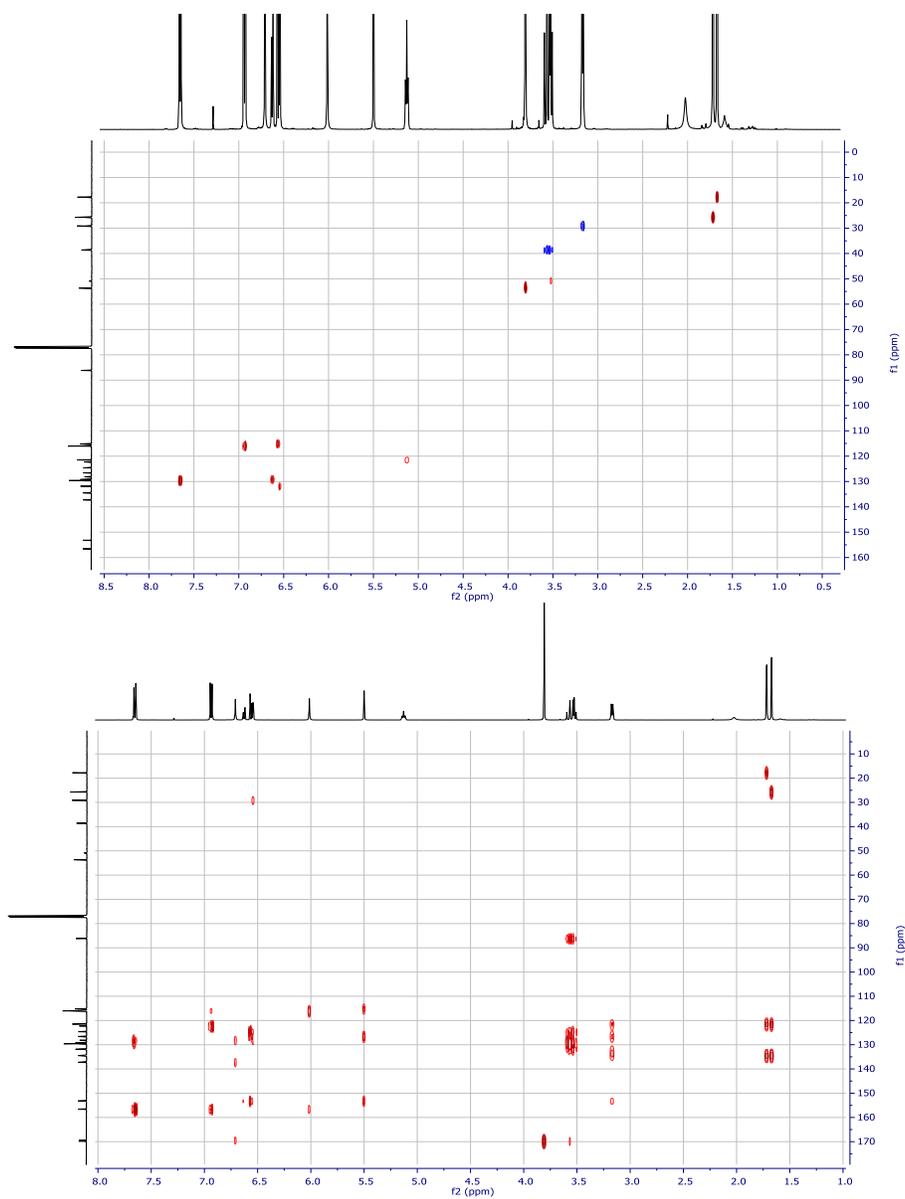


Figura 21. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 1.

7.3.1 Preparación de la aspernólida A (2) a partir de butirolactona I (1).

Debido a que no fue posible el aislamiento de la aspernólida A (2) se planificó su síntesis. La preparación de (2) consistió en una ciclación de la cadena de prenilo del producto natural (1), para generar un anillo de dihidropirano en presencia de HCl (1 N) y metanol como disolvente, a temperatura ambiente (Figura 22). La mezcla de reacción se monitoreó por CCF hasta el final de la reacción.

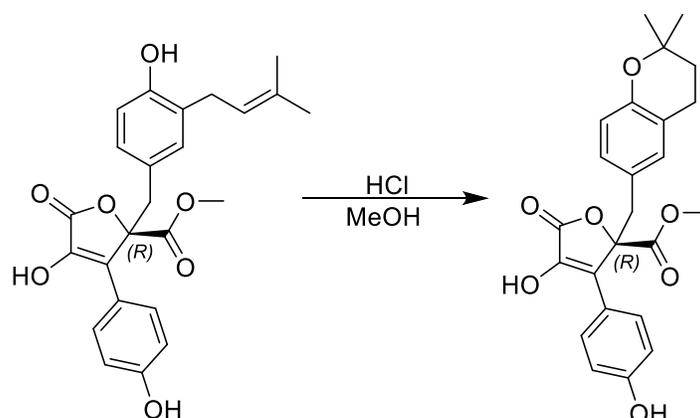


Figura 22. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto 2.

Posterior a la síntesis de la aspernólida A (2) se realizó su caracterización química. Su fórmula molecular se estableció con base en los resultados obtenidos del análisis por EM-ESI-AR en modo positivo, m/z 442.1860 $[M + NH_4]^+$, como $C_{24}H_{24}O_7$ indicando 13 grados de insaturación (Figura 23). Las diferencias más relevantes observadas en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (Figuras 24-27 y Tabla 10) respecto a la butirolactona I (1) se describen a continuación:

En los espectros de RMN- 1H y ^{13}C (Figuras 24 y 25) se observa la ausencia del hidrógeno olefínico en δ_H 5.10 (H-2'''), así como la pérdida de la señal en el espectro de carbono asociada a este hidrógeno, en cambio se observan señales en δ_H 1.72 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H₂-2'''). Por otra parte, la aparición de una señal en δ_C 32.8 indicó la presencia de un anillo de dihidropirano fusionado con un anillo de benceno trisustituido, en lugar de la cadena de prenilo presente en el compuesto 1. La fusión de ambos anillos a través de C-1''' y C-2''' se estableció mediante el análisis del espectro bidimensional de HMBC (Figura 27) en donde el protón en δ_H 2.59 (2H, dt, $J = 16.7, 6.8$ Hz, H₂-1''') y 2.62 (2H, dt, $J = 16.7, 6.8$ Hz, H₂-1''') presenta una correlación con δ_C 131.7, 120.5, 153.1, 32.8 y 74.3 (2', 3', 4', 2''' y 3''', respectivamente) y el protón en δ_H 1.72 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H₂-2''') con C-1''', C-3''', C-4''' y C-5''' los cuales corresponden con δ_C 22.4, 74.3 y 27.0/26.9. Otro dato que confirma la formación de este anillo de dihidropirano es una variación en la multiplicidad de la señal de H₂-1''' con respecto al producto natural, ya que, en 1, se

observa una señal doble, mientras que en la aspernólida A (**2**) se observa una señal múltiple en δ_H 2.59. Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C son congruentes con los reportados previamente, para este compuesto.⁴⁸

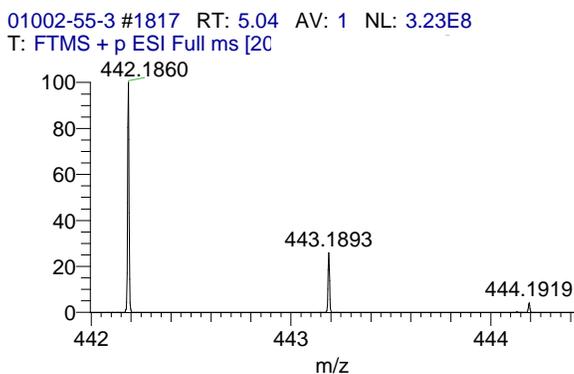


Figura 23. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **2**.

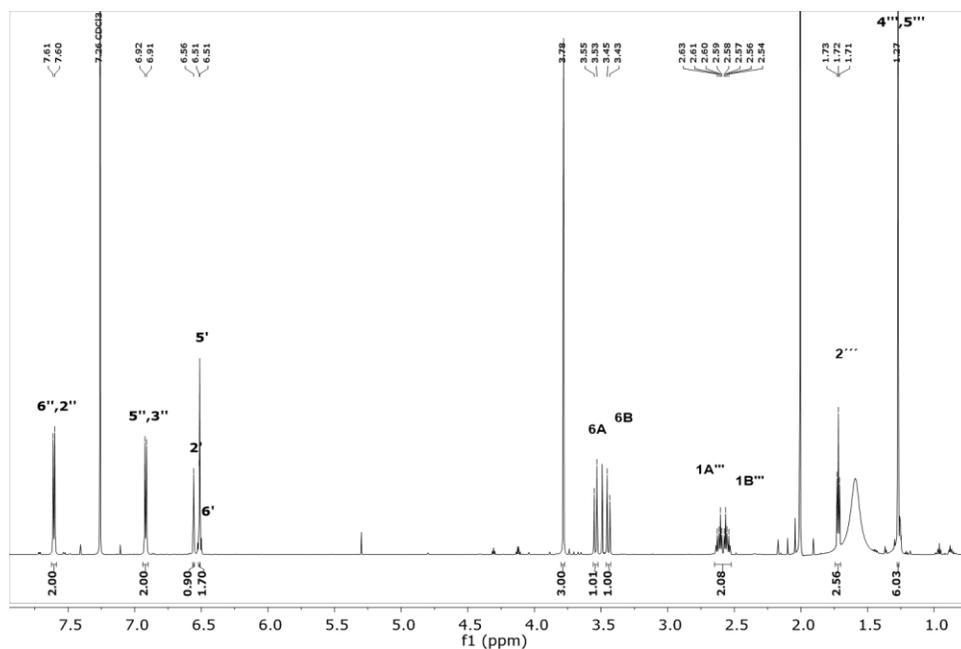


Figura 24. Espectro de RMN- 1H a 700 MHz en $CDCl_3$ del compuesto **2**.

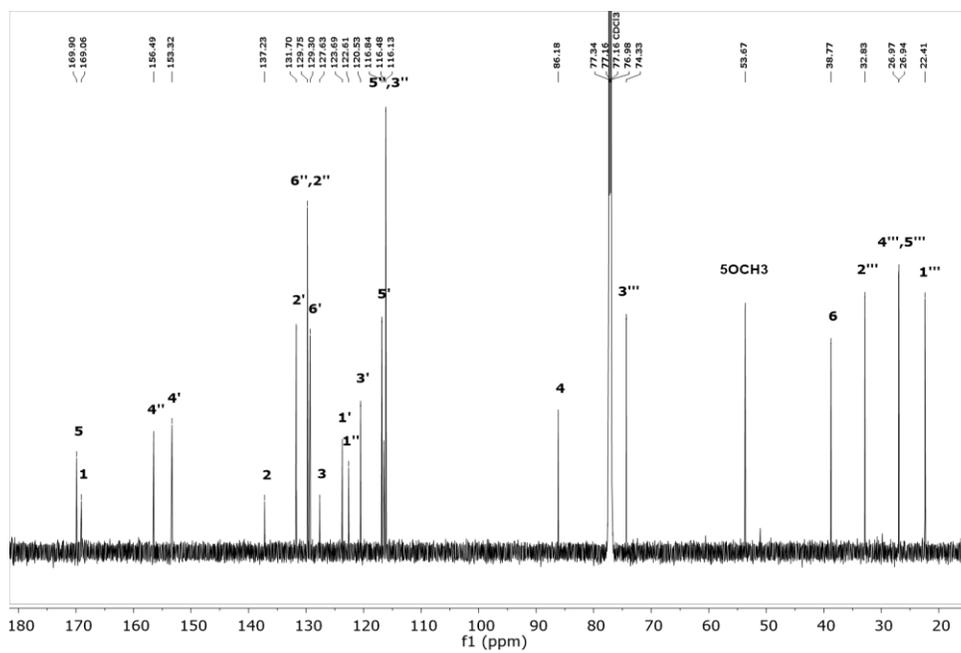


Figura 25. Espectro de RMN-¹H a 175 MHz en CDCl₃ del compuesto **2**.

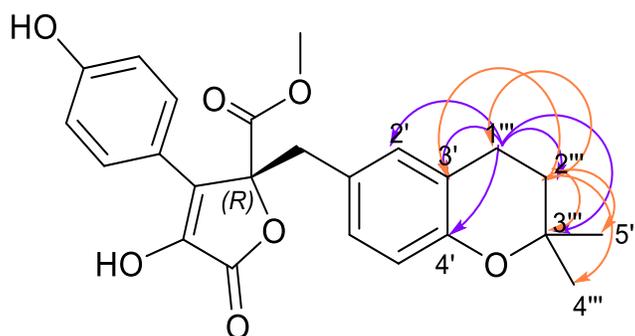


Figura 26. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **2**.

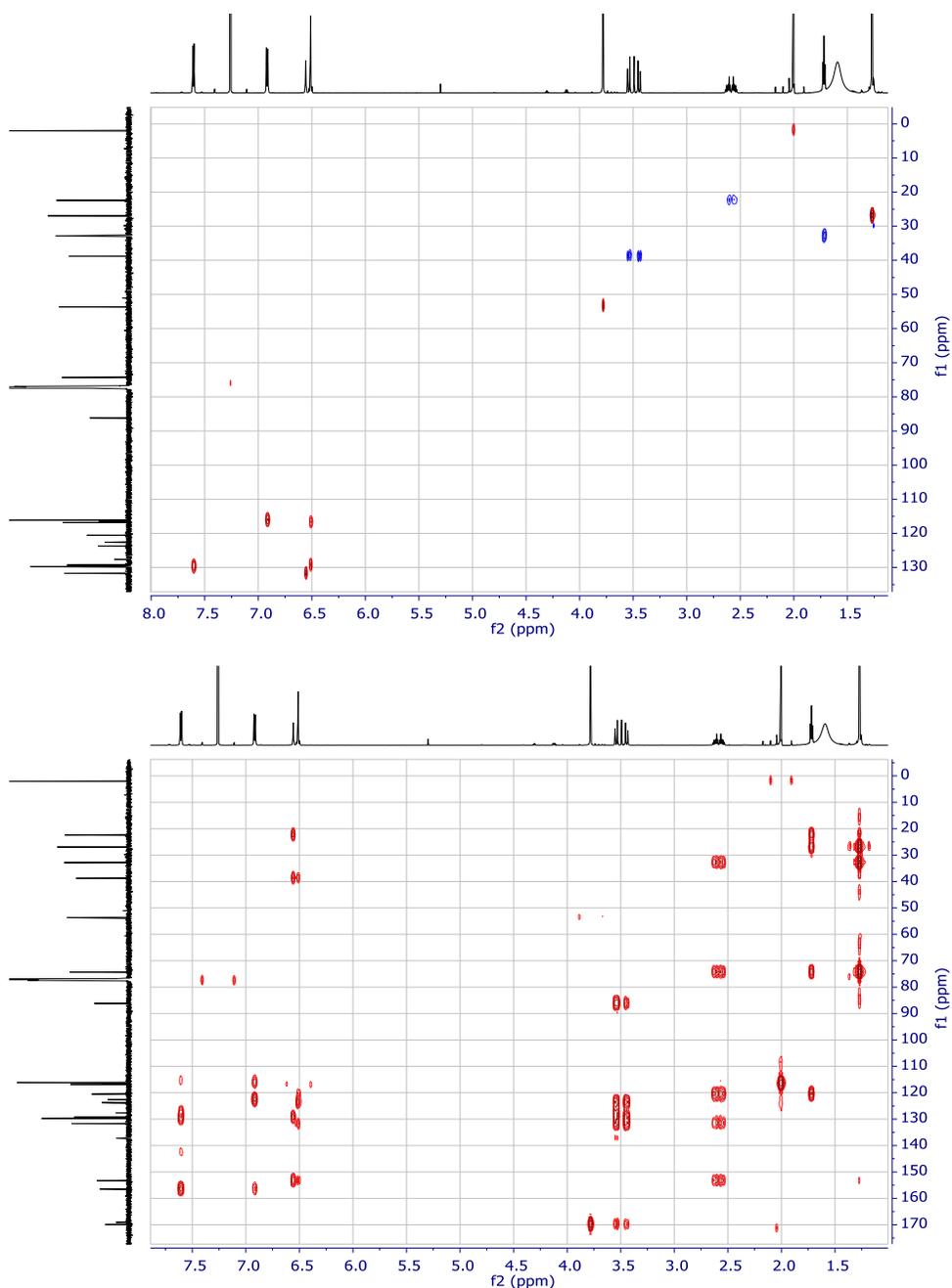


Figura 27. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto **2**.

7.3.1.1 Mecanismo para la formación del compuesto **2**.

El mecanismo de reacción propuesto para la formación del aspernólida A (**2**) a partir de butirolactona I (**1**) inicia con el ataque nucleofílico de la doble ligadura sobre el protón del ácido clorhídrico, favoreciendo la formación de un carbocatión terciario. Posteriormente, los pares de electrones no compartidos del oxígeno fenólico atacan al carbocatión formado mediante una reacción intramolecular generando un anillo de dihidropirano (**Figura 28**).

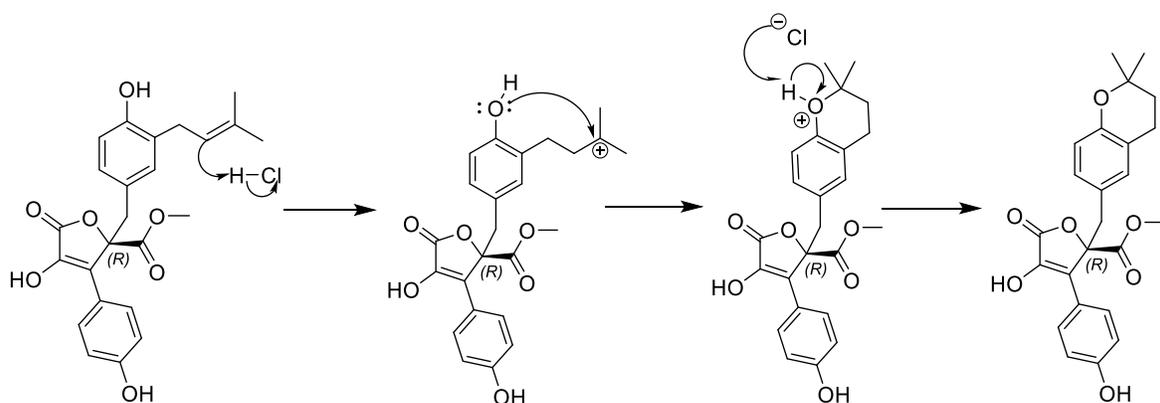


Figura 28. Mecanismo para la formación del compuesto **2**.

7.3.2 Preparación del éster 4',4''-dipropiónico de butirolactona I (**3**).

Se tiene antecedente de la acilación de butirolactona I (**1**) con anhídrido acético.⁸ Empleando una metodología similar se planteó incrementar el número de carbonos de la cadena, utilizando como fuente del grupo acilo, anhídrido propiónico (**Figura 39**). Cabe destacar que la reacción se llevó a cabo en condiciones no anhidras. De esta reacción se obtuvieron dos compuestos, uno de ellos como resultado de la acilación del producto natural (**1**) y el segundo como resultado de la participación de agua durante la formación del producto (**4**). En esta sección se describirán las características principales del compuesto 4',4''-dipropiónico de butirolactona I (**3**).

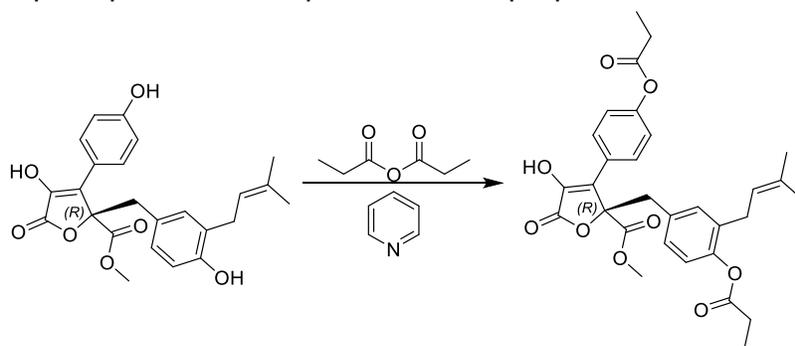


Figura 29. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto **3**.

La fórmula molecular para el compuesto **3** ($C_{30}H_{32}O_9$) se calculó a partir del ion molecular generado a través del análisis por EM-ESI-AR de la muestra, m/z 554.2383 $[M + NH_4]^+$ (**Figura 30**). Las diferencias más relevantes observadas en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (**Figuras 31-34** y **Tabla 10**) respecto a la butirolactona I (**1**) se describen a continuación:

En el espectro de RMN- 1H (**Figura 31**) se observa la aparición de señales correspondientes a dos grupos propilo; en δ_H 1.29 (2H, t, $J = 7.6$ Hz) y 1.24 (2H, t, J

= 7.6 Hz), se observan las señales correspondientes a dos metilenos (8'/8'') y dos grupos metilo (9'/9'') en δ_H 2.65 (3H, q, $J = 7.6$ Hz) y 2.57 (3H, q, $J = 7.6$ Hz). El espectro de RMN- ^{13}C confirmó la presencia de los grupos propilo, al observar señales en δ_C 173.0/172.7 (7'/7''), asociadas a dos carbonilos de éster. Cabe destacar que tanto las señales de 8'/8'' y 9'/9'' mostraron correlaciones HMBC (Figura 33-34) con los carbonos 7' y 7'', corroborando de manera inequívoca la estructura del producto.

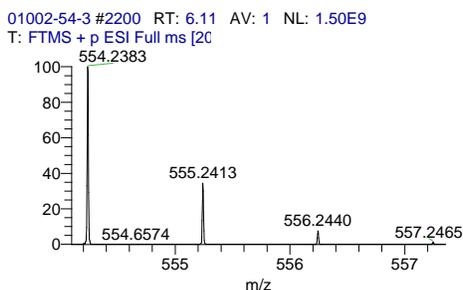


Figura 30. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 3.

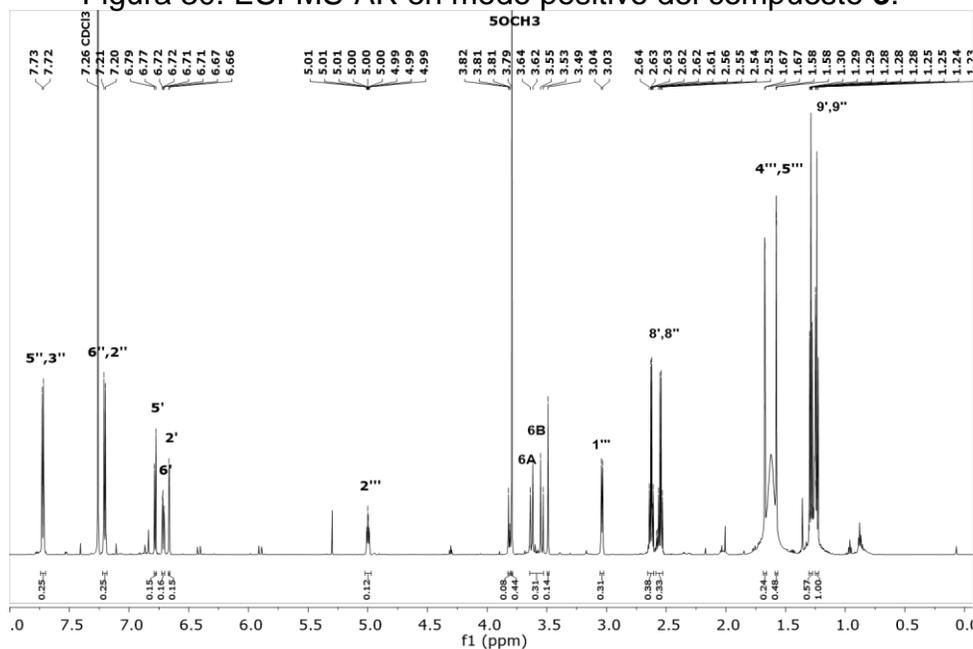


Figura 31. Espectro de RMN- 1H a 700 MHz en $CDCl_3$ del compuesto 3.

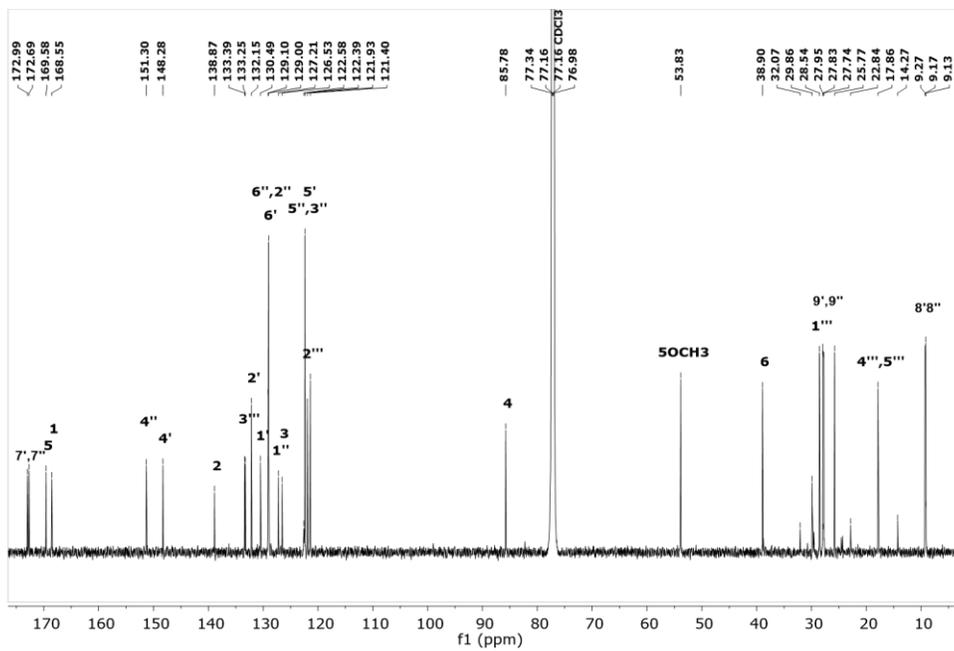


Figura 32. Espectro de RMN-¹³C a 175 MHz en CDCl₃ del compuesto **3**.

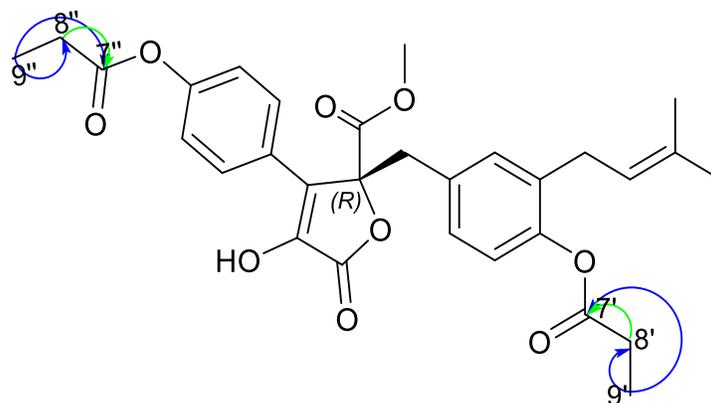


Figura 33. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **3**.

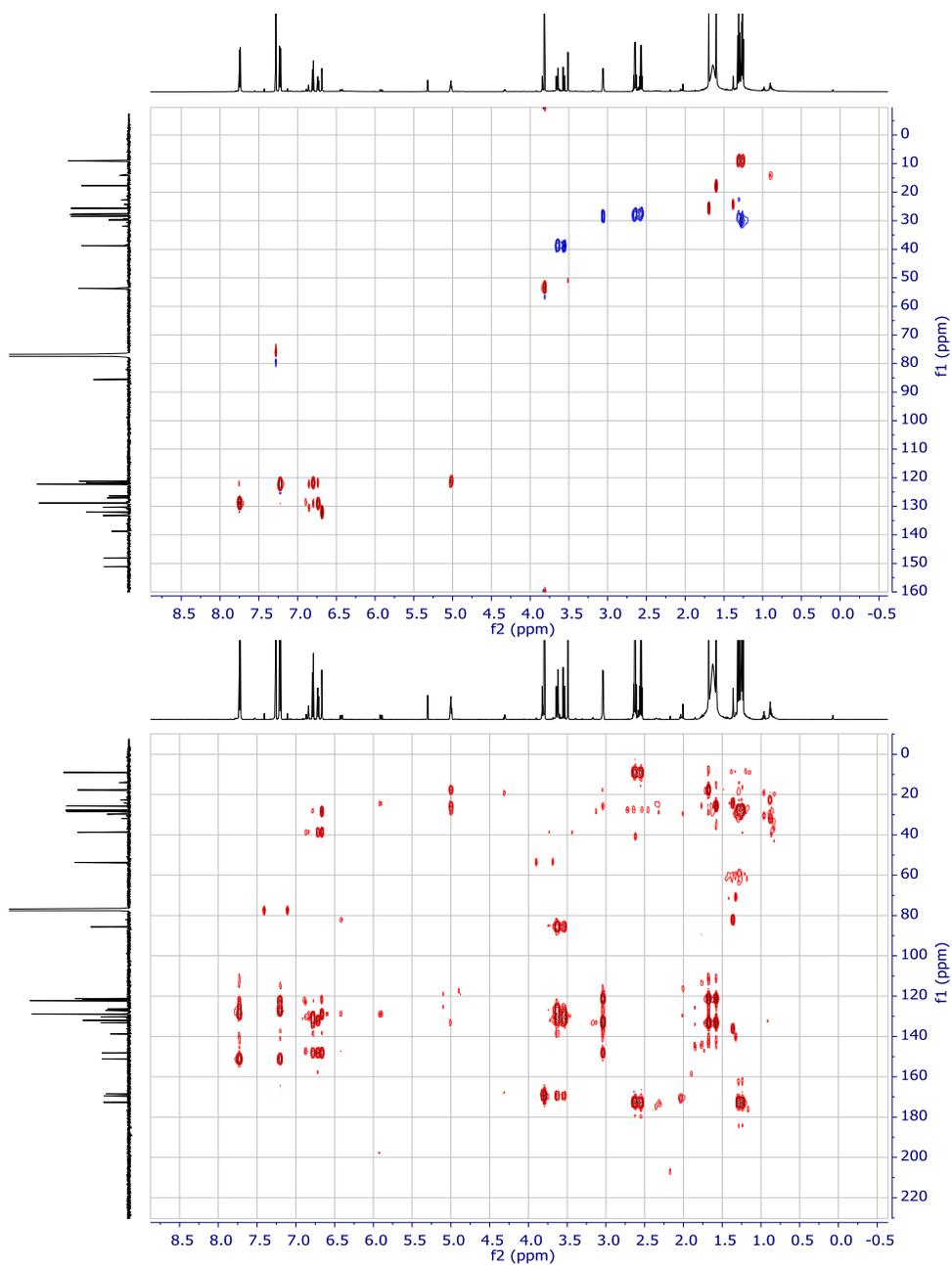


Figura 34. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto **3**.

7.3.2.1 Mecanismo para la formación del compuesto 3.

Para la formación del compuesto **3**, primero ocurre la activación del grupo carbonilo por adición de la piridina a través de un ataque nucleofílico. Una vez activado el grupo carbonilo, dos grupos sufrirán un ataque por parte del par de electrones no compartidos de los fenoles presentes en el compuesto **1**, generando el producto **3** (Figura 35).

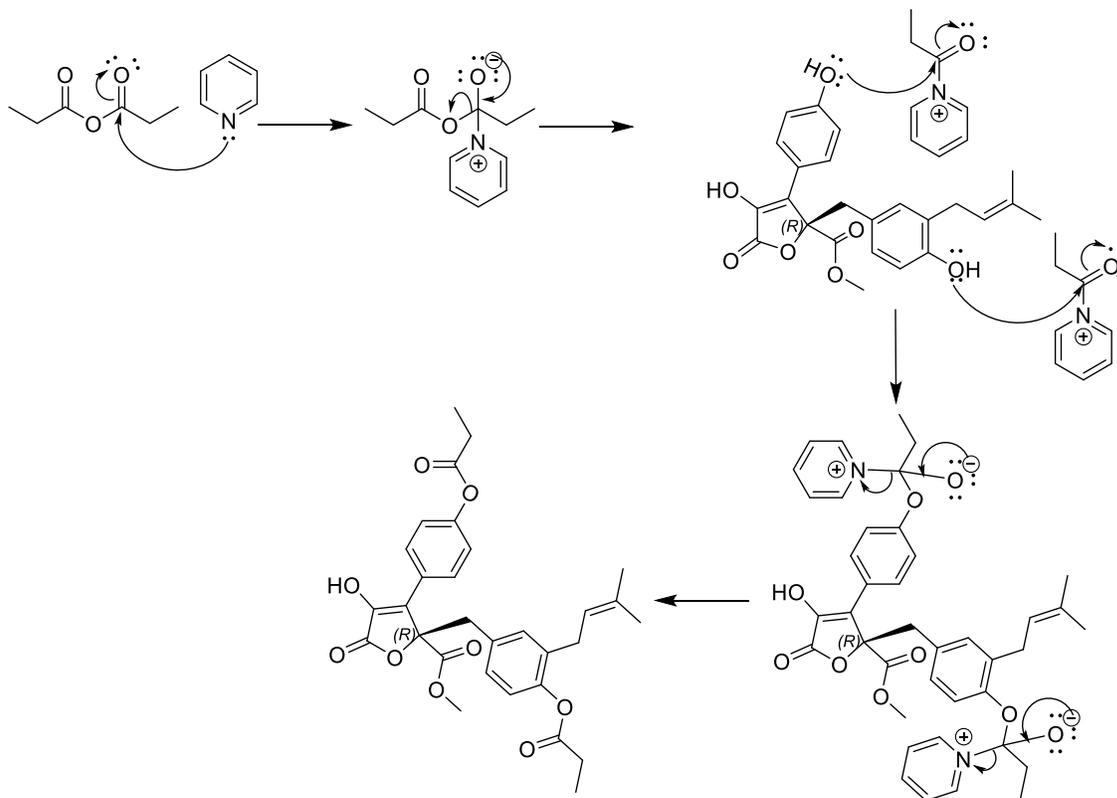


Figura 35. Mecanismo para la formación del compuesto **3**.

7.3.3 Preparación del $\Delta^{1''',2'''}-3'''$ -hidroxi-4',4''-dipropiónico de butirolactona I (**4**).

Con el fin de incrementar la polaridad del compuesto **3**, se sintetizó el compuesto **4** en la misma mezcla de reacción considerando la participación del agua en el medio. En esta sección se describirán las características del compuesto **4**, molécula obtenida mediante los procedimientos previamente descritos (Figura 36).

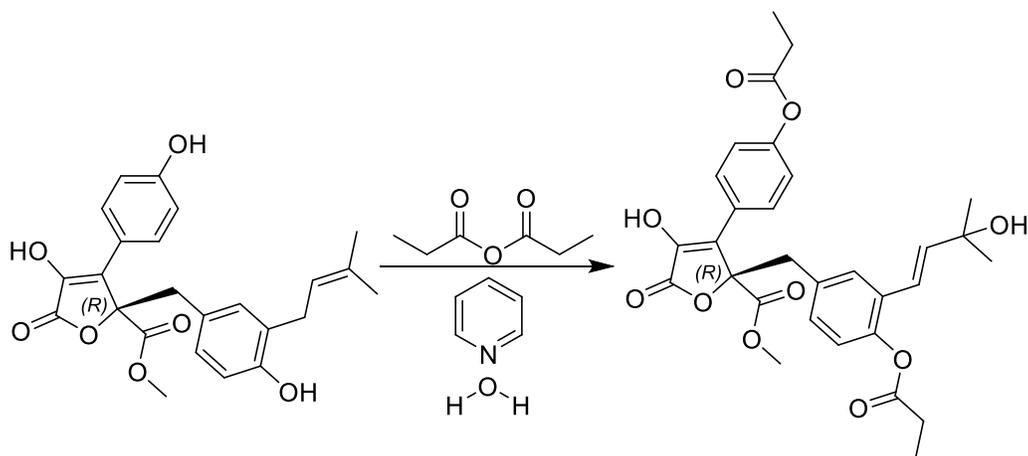


Figura 36. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto **4**.

El espectro de EM-ESI-AR en modo positivo para el compuesto **4** mostró un pico base en m/z 570.2332, congruente con el aducto $[M + NH_4]^+$ y una fórmula molecular calculada de $C_{30}H_{32}O_{10}$ (**Figura 37**). Las diferencias más relevantes observadas en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (**Figuras 38-41** y **Tabla 10**) respecto a la butirolactona I (**1**) se describen a continuación:

En el espectro de RMN- 1H (**Figura 38**) se observa la aparición de dos señales asignables a una doble ligadura trans en δ_H 6.41 (2H, d, $J = 16.4$ Hz, H-1''') y 5.90 (2H, d, $J = 16.4$ Hz, H-2'''). La doble ligadura formada, presenta correlaciones HMBC con el carbono en δ_C 128.6 C-3', 82.3 C-3''', 24.4/24.5 C-4'''/5''', también es posible observar la correlación entre el hidrógeno en δ_H 6.84 (2H, d, $J = 1.3$ Hz, H₁=5'/6') y el carbono en δ_C 123.4 C-1''', localizando la doble ligadura en la cadena de prenilo unida al anillo aromático trisustituido. Por otra parte, en el espectro de RMN- ^{13}C , se observa la aparición de una señal en δ_C 82.3, que corresponde al carbono de la posición C-3'''.

Además de los datos anteriores, el espectro de RMN- 1H revela nuevamente la presencia de señales que corresponden a la acilación de los fenoles, observándose dos señales en δ_H 2.58 (2H, q, $J = 7.6$ Hz) y 2.63 (2H, q, $J = 7.6$ Hz) las cuales corresponden a metilenos (8'/8''), también se encuentran conectadas con dos señales en δ_H 1.29 (3H, t, $J = 7.6$ Hz) y 1.26 (3H, t, $J = 7.6$ Hz) las cuales corresponden a un metilo (9'/9''), en el espectro de carbono se observan dos señales que pertenecen cada una a un grupo carbonilo en δ_C 173.1 y 172.9 (7'/7''), misma que muestran correlaciones HMBC (**Figuras 40-41**) con los metilos y metilenos de 8', 8'', 9' y 9''.

01002-54-2 #1856 RT: 5.21 AV: 1 NL: 4.08E8
T: FTMS + p ESI Full ms [2C]

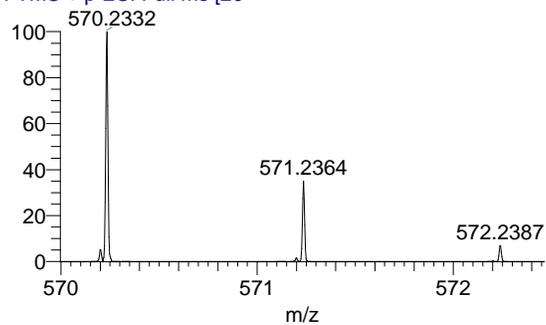


Figura 37. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto 4.

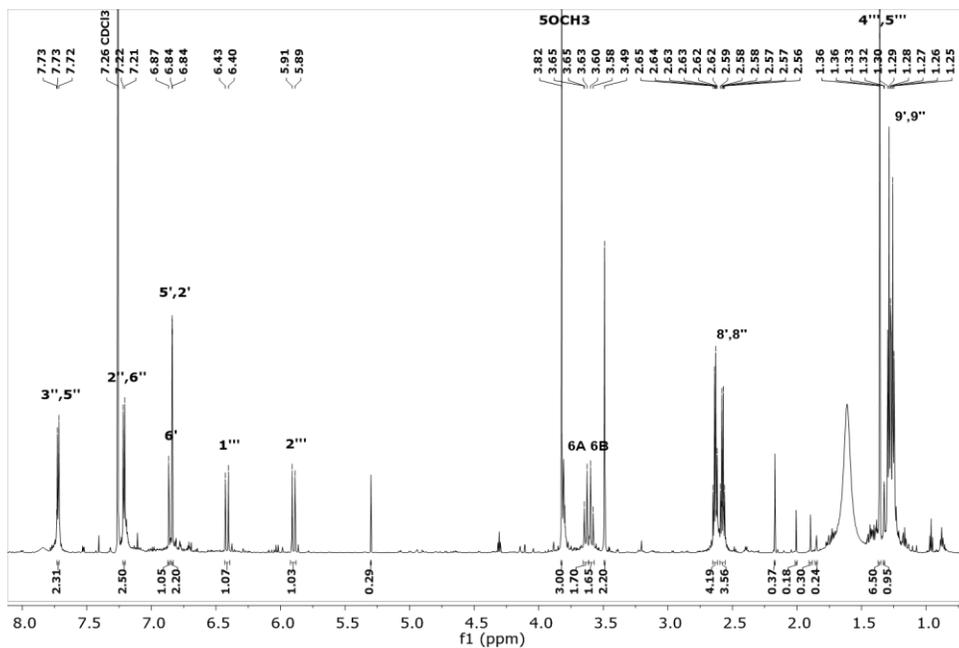


Figura 38. Espectro de RMN-¹H a 700 MHz en CDCl₃ del compuesto 4

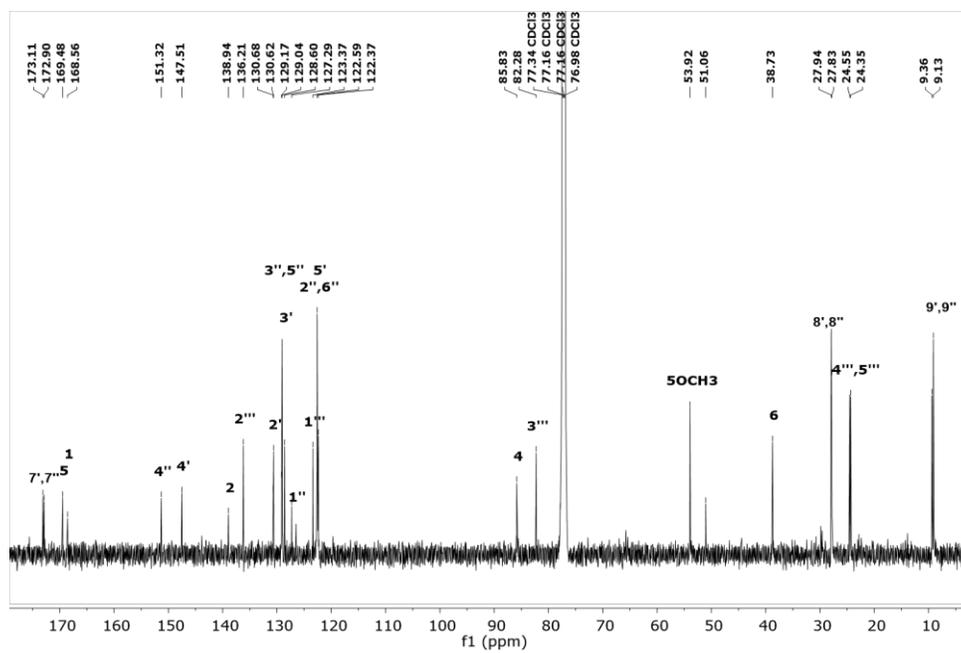


Figura 39. Espectro de RMN-¹³C a 175 MHz en CDCl₃ del compuesto **4**.

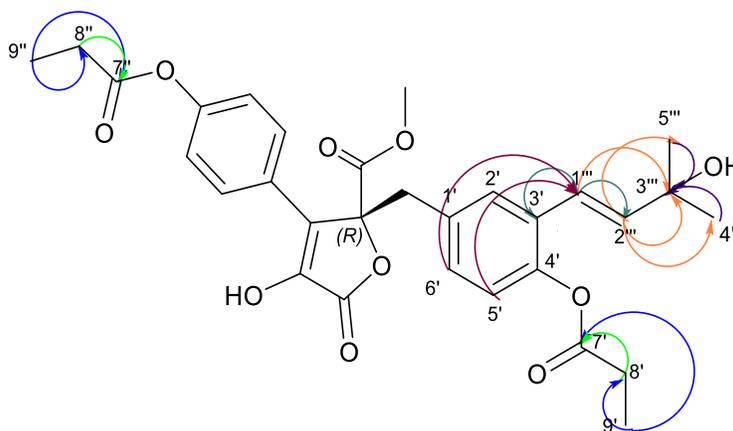


Figura 40. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **4**.

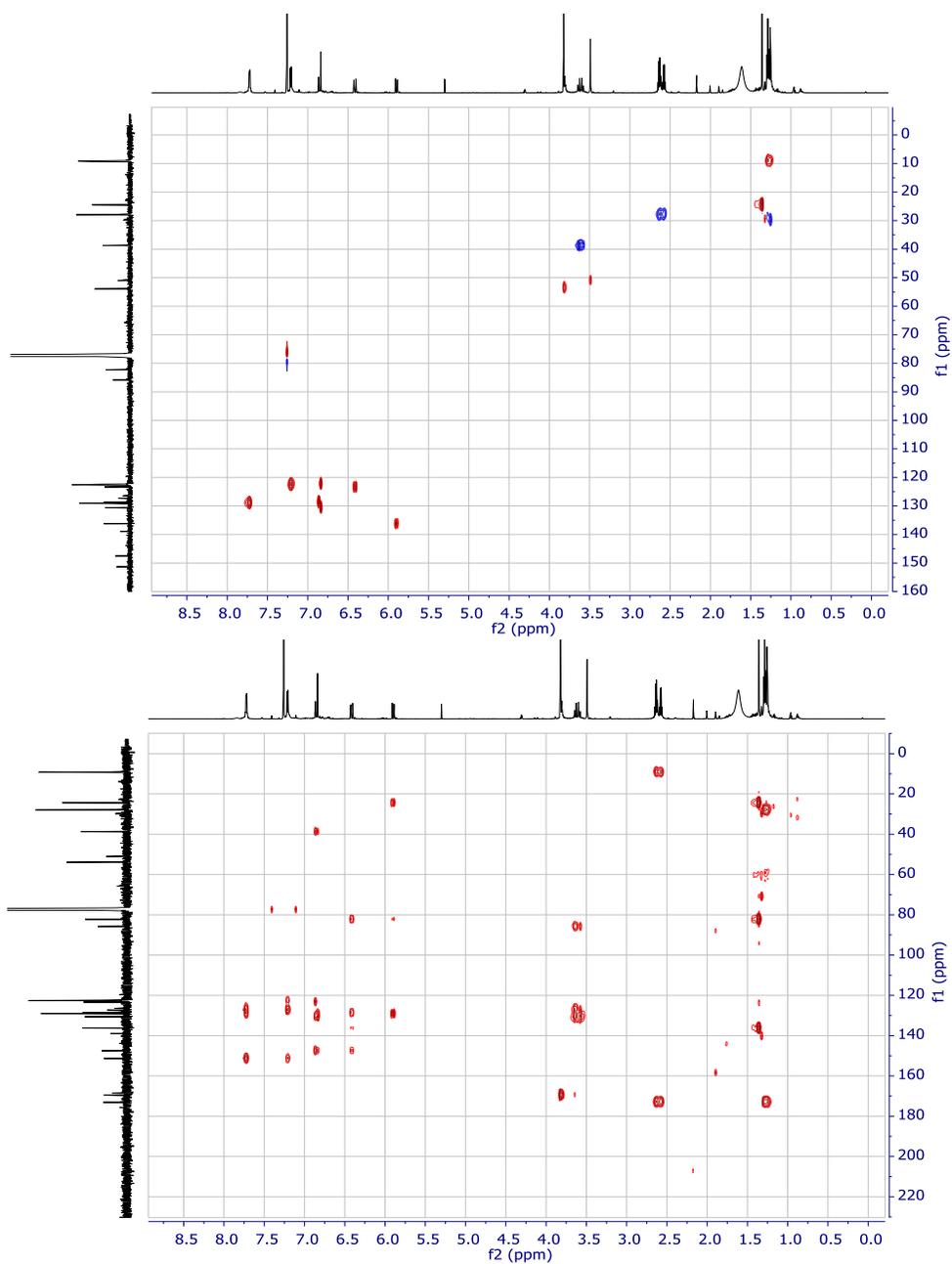


Figura 41. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 4.

7.3.3.1 Mecanismo para la formación del compuesto 4.

Los mecanismos para la formación de los compuestos **3** y **4** son similares. En el caso de **4**, la acilación de los fenoles ocurre de la misma manera, sin embargo, este presenta la adición de un hidroxilo en la posición 3". El mecanismo propuesto para la formación de este producto inicia con la formación de un intermediario peróxido acilado, generado por un ataque nucleofílico de la doble ligadura hacia oxígeno singulete y una posterior acilación. Posteriormente, el agua del medio permite la apertura del intermediario. Finalmente, el producto **4** se obtiene por un mecanismo de eliminación promovido por piridina (**Figura 42**).

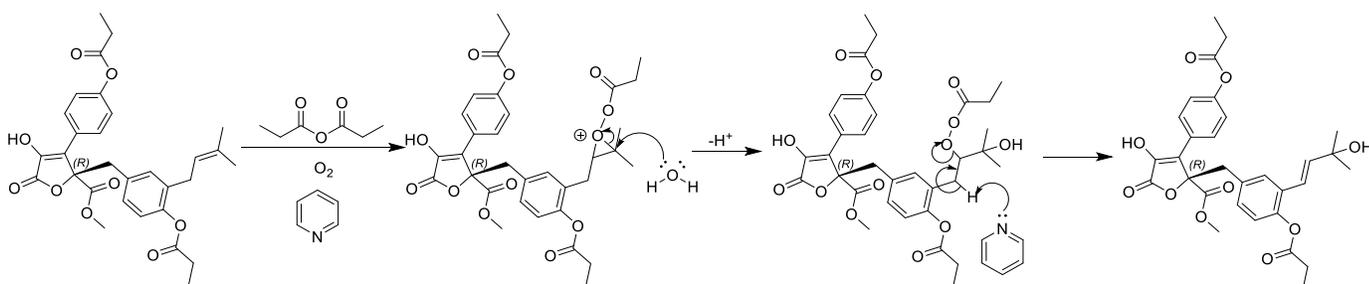


Figura 42. Mecanismo para la formación del compuesto **4**.

7.3.4 Obtención de la 5',3'',5'',2'''-tetrabromo aspernólida A (**5**).

De manera adicional se planteó la síntesis de derivados de butirolactona I (**1**) empleando Br₂, debido a que en estudios previos se ha demostrado un aumento en la actividad biológica con el uso de compuestos halogenados.^{49,50} Para la bromación del compuesto **1**, se colocó la materia prima en presencia de Br₂ empleando como medio CH₂Cl₂ y MeOH a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por CCF hasta su término (**Figura 43**).

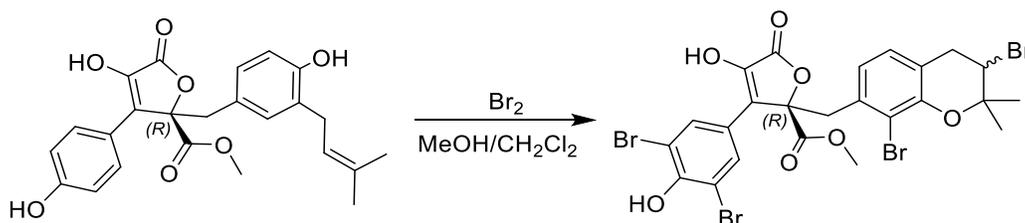


Figura 43. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto **5**.

La fórmula calculada para esta molécula se obtuvo empleando EM-ESI-AR en modo negativo, la cual fue de C₂₄H₂₀O₇Br₄. El espectro mostró un pico base de *m/z* 734.7877, este pico está relacionado con la masa del compuesto **5** y con un conjunto isotópico característico para compuestos tetrabromados (**Figura 44**). Las diferencias relevantes observadas en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C (**Figuras 45-47** y **Tabla 10**) respecto a la butirolactona I (**1**) se describen a continuación:

En el espectro de RMN-¹H (**Figura 45**), se observa la ausencia de la señal en δ_H 6.91 (H -3''/5''), lo cual está asociado con la sustitución de bromo en las posiciones meta con respecto al anillo furano. Por otro lado, la desaparición de la señal en δ_H 6.54 (H-5'), es debido a la sustitución por parte de bromo en esta posición.

De la misma manera que sucede en **2**, se visualiza la formación de un anillo de dihidropirano y la ausencia del hidrógeno olefínico H-2'''. A diferencia de la señal del hidrógeno 2''' en **2**, el compuesto **5** presenta señales en δ_H 3.10 (2H, dd, $J = 17.0$ y 9.2 Hz, H₂-1''') y 3.26 (2H, dd, $J = 17.0$ y 6.0 Hz, H₂-1'''), estos cambios en desplazamientos químicos están asociados a la unión de este protón al carbono asimétrico formado por la sustitución de bromo.

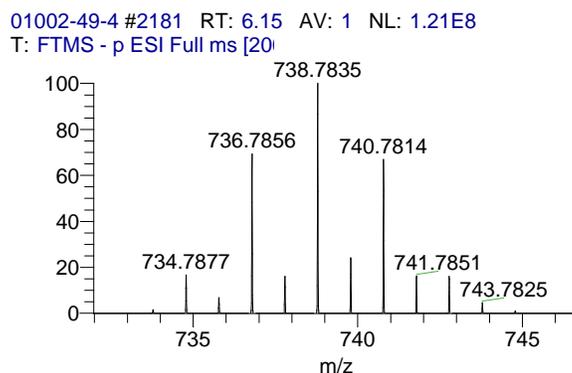


Figura 44. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **5**.

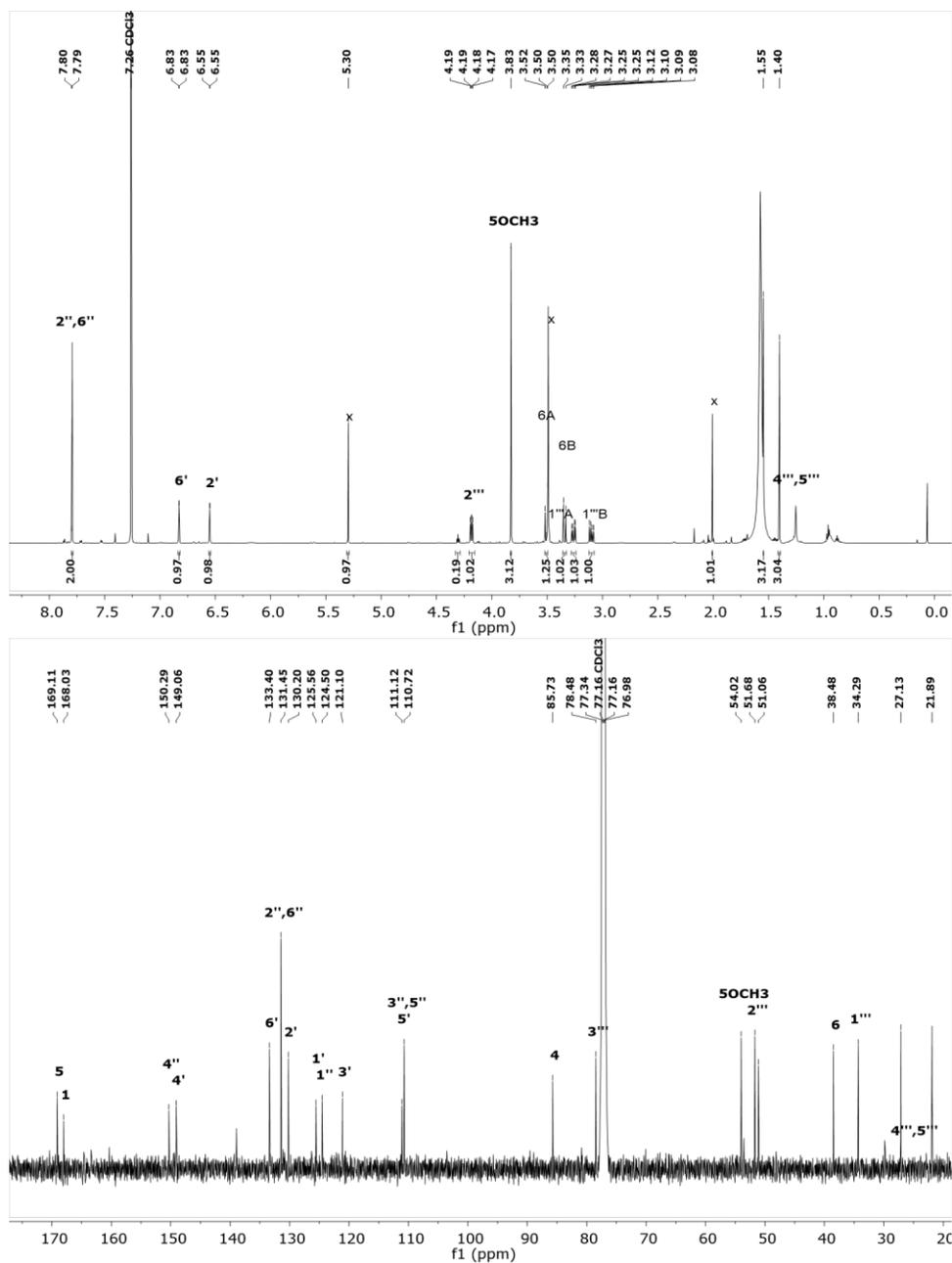


Figura 45. Espectros de RMN- ^1H a 700 MHz (arriba) y RMN- ^{13}C a 175 MHz (abajo) en CDCl_3 del compuesto **5**.

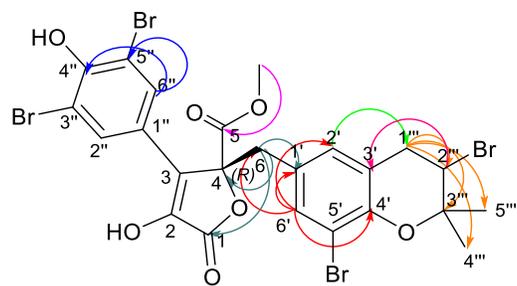


Figura 46. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **5**.

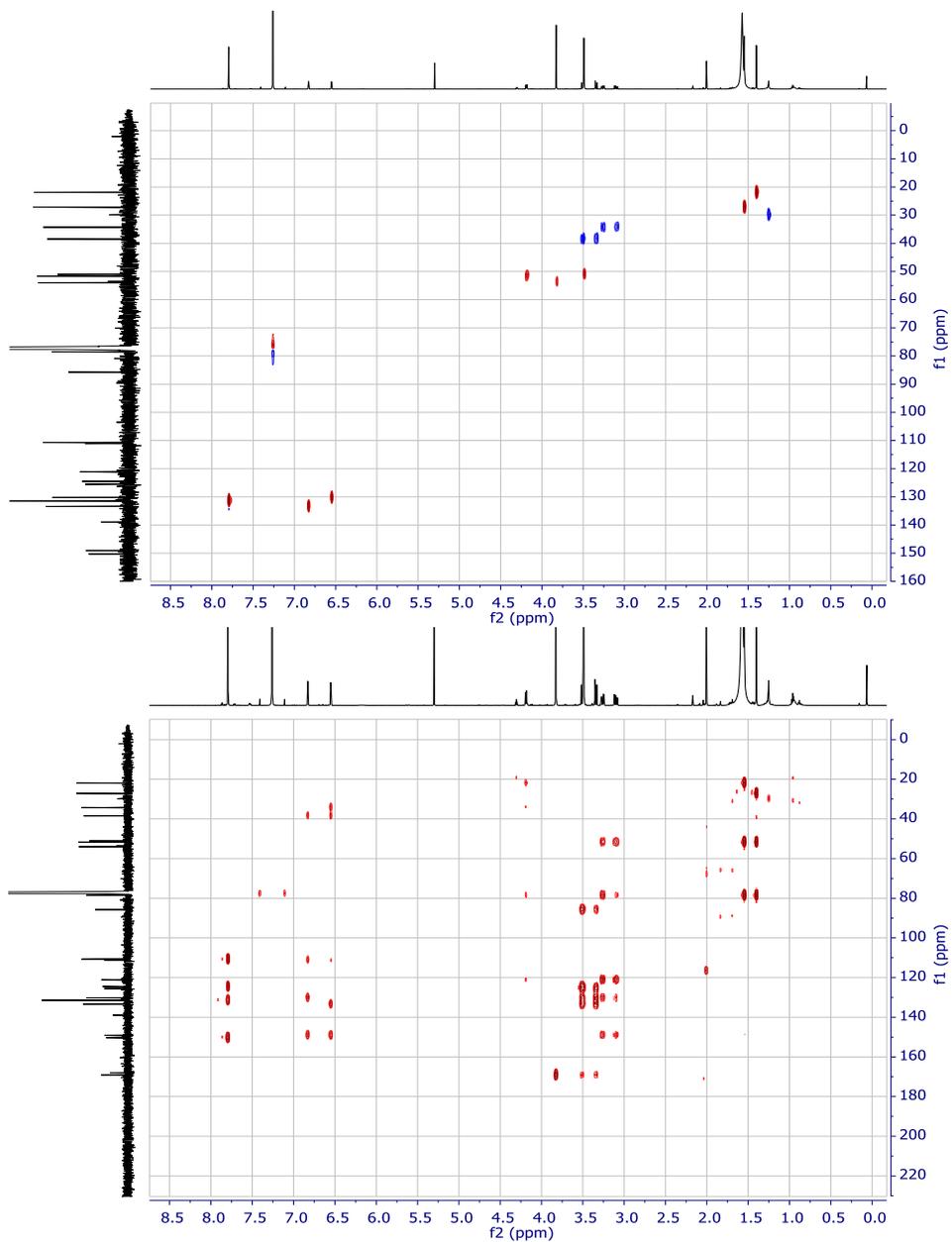


Figura 47. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto **5**.

7.3.4.1 Mecanismo para la formación del compuesto 5.

La formación del compuesto **5** se explica mediante el ataque de la doble ligadura a bromo presente en el medio, como resultado de este ataque nucleofílico se forma un ion bromonio, el cual es atacado por el fenol generando un anillo de dihidropirano. A continuación, el bromo en exceso se adiciona mediante una sustitución nucleofílica aromática en las posiciones *orto* a las funciones fenólicas (Figura 48).

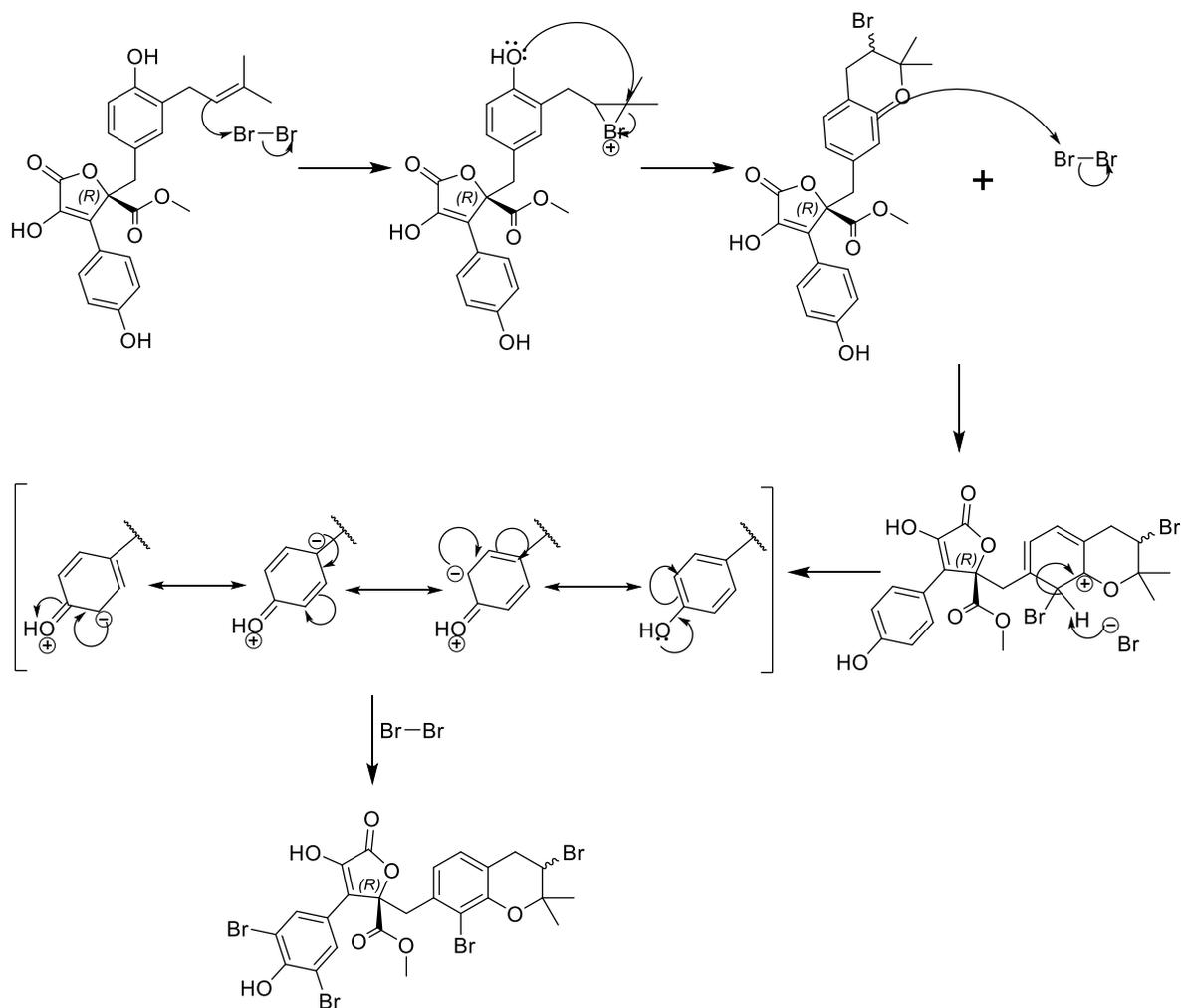


Figura 48. Mecanismo para la formación del compuesto **5**.

7.3.5 Síntesis de asperteretona D (**6**) a partir de butirolactona I (**1**).

La asperteretona D (**6**), un producto natural previamente aislado de *A. terreus*, se obtuvo como el producto mayoritario de la reacción del compuesto **1** en presencia de dimetil carbonato (DMC) y yoduro de tetrabutilamonio (TBAI).⁶² Inicialmente se planteó la semisíntesis del producto dimetilado de butirolactona I (**1**), sin embargo, las condiciones de reacción facilitaron la síntesis del producto **6** (Figura 49).

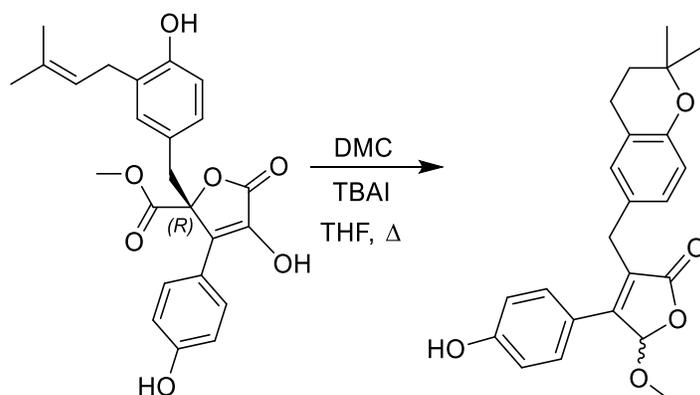


Figura 49. Reacción efectuada para la síntesis del compuesto **6**.

La purificación de la asperteretona D (**6**) se realizó mediante el procedimiento previamente descrito en la sección 6.9.4. La fórmula molecular para este compuesto se estableció como $C_{23}H_{24}O_5$, empleando EM-ESI-AR en modo positivo. El espectro mostró un pico base en m/z 398.1959, asociado con el aducto $[M + NH_4]^+$ (**Figura 50**). A partir de la comparación de la butirolactona I (**1**) y el compuesto **5** resulta evidente la pérdida de CO_2 , sugiriendo la descarboxilación del producto de partida. Las diferencias relevantes observadas en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (**Figuras 51-54** y **Tabla 10**) respecto a la butirolactona I (**1**) se describen a continuación:

En el espectro de RMN- 1H (**Figura 51**) se visualiza la ausencia del hidrógeno olefínico en δ_H 5.10 y de igual forma como sucede con la molécula **2** se puede apreciar la formación de un anillo de dihidropirano. Otra diferencia es la desprotección del metino de la posición C-4 (δ_H 5.50, s), atribuida a la formación de un enlace O-C-O.

Las diferencias más importantes se observan en el anillo furano, a través del espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 52**). Este espectro proporciona toda la información sobre la desaparición del éster de lactona. Además, en este espectro se observa una señal correspondiente a un grupo carbonilo en δ_C 171.1 asignable a C-1. Otra señal observada en δ_C 86.3, es atribuida al carbono C-2, misma que se desplaza a campos bajos (δ_C en 129.1), como resultado de la formación de una doble ligadura. En conjunto, las diferencias observadas se generan como resultado del reordenamiento del anillo furano.

Las correlaciones HMBC (**Figuras 53-54**) permitieron confirmar el reordenamiento del anillo furano, al observarse las señales del protón 5 en δ_H 3.58 (2H, d, $J = 15.2$ Hz, H₂-5) y 3.98 (2H, d, $J = 15.2$ Hz, H₂-5) con los carbonos en δ_C 102.4 (C-4), 129.8 (C-2') y 127.8 (C-6'); del protón H-4 (δ_H 5.50, s) con los carbonos en δ_C 171.1 (C-1), 129.1 (C-2) y 156.3 (C-3) y finalmente, las correlaciones de 4-OCH₃ con los

carbonos en δ_c 129.1 (C-2) y 102.4 (C-4). Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C son congruentes con los reportados previamente.⁵⁹

01002-64-1 (3) #1953 RT: 5.43 AV: 1 NL: 2.10E8
T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1800.0000]

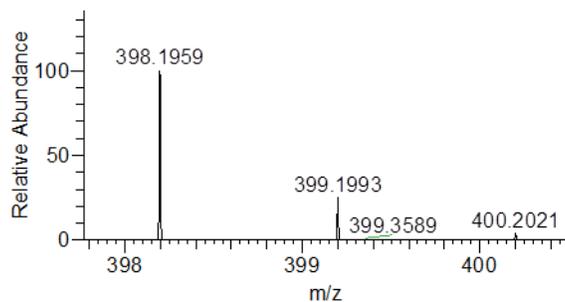


Figura 50. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **6**.

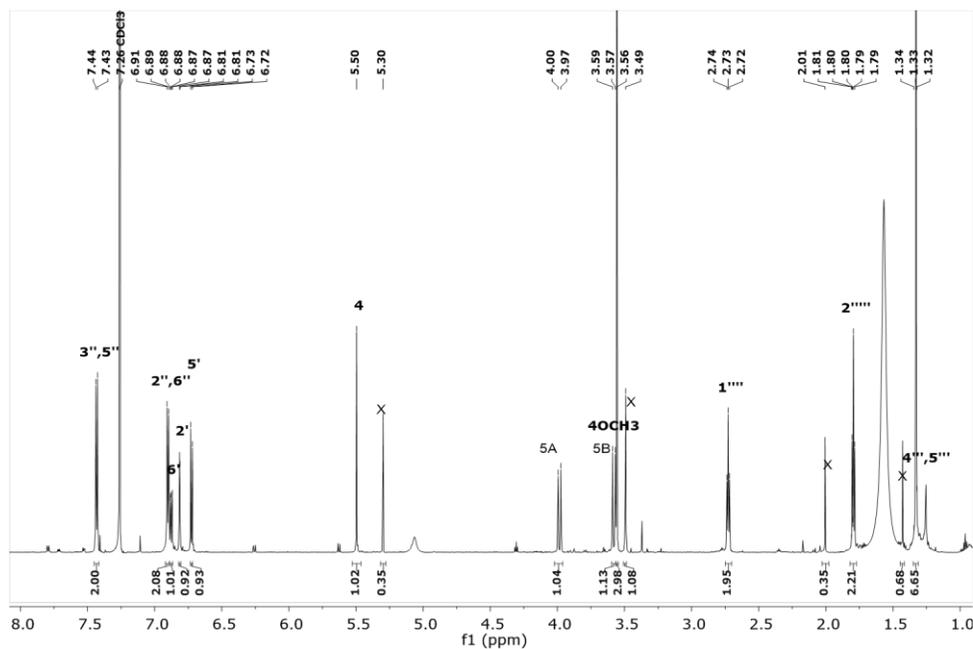


Figura 51. Espectro de RMN- ^1H a 700 MHz en CDCl_3 del compuesto **6**.

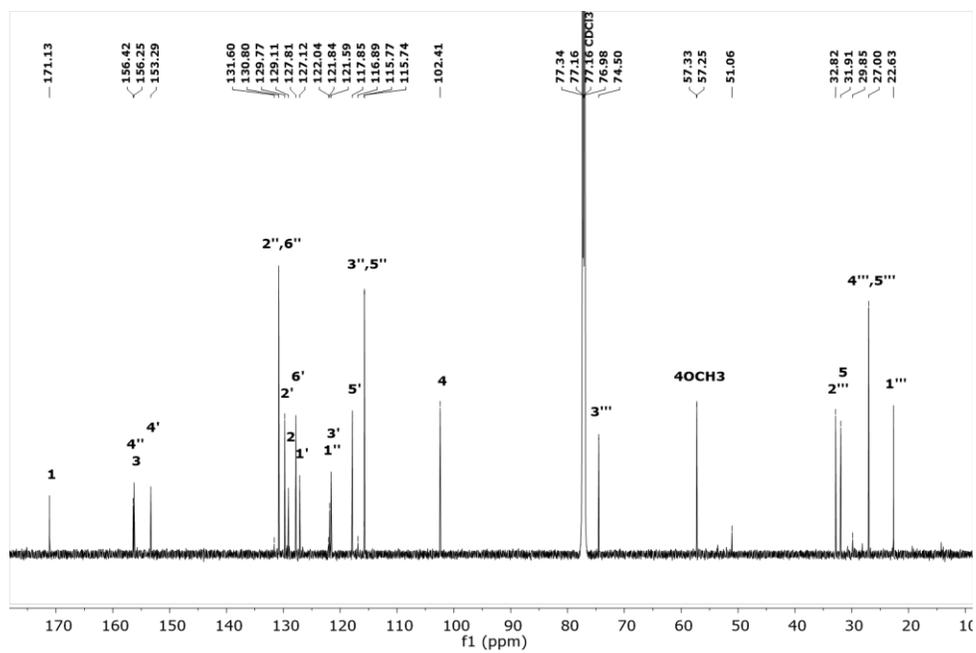


Figura 52. Espectros de RMN- ^{13}C a 175 MHz en CDCl_3 del compuesto **6**.

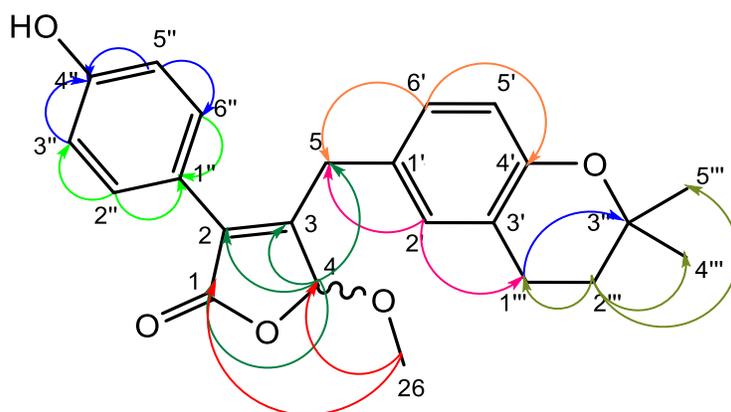


Figura 53. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **6**.

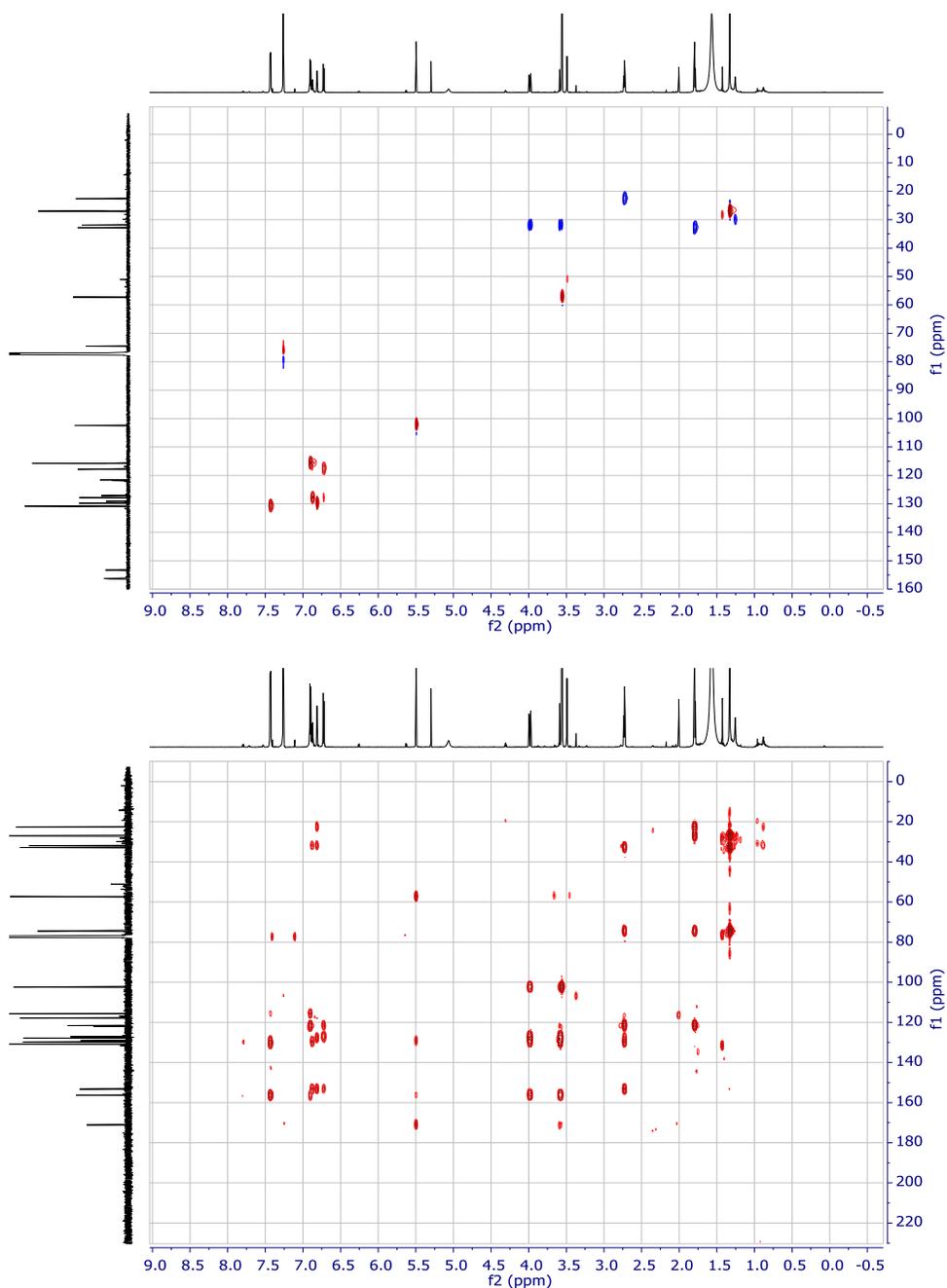


Figura 54. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 6.

7.3.5.1 Mecanismo para la formación del compuesto 6.

El mecanismo propuesto para la formación de este compuesto involucra en un primer paso la apertura del anillo de γ -lactona promovida por la entrada del par de electrones del enol, el cual en presencia de carbonato de dimetilo (DMC) genera un éster. El siguiente paso consiste en el ataque nucleofílico del carbonilo del éster hacia el grupo carbonilo más desprotegido del intermediario, provocando la

formación de un anillo de γ -lactona. El siguiente paso es una descarboxilación de tipo Krapcho, y finalmente, una tautomerización ceto-enol para generar el producto final (**Figura 55**).

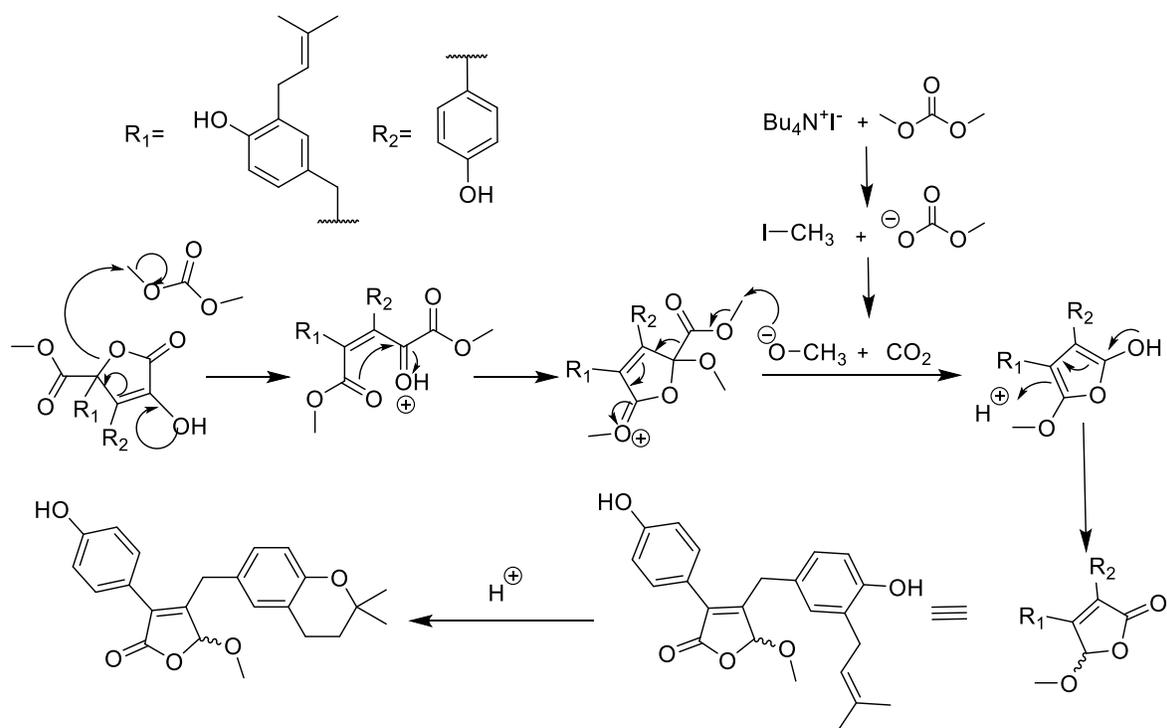


Figura 55. Mecanismo para la formación del compuesto 6.

7.3.6 Caracterización de la butirolactona IV (7).

La fórmula molecular para el compuesto **7** se calculó como $C_{24}H_{24}O_8$ con base en los resultados obtenidos por EM-ESI-AR en modo positivo. En el espectro se observó un pico base en m/z 458.1807, como resultado de la formación de un aducto con NH_4^+ (**Figura 56**). Este compuesto posee una estructura base semejante a la de la butirolactona I (**1**) y aspernólida A (**2**), por lo cual se comparó con ambos compuestos. Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (**Figuras 57-59** y **Tabla 10**) se describen a continuación:

En el espectro de RMN- 1H (**Figura 57**) se observa la desaparición del protón olefínico y a diferencia del compuesto **2**, el metino H-2''' se desplaza a campos bajos δ_H 4.53 (1H, t, $J = 9.4, 8.6$ Hz), como resultado de la formación de un anillo furano entre el residuo de isopreno y la función oxigenada en C-4' (δ_C 159.0). La formación de este anillo se corroboró mediante las correlaciones HMBC del protón H-2' (δ_H 6.65, s) con el carbono 1' cuya señal se encuentra ubicada en δ_C 124.8. El protón H-1''' en δ_H 3.02 (2H, dd, $J = 15.6, 8.6$ Hz) y 2.96 (2H, dd, $J = 15.6, 9.4$ Hz) tiene correlaciones con los carbonos en δ_C 159.0, 89.5 y 72.1 los cuales corresponden con 4', 2''' y 3'''. Por último, las correlaciones HMBC (**Figuras 58-59**) existentes entre el protón H-2''' ubicado en δ_H 4.53 (1H, dd, $J = 9.4, 8.6$ Hz), con los carbonos 3', 4', 4''' y 5''' con δ_C 127.0, 159.0, 24.0 y 26.3, respectivamente confirmaron la presencia del anillo furano el cual se encuentra unido al anillo aromático trisustituido.

En el espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 57**), los carbonos en δ_C 89.5 (C-2''') y 72.1 (C-3''') se encuentran desplazados a campos más bajos como resultado de la desprotección debida a la formación del anillo furano. Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C son congruentes con los reportados previamente.^{9,52}

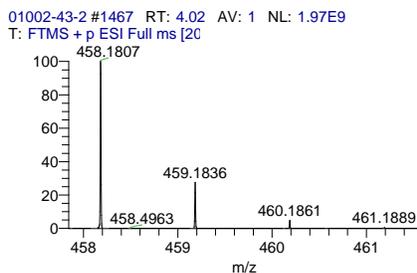


Figura 56. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **7**.

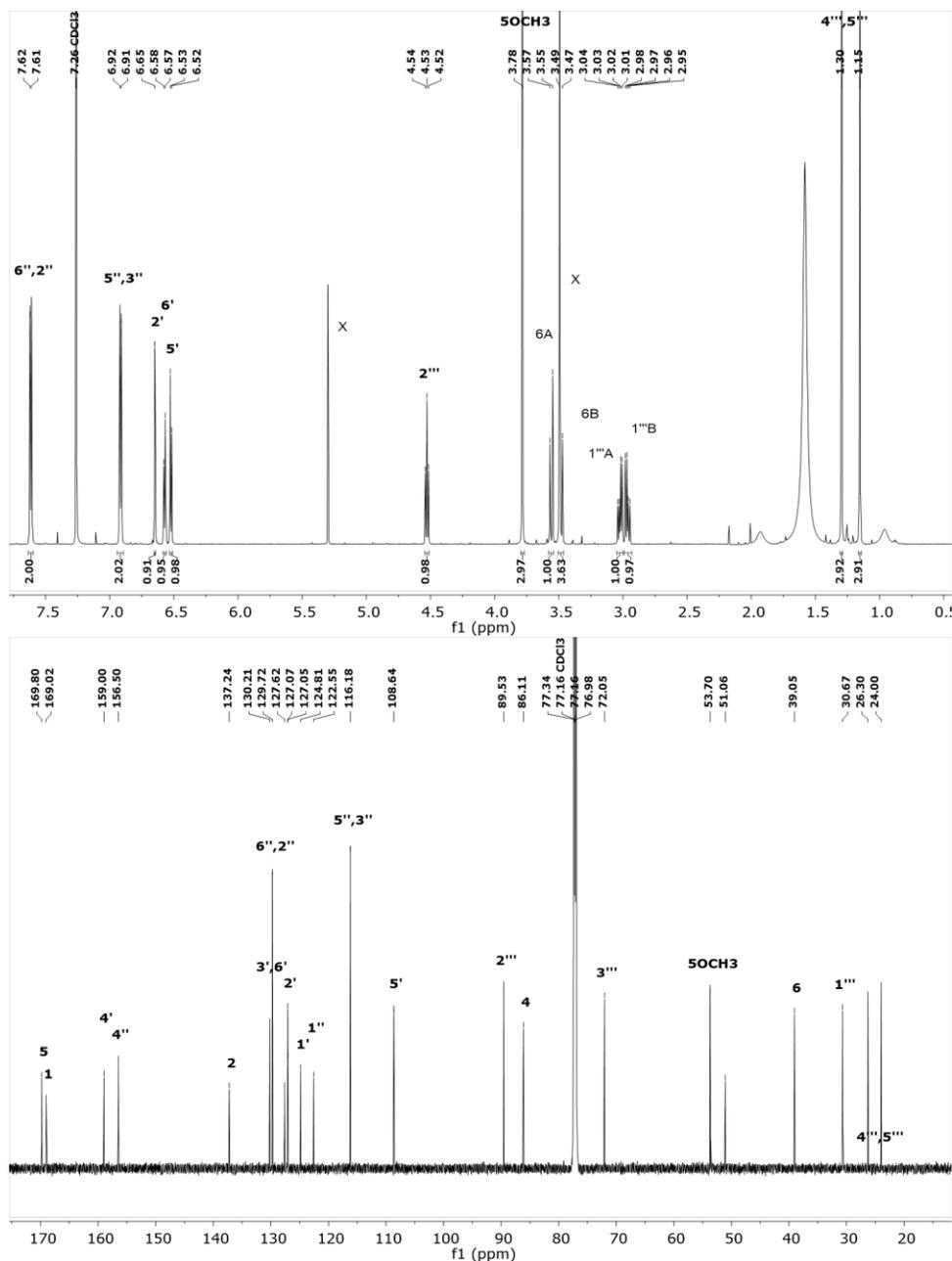


Figura 57. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz arriba) y RMN- ^{13}C (175 MHz abajo) en CDCl_3 del compuesto **7**.

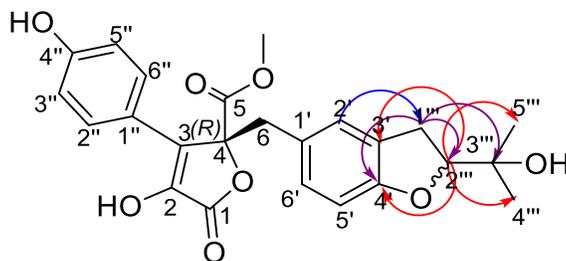


Figura 58. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **7**.

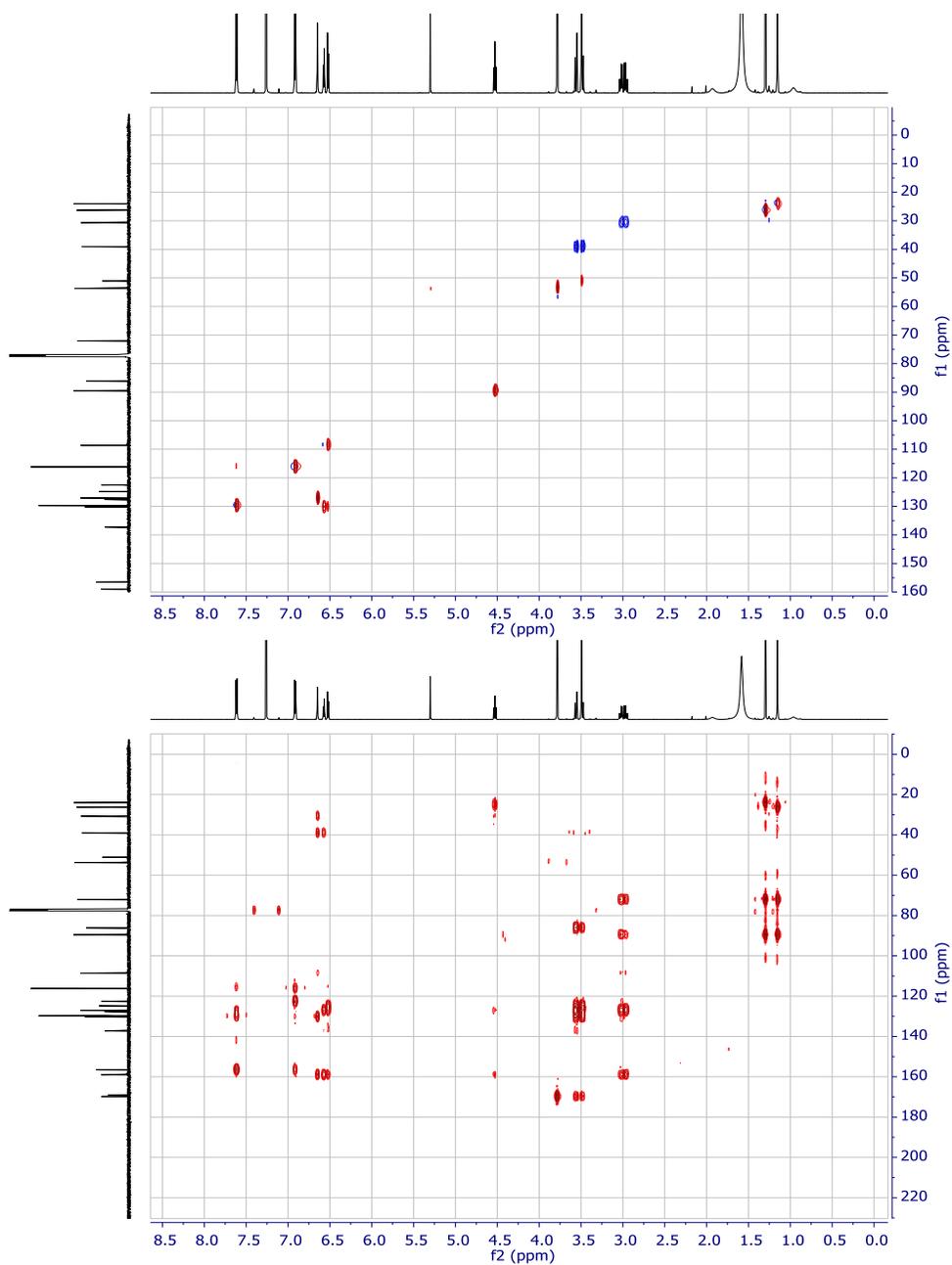


Figura 59. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 7.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de butirolactona I (1), derivados (2-6) y butirolactona IV (7) en CDCl₃.

Posición	1*		2		3**		4***	
	δ_C	δ_H [mult., J (Hz)]	δ_C	δ_H [mult., J (Hz)]	δ_C	δ_H [mult., J (Hz)]	δ_C	δ_H [mult., J (Hz)]
1	169.6	-	169.1	-	168.6	-	168.6	-
2	137.4	-	137.2	-	138.9	-	138.9	-
3	128.3	-	127.6	-	126.5	-	128.6	-
4	86.3	-	86.2	-	85.8	-	85.8	-
5	169.9	-	169.9	-	169.6	-	169.5	-
6	38.7	3.56 d (14.7), 3.50 d (14.7)	38.8	3.44 d (14.8), 3.54 d (14.8)	38.9	3.63 d (14.7), 3.54 d (14.7)	38.7	3.59 d (14.8), 3.64 d (14.8)
1'	124.8	-	123.7	-	130.5	-	130.7	-
2'	132.0	6.52 d (2.2)	131.7	6.56 s	132.1	6.66 d (2.2)	122.4	6.87 s
3'	126.7	-	120.5	-	133.4	-	128.6	-
4'	153.3	-	153.3	-	148.3	-	147.5	-
5'	115.3	6.54 d (8.2)	116.8	6.51 s	121.9	6.78 d (8.2)	122.4	6.84 d (1.3)
6'	129.4	6.60 dd (8.2, 2.2)	129.3	6.51 s	129.1	6.71 dd (8.2, 2.2)	130.6	6.84 d (1.3)
1''	122.4	-	122.6	-	127.2	-	127.3	-
2''/6''	129.7	7.63 d (8.9)	129.7	7.61 d (8.8)	129.0	7.72 d (8.8)	129.0	7.72 d (8.7)
3''/5''	116.2	6.91 d (8.9)	116.1	6.92 d (8.8)	122.4	7.20 d (8.8)	122.6	7.21 d (8.8)
4''	156.7	-	156.4	-	151.3	-	151.3	-
1'''	29.5	3.14 d (7.2)	22.4	2.59 dt (16.7, 6.8) 2.62 dt (16.7, 6.8)	28.5	3.04 d (7.2)	123.4	6.41 d (16.4)
2'''	121.6	5.10 dddd (8.7, 5.7, 2.8, 1.4)	32.8	1.72 t (6.8)	121.4	5.00 tt (7.2, 1.5)	136.2	5.90 d (16.4)
3'''	134.6	-	74.3	-	133.3	-	82.3	-
4'''	17.9	1.65 s	27.0/26.9	1.27 s	17.9	1.58 d (1.3)	24.4/24.5	1.36 s
5'''	25.9	1.69 s	27.0/26.9	1.27 s	25.8	1.67 d (1.3)	24.4/24.5	1.36 s
5-OMe	53.8	3.78 s	53.7	3.78 s	53.8	3.79 s	53.9	3.82 s

*Los protones del compuesto 1 asignados como 2-OH, 4'-OH y 4''-OH se encuentran en δ_H 6.68 s; 5.47 s y 5.99 s respectivamente.

** El compuesto 3 presenta desplazamientos para 7'/7'' en δ_C 173.0/172.7, para la posición 8'/8'' en δ_H 2.65 q (7.6) / 2.57 q (7.6) y en δ_C 27.8/27.6, finalmente para la posición 9'/9'' presenta desplazamientos en δ_H 1.29 t (7.6) / 1.24 t (7.6) y en δ_C 9.1/9.0.

***El compuesto 4 presenta desplazamientos para 7'/7''' en δ_C 173.1/172.9, para la posición 8'/8''' en δ_H 2.58 q (7.6) / 2.63 q (7.6) y en δ_C 27.8/27.9, finalmente para la posición 9'/9''' presenta desplazamientos en δ_H 1.29 t (7.6) / 1.26 t (7.6) y en δ_C 9.1/9.4.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de butirolactona I (1), derivados (2-6) y butirolactona IV (7) en CDCl₃ (continuación).

Posición	δ_C	1 δ_H [mult., J (Hz)]	δ_C	5 δ_H [mult., J (Hz)]	δ_C	6 δ_H [mult., J (Hz)]	δ_C	7 δ_H [mult., J (Hz)]
1	169.6	-	168.0	-	171.1	-	169.0	-
2	137.4	-	138.9	-	129.1	-	137.2	-
3	128.3	-	125.6	-	156.3	-	127.6	-
4	86.3	-	85.7	-	102.4	5.50 s	86.1	-
5	169.9	-	169.1	-	31.9	3.58 d (15.2), 3.98 d (15.2)	169.8	-
6	38.7	3.56 d (14.7), 3.50 d (14.7)	38.5	3.34 d (15.0), 3.51 d (15.0)	-	-	39.0	3.49 dd (14.9), 3.56 dd (14.9)
1'	124.8	-	124.5	-	127.1	-	124.8	-
2'	132.0	6.52 d (2.2)	130.2	6.55 d (2.1)	129.8	6.81 d (2.2)	127.1	6.65 s
3'	126.7	-	121.1	-	121.6	-	127.0	-
4'	153.3	-	149.1	-	153.3	-	159.0	-
5'	115.3	6.54 d (8.2)	111.1	-	117.9	6.72 d (8.4)	108.6	6.52 d (8.2)
6'	129.4	6.60 dd (8.2, 2.2)	133.4	6.83 d (2.1)	127.8	6.88 dd (8.3, 2.3)	130.2	6.57 d (8.2)
1''	122.4	-	124.5	-	121.8	-	122.6	-
2''/6''	129.7	7.63 d (8.9)	131.5	7.79 s	130.8	7.43 d (8.6)	129.7	7.61 d (7.2)
3''/5''	116.2	6.91 d (8.9)	110.7	-	115.7	6.90 d (8.6)	116.2	6.91 d (7.2)
4''	156.7	-	150.3	-	156.4	-	156.5	-
1'''	29.5	3.14 d (7.2)	34.3	3.10 dd (17.0, 9.2), 3.26 dd (17.0, 6.0)	22.6	2.73 t (6.8)	30.7	3.02 dd (15.6, 8.6), 2.96 dd (15.6, 9.4)
2'''	121.6	5.10 dddd (8.7, 5.7, 2.8, 1.4)	51.7	4.18 dd (9.2, 5.6)	32.8	1.79 t (6.8)	89.5	4.53 dd (9.4, 8.6)
3'''	134.6	-	78.5	-	74.5	-	72.1	-
4'''	17.9	1.65 s	21.9	1.40 s	27.0	1.33 s	24.0	1.15 s
5'''	25.9	1.69 s	27.1	1.55 s	27.0	1.33 s	26.3	1.30 s
5-OMe	53.8	3.78 s	54.0	3.83 s	57.3 ^D	3.58 s ^D	53.7	3.78 s

^D La señal corresponde a 4-OMe, debido a que la molécula tiene un comportamiento diferente al resto derivados (2-6).

7.3.7 Caracterización de la chrisamida B (8).

La fórmula molecular del compuesto **8** (C₂₆H₂₈N₄O₈) se calculó empleando EM-ESI-AR en modo positivo (m/z 525.1983 [M + H]⁺), indicando un índice de deficiencia de hidrógenos de 15 (**Figura 60**).

En el espectro de RMN-¹H (**Figura 61**) se observan dos señales correspondientes con 8 metinos aromáticos asociados a las señales de los carbonos C-8, C-8', C-9, C-9', C-11, C-11', C-12 y C-12' en δ_H 7.53 (4H, d, J = 8.2 Hz, H₁-8/12/8'/12') y 8.27 (4H, d, J = 8.2 Hz, H₁-9/11/9'/11'), dos señales correspondientes a metilenos base de oxígeno en δ_H 3.22 (4H, sa, H₂-1/1') y 4.28 (4H, s, H₂-6/6'), además se observa una señal para metinos base de nitrógeno en δ_H 4.45 (2H, s, Hz, H₁-2/2') y dos grupos metilo en 1.24 (6H, d, J = 6.9 Hz, H₃-13/13') y 1.31 (6H, s, H₃-14/14') (**Tabla 12**)

En el espectro de RMN-¹³C (**Figura 62**) es posible apreciar seis señales que corresponden a un anillo aromático, una de estas señales es asignable a un carbono aromático no protonado el cual soporta una función nitro (δ_C 148.1, C-10/10'), un carbono aromático cuaternario en δ_C 141.3 (C-7/7') y cuatro metinos aromáticos en δ_C 127.6 (C-8/8'/12/12') y 123.8 (C-9/9'/11/11'). Además, es evidente la presencia de una señal desprotegida en δ_C 168.9 (C-4/4') asignable a un carbonilo de amida. Las señales en δ_C 63.8 (C-5/5') y δ_C 62.1 (C-6/6') corresponden a un carbono no protonado base de oxígeno y a un carbono con hibridación sp³ base de epóxido. Las señales en δ_C 44.0 (C-1/1') y 50.0 (C-2/2') corresponden con el metileno y el metino que forman el anillo de piperazina. Finalmente, las señales más protegidas en este espectro son las correspondientes a los metilos en δ_C 15.1 (C-14/14') y 16.1 (C-13/13').

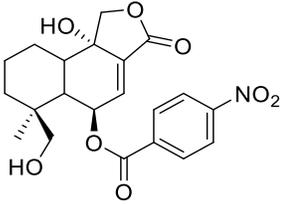
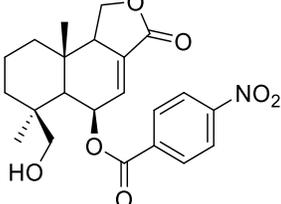
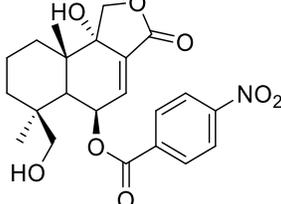
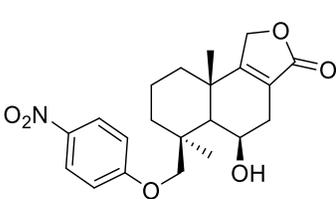
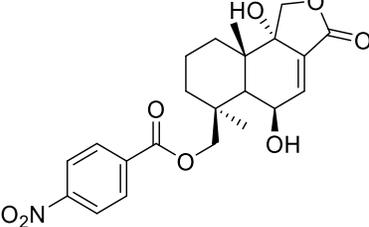
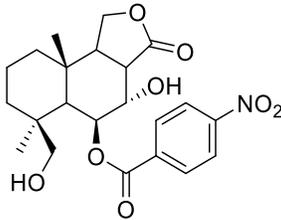
El espectro de HMBC (**Figuras 63-64**) muestra correlaciones de H-8/8' (δ_H 7.53) con δ_C 148.1 (C-10/10') y 123.8 (C-9/9'/11/11'), estas interacciones, así como las constantes de acoplamiento previamente mencionadas indican la presencia de un anillo *p*-nitrofenilo. Las correlaciones provenientes de H-14/14' (δ_H 1.31) y de H-6/6' (δ_H 4.28) con δ_C 168.9 (C-4/4') y 63.8 (C-5/5'), sugieren un residuo de 2-metil-2,3-epoxido, el cual se encuentra conectado con el carbono 7/7' del anillo aromático, esta conexión se confirmó a través de la correlación de H-8/8' con δ_C 62.1 (C-6/6') y H-6/6' con C-7/8/12/7'/8'/12'.

Los desplazamientos químicos encontrados, así como las correlaciones están en armonía con lo descrito previamente en la literatura para la chrisamida B (**8**), un producto natural aislado de especies del género *Penicillium*.^{57,60}

Este sería el primer trabajo donde se reporta la chrisamida B (**8**) de especies de *Aspergillus*, trabajos previos, muestran que este género es capaz de producir

compuestos nitrados. En la **Tabla 11** se resumen los esqueletos de compuestos con grupos nitro previamente aislados, mismos que difieren significativamente con el compuesto aislado en el presente trabajo.

Tabla 11. Compuestos nitrados previamente aislados del género *Aspergillus* sp.⁶³⁻
67

 <p>Insulicólida A <i>A. insulicola</i></p>	 <p>14-hidroxi-6β-<i>p</i>-nitrobenzoilcinamólida <i>A. versicolor</i></p>	 <p>9α,14-dihidroxi-6β-<i>p</i>-nitrobenzoilcinamólida. <i>A. versicolor</i></p>
 <p>6β,7α-dihidroxi-14-<i>p</i>-nitrobenzoilconfertifolina <i>A. versicolor</i></p>	 <p>6β,9α-dihidroxi-14-<i>p</i>-nitrobenzoilcinamólida <i>A. ochraceus</i></p>	 <p>6β,14-dihidroxi-7α-<i>p</i>-dihidroxicinamólida <i>A. insulicola</i></p>

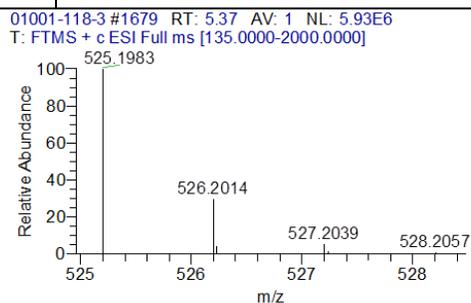


Figura 60. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **8**.

Tabla 12. Datos espectroscópicos del compuesto **8** en CDCl₃.

Posición	δ_C	δ_H [mult., J (Hz)]	Posición	δ_C	δ_H [mult., J (Hz)]
1/1'	44.0	3.22 sa	8/8'/12/12'	127.6	7.53 d (8.2)
2/2'	50.0	4.45 s	9/9'/11/11'	123.8	8.27 d (8.2)
4/4'	168.9	-	10/10'	148.1	-
5/5'	63.8	-	13/13'	16.1	1.24 d (6.9)
6/6'	62.1	4.28 s	14/14'	15.1	1.31 s
7/7'	141.3	-			

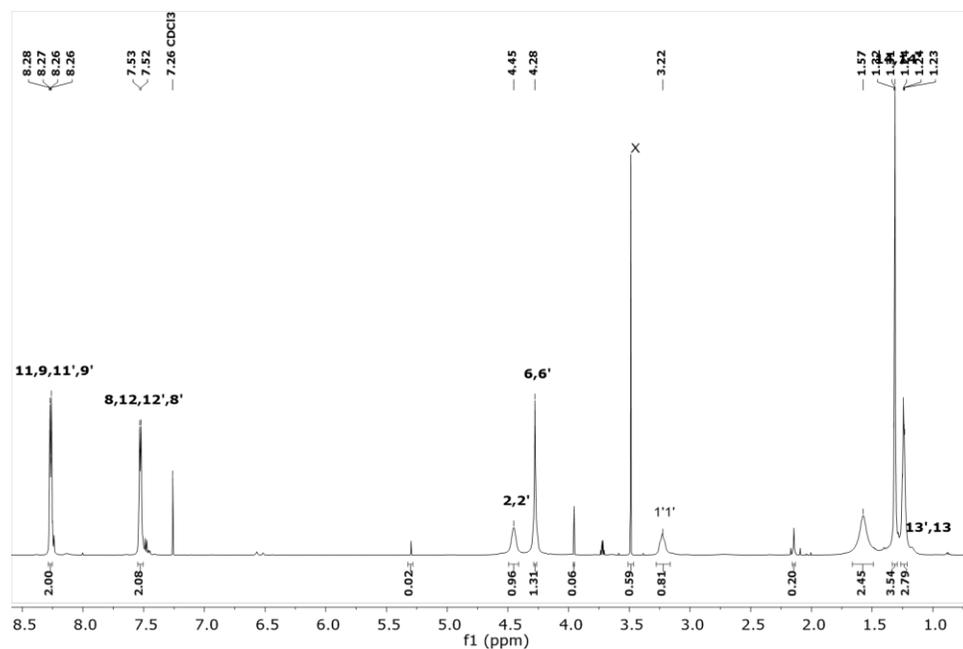


Figura 61. Espectro de RMN-¹H a 700 MHz en CDCl₃ del compuesto **8**.

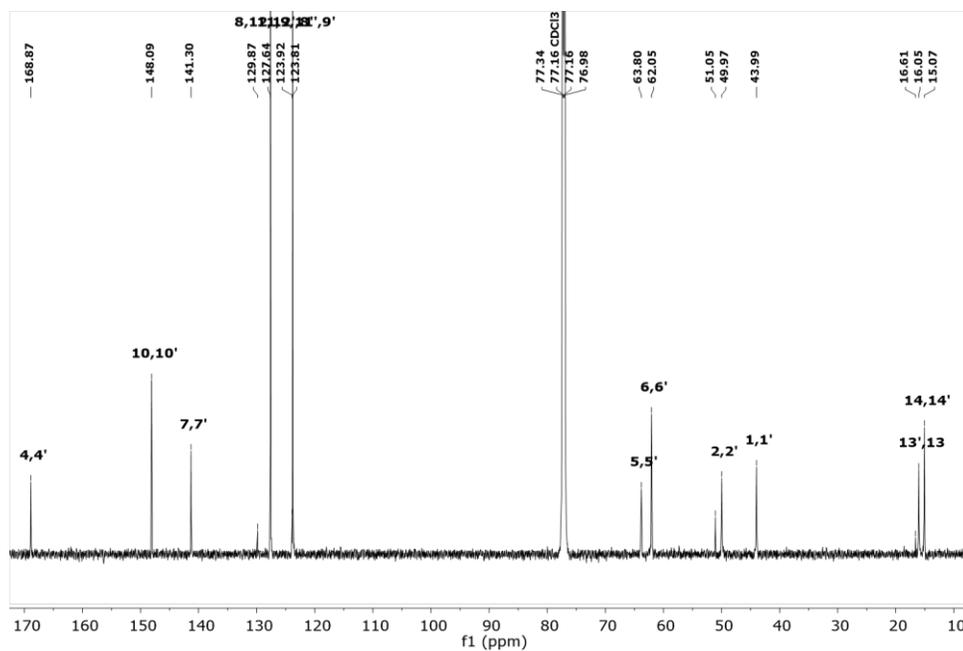


Figura 62. Espectro de RMN- ^{13}C a 175 MHz en CDCl_3 para el compuesto **8**.

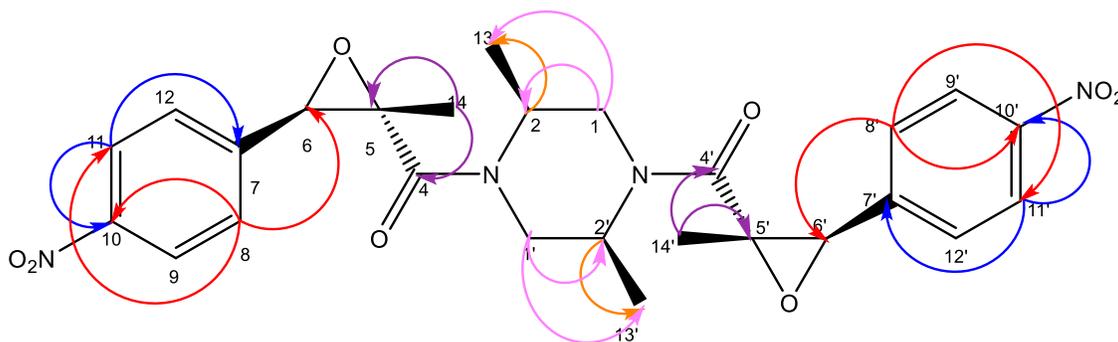


Figura 63. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **8**.

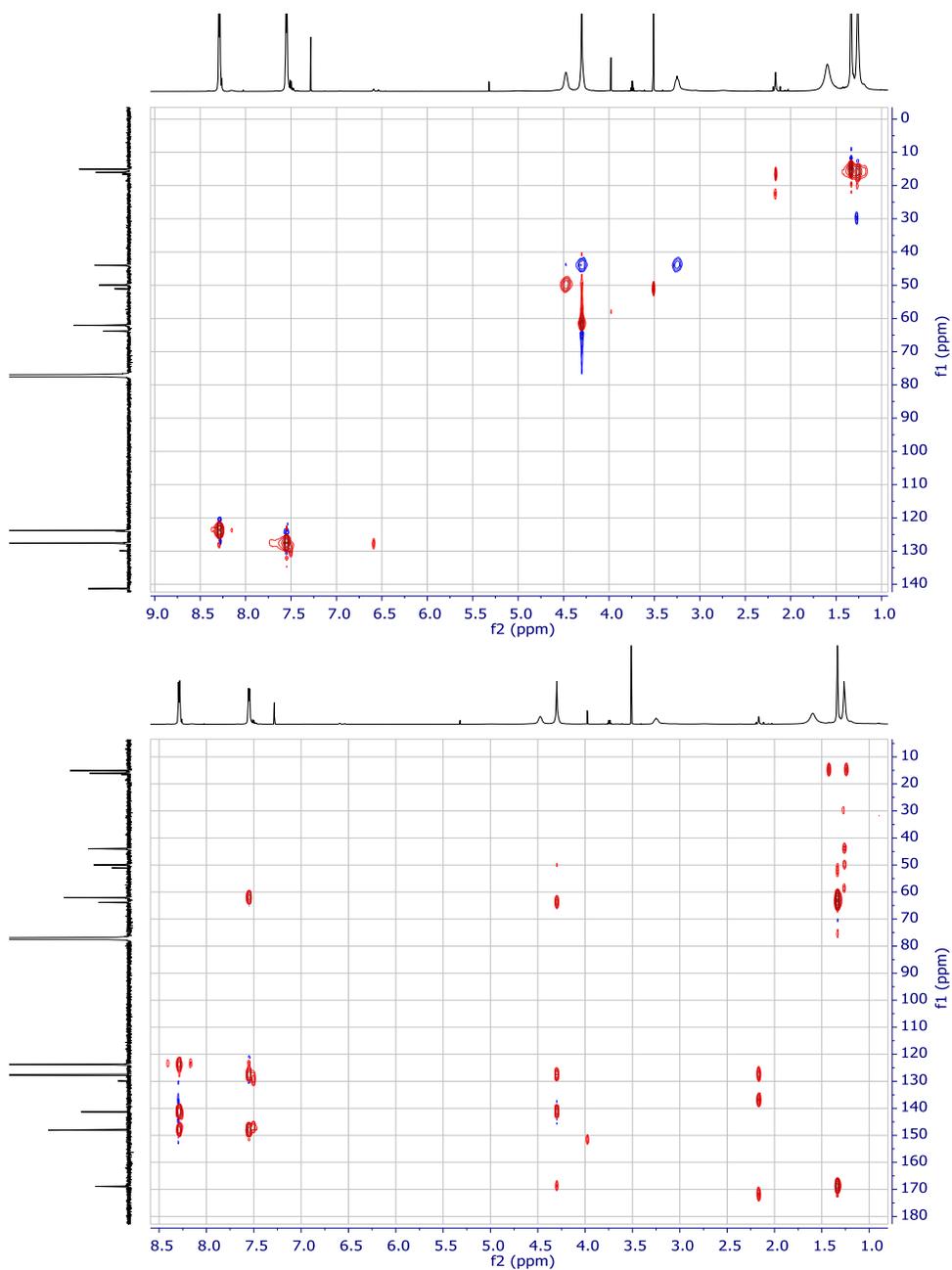


Figura 64. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto **8**.

7.3.8 Caracterización de la lovastatina (9).

La fórmula molecular calculada para el compuesto **9** fue de $C_{24}H_{36}O_5$, con base en el ión molecular, m/z 422.2900 $[M + NH_4]^+$, obtenido del análisis de la muestra por EM-ESI-AR en modo positivo (**Figura 65**). La fórmula molecular calculada fue consistente para la reportada para la lovastatina.^{51,58} A continuación, se describen las señales más importantes observadas en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (**Figuras 66-68 y Tabla 13**) para la lovastatina.

En el espectro de RMN- 1H (**Figura 66**) se visualiza un patrón característico de 14 señales asignables a metinos en δ_H 1.69 (1H, m, H₁₋₁), 2.37 (1H, dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, H₁₋₂), 2.44 (1H, tt, $J = 7.3, 3.2$ Hz, H₁₋₆), 2.34 (1H, m, H_{1-2''}), metilenos afectadas por la presencia de centros quirales en 1.97 (2H, dd, $J = 14.6, 3.9$ Hz, H_{2-7A}) 1.92 (2H, dd $J = 7.9, 2.3$ Hz, H_{2-7B}), 1.37 (2H, td, $J = 12.3, 4.4$ Hz, H_{2-9B}) y 1.51 (2H, tt, $J = 13.2, 4.2$ Hz, H_{2-9A}), 1.28 (2H, tq, $J = 14.9, 5.0$ Hz, H_{2-10A}) y 1.86 (2H, dtd, $J = 12.6, 7.8, 7.3, 3.8$ Hz, H_{2-10B}), 1.64 (2H, dd, $J = 14.4, 7.2$ Hz, H_{2-2'}), 2.62 (2H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz, H_{2-4'}) y 2.73 (2H, dd $J = 17.6, 3.8$ Hz, H_{2-4''}), metilenos no afectados por un centro quiral en δ_H 1.44 (2H, m, H_{2-3''}), esta señal corresponde al metileno ubicado en la cadena 2-metilbutano. Por último, las tres señales correspondientes a los grupos metilo se encuentran a campos más altos en 0.89 (3H, m, H_{3-4''}), 0.87 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H_{3-2-Me}), 1.07 (3H, d, $J = 7.4$ Hz, H_{3-6-Me}) y 1.10 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H_{3-2'-Me}). Este patrón de señales es muy característico de las estatinas.⁶⁸

Además, en el espectro de hidrógeno se observan señales a campos más bajos que corresponden con metinos base de oxígeno en δ_H 4.36 (1H, p, $J = 4.0$ Hz, H_{1-3'}), 4.61 (1H, dtd, $J = 13.7, 7.9, 7.0, 4.5$ Hz, H_{1-1'}) y 5.38 (1H, q, $J = 3.3$ Hz, H₁₋₈). También se aprecian tres señales correspondientes a protones olefínicos en δ_H 5.78 (1H, dd, $J = 9.7, 6.1$ Hz, H₁₋₃), esa señal se encuentra acoplada con el protón en δ_H 5.99 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H₁₋₄). La última señal que se observa que correspondiente a un protón olefínico que se encuentra en 5.52 (1H, t, $J = 3.5, 3.5$ Hz, H₁₋₅). Todas las señales fueron asignadas con su carbono empleando el espectro HSQC.

Mediante las correlaciones HMBC (**Figuras 67-68**) se determinaron los carbonos cuaternarios, así como la fusión de los dos anillos de hexano mediante el carbono en δ_C 131.7 (C-4a), el cual tiene correlaciones provenientes de los protones H-3, H-8 y H-8a, además otras correlaciones que confirman esta fusión a través del carbono en δ_C 37.45 (C-8a), son aquellas que tienen su origen en los protones H-1, H-2, H-3, H-4 y H-5.

El anillo pirano presenta correlaciones en δ_C 36.8 (C-1) con los protones H-9 y H-10 por lo cual se dedujo que este anillo se encuentra unido al carbono 1.

La cadena de 2-metilbutano se encuentra conectada a los anillos fusionados mediante un éster, cuya señal de carbonilo se observa en δ_c 176.96 (C-1'') y tiene correlaciones HMBC provenientes de H-1'', H-2'' y H-3''. Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C son congruentes con los reportados previamente, para este compuesto.^{51,58}

01002-29-6 #2120 RT: 5.61 AV: 1 NL: 1.89E8
T: FTMS + p ESI Full ms [2C]

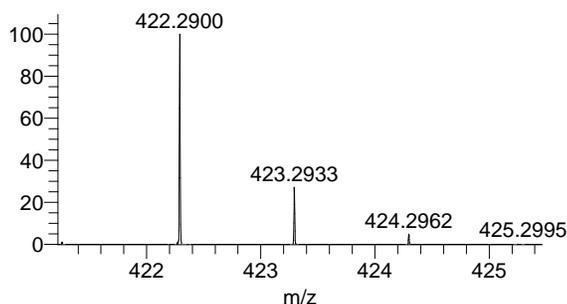


Figura 65. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **9**.

Tabla 13. Datos espectroscópicos del compuesto **9** en CDCl₃.

Posición	δ_c	δ_H [mult., J (Hz)]	Posición	δ_c	δ_H [mult., J (Hz)]
1	36.75	1.69 m	1'	76.45	4.61 dtd (13.7, 7.9, 7.0, 4.5)
2	30.83	2.37 dd (11.5, 5.5)	2'	36.34	1.64 dd (14.4, 7.1)
3	133.21	5.78 dd (9.7, 6.1)	3'	62.83	4.36 p (4.0)
4	128.47	5.99 d (9.7)	4'	38.74	2.62dd (17.6, 5.1), 2.73 dd (17.6, 3.8)
4a	131.73	-	5'	170.43	-
5	129.8	5.52 t (3.5, 3.5)	1''	176.96	-
6	27.6	2.44 tt (7.4, 3.2)	2''	41.65	2.34 m
7	32.83	1.97 dd (14.6, 3.9), 1.92 dd (7.9, 2.3)	3''	26.97	1.44 m
8	68.01	5.38 q (3.3)	4''	11.8	0.89 m
8a	37.45	2.26 dd (12.0, 3.0)	2-Me	14.03	0.87 d (7.45)
9	24.42	1.37 td (12.3, 4.4), 1.51 tt (13.2, 4.2)	6-Me	22.98	1.07 d (7.4)
10	33.1	1.28 tq (14.9, 5.0), 1.86 dtd (12.6, 7.8, 7.3, 3.8)	2''-Me	16.4	1.10 d (6.9)

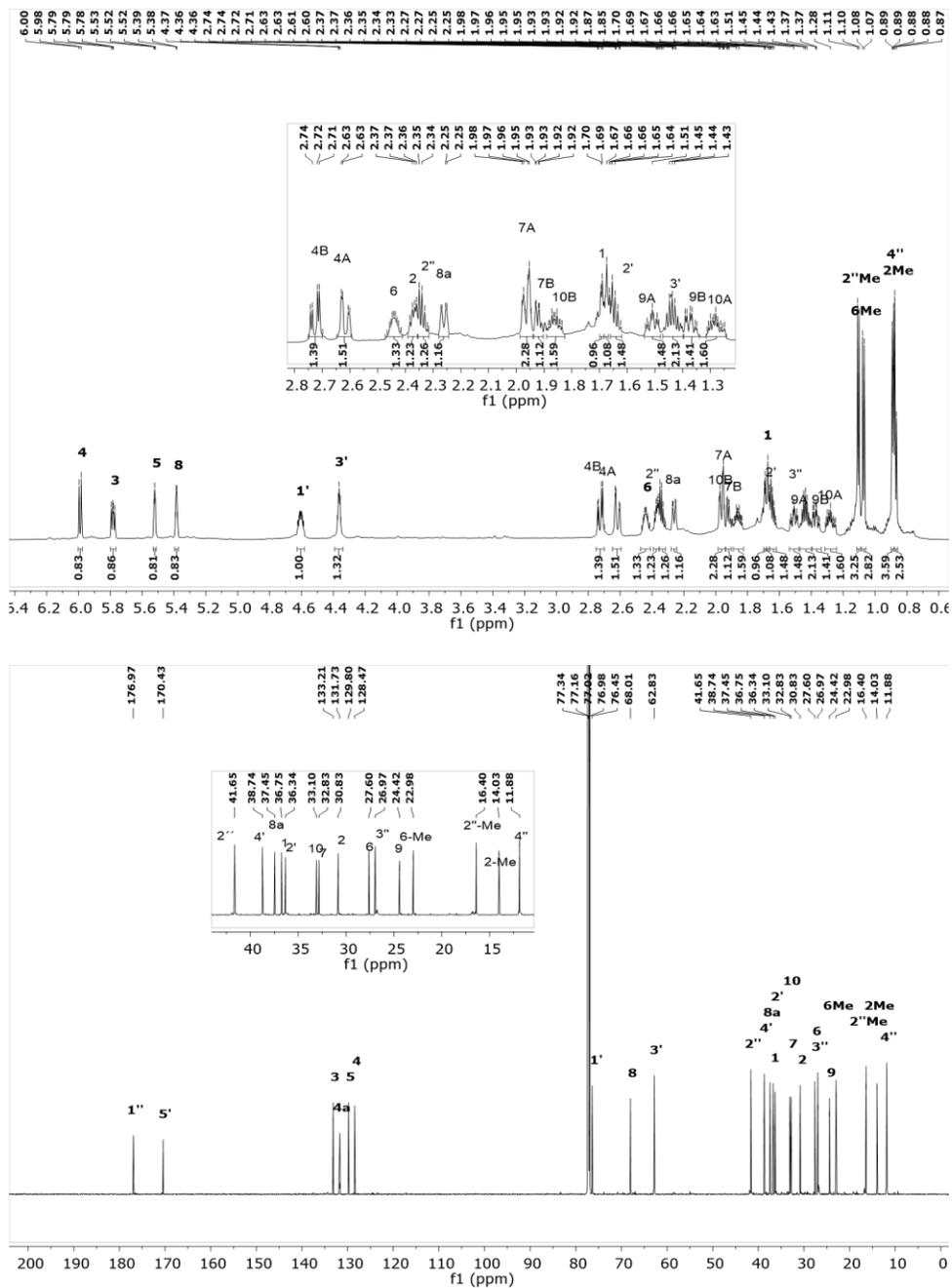


Figura 66. Espectro de RMN- ^1H a 700 MHz (arriba) y RMN- ^{13}C a 175 MHz (abajo) en CDCl_3 del compuesto **9**.

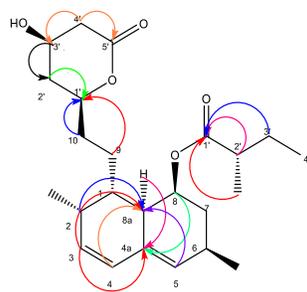


Figura 67. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **9**.

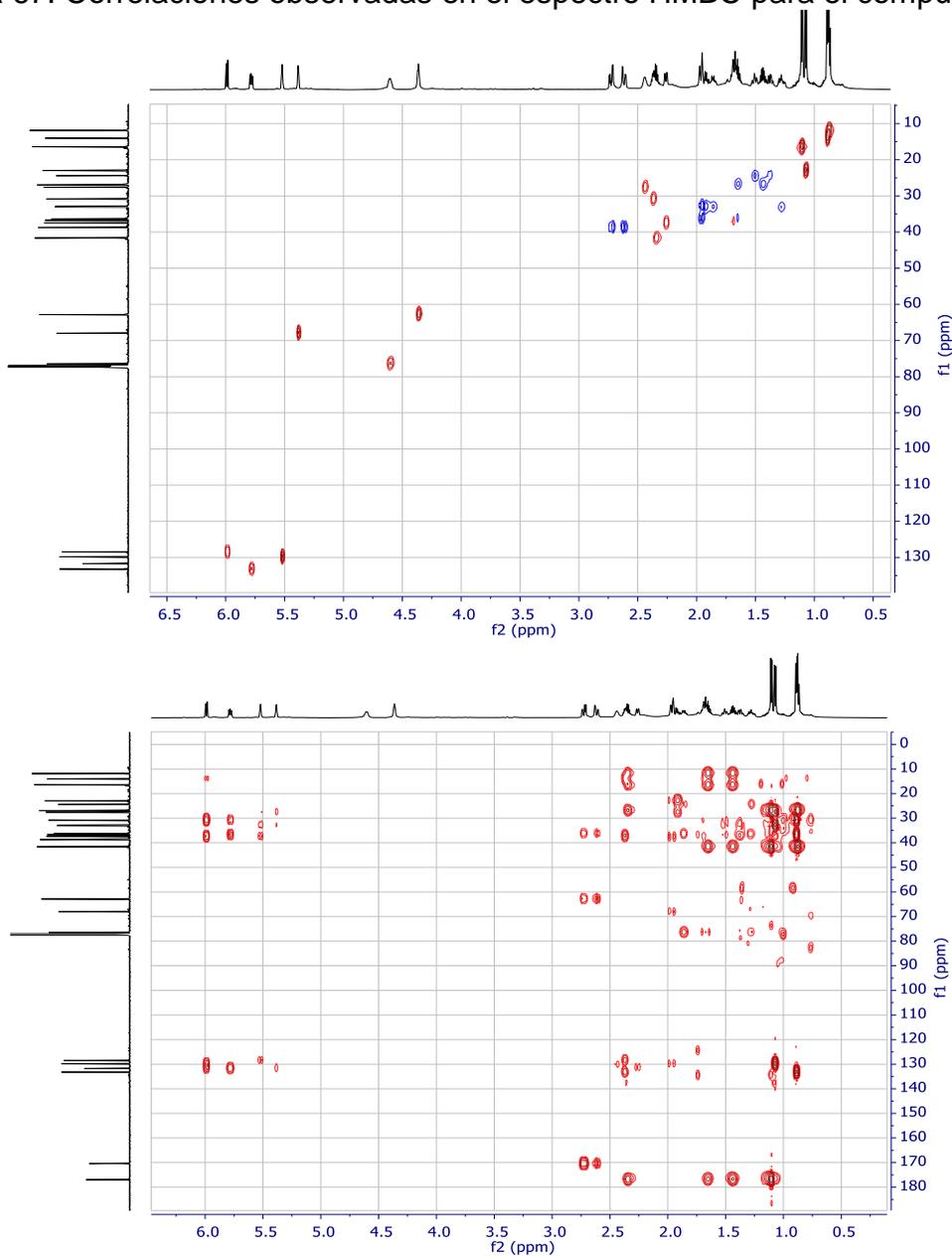


Figura 68. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto **9**.

7.3.9 Caracterización del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato (10).

La fórmula molecular para el compuesto **10** se calculó como $C_{24}H_{23}N_3O_7$, a través del análisis por EM-ESI-AR de la muestra en modo positivo, m/z 466.1620 $[M + H]^+$ (**Figura 69**). A continuación, se describen los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (**Figuras 70-72 y Tabla 14**) para la determinación del 3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida) benzoato.

El espectro de RMN- 1H (**Figura 70**) se observan nueve señales las cuales están asociadas a anillos aromáticos. Cuatro señales corresponden al anillo de piridina por lo cual se observan a campos más bajos en δ_H 9.25 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H_{1-2'}), 8.73 (1H, dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, H_{1-4'}), 7.38 (1H, ddd, $J = 8.0, 4.8, 0.9$ Hz, H_{1-5'}) y 8.27 (1H, ddd, $J = 7.9, 2.4, 1.6$ Hz, H_{1-6'}). Por el tipo de acoplamiento presentado, la sustitución en el anillo de piridina se determinó como meta al nitrógeno del heterociclo.

El conjunto de señales en δ_H 7.91 (1H, dd $J = 7.4, 1.5$ Hz, H₁₋₂), 7.24 (1H, dd $J = 7.6, 1.2$ Hz, H₁₋₃), 7.62 (1H, ddd, $J = 8.6, 7.3, 1.5$ Hz, H₁₋₄) y 8.85 (1H, dd $J = 8.4, 1.2$ Hz, H₁₋₅), indicaron la presencia de un anillo aromático *orto* sustituido.

La señal en δ_H 7.30 (1H, s, H_{1-2''}), se encuentra asociada a un anillo aromático penta sustituido por tres metoxilos un éster metílico en δ_H 3.93 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.92 (3H, s) y 3.85 (3H, s) y dos amidas que son posibles observar debido a protones correspondientes a nitrógenos en 9.22 s (1H, s, H_{1-6''-NH}) y 12.25 s (1H, s, H_{1-6-NH})

En el caso del espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 80**) se observan tres señales que corresponden a carbonilos de grupo éster amida en δ_C 168.2 (C-7), 164.0 (C-7') y 167.2 (C-7'').

Las correlaciones HMBC (**Figuras 71-72**) del protón H-2' y H-6' con el carbono del carbonilo C-7', así como las del protón 6-NH, con este mismo carbono y con C-5, demuestran que la unión del anillo de piridina con el anillo *o*-sustituido (ácido antranílico), mediante una amida. De la misma manera el protón H-2 tiene correlaciones con el carbono C-7 y el protón 6'-NH (δ_H 9.22 s) presenta las correlaciones con C-7 y con C-1 (δ_C 120.4), confirmando la unión del anillo pentasustituido y el anillo *o*-sustituido mediante un enlace de tipo amida.

Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- 1H son congruentes con los reportados previamente, para este compuesto.⁶¹

01002-69-3 #1519 RT: 4.19 AV: 1 NL: 4.21E9
 T: FTMS + p ESI Full ms [2C]

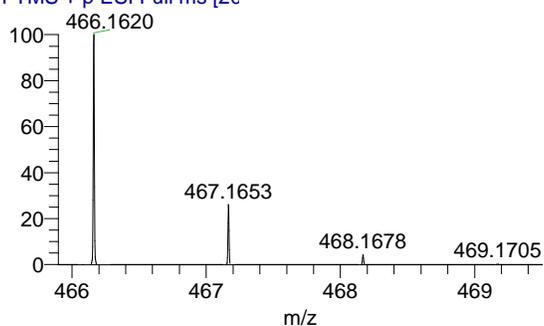


Figura 69. ESI-MS-AR en modo positivo del compuesto **10**.

Tabla 14. Datos espectroscópicos de compuesto **10** en CDCl₃.

Posición	δ_c	δ_H [mult., J (Hz)]	Posición	δ_c	δ_H [mult., J (Hz)]
1	120.4	-	1''	130.6	-
2	127.9	7.91 dd (7.4, 1.5)	2''	108.7	7.30 s
3	123.7	7.24 dd (7.6, 1.2)	3''	151.4	-
4	133.6	7.62 ddd (8.6, 7.3, 1.5)	4''	151.4	-
5	121.8	8.85 dd (8.4, 1.2)	5''	146.9	-
6	140.4	-	6''	135.2	-
7	168.2	-	7''	167.2	-
1'	133.6	-	6-NH	-	12.25 s
2'	149.3	9.25 d (1.6)	6''-NH	-	9.22 s
3'	-	-			
4'	152.6	8.73 dd (4.8, 1.7)			
5'	123.6	7.38 ddd (8.0, 4.8, 0.9)			
6'	135.2	8.27 ddd (7.9, 2.4, 1.6)			
7'	164.0	-			

*Los protones de los metoxilos de 3'', 4'', 5'' y 7'' son intercambiables encontrándose en δ_H 3.85 s, 3.92 s, 3.93 s y 3.99 s además en el espectro de carbono se observan en δ_c 61.2, 56.4 y 52.7.

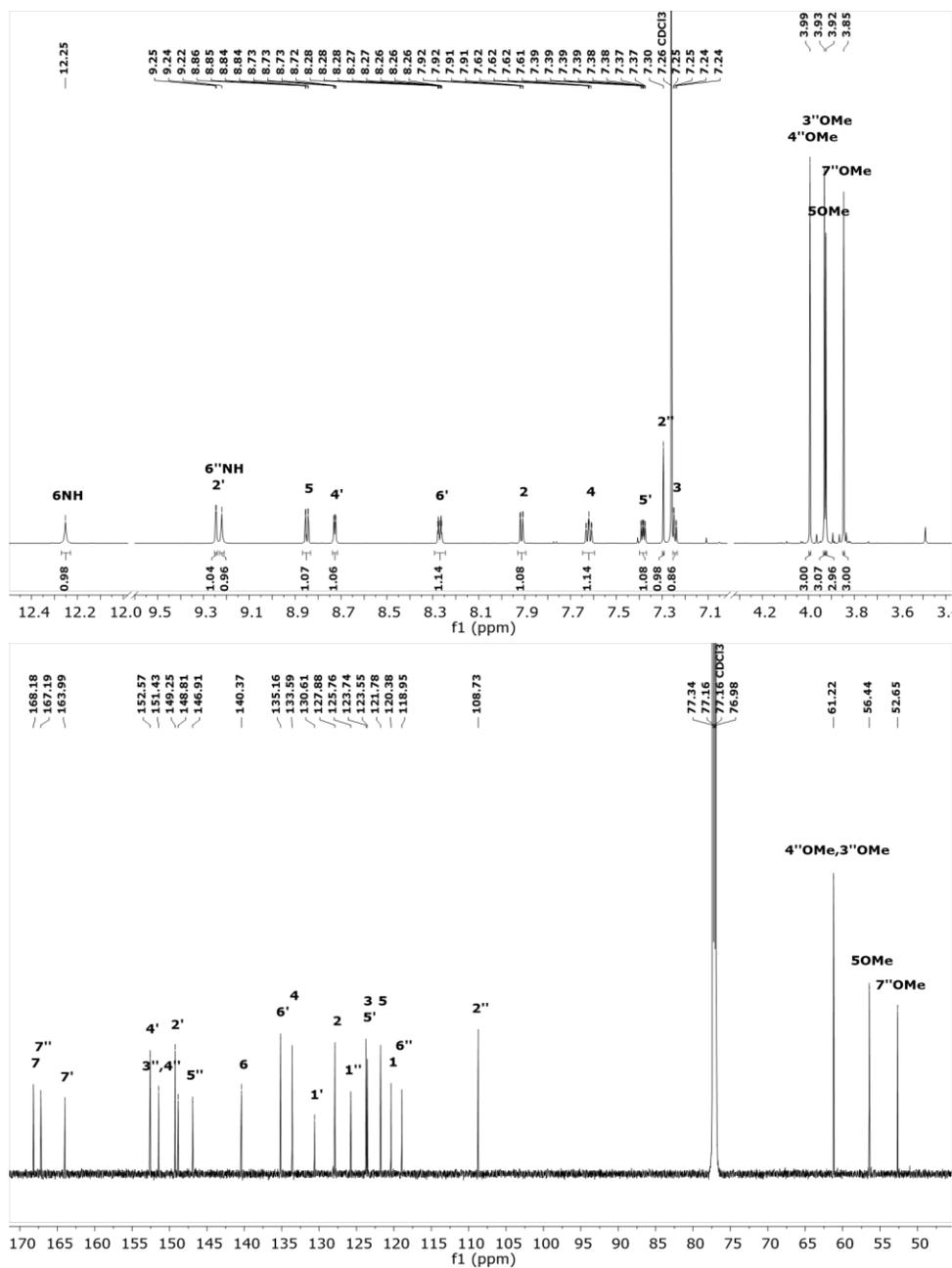


Figura 70. Espectro de RMN-¹H (700 MHz arriba) y RMN-¹³C (175 MHz abajo) en CDCl₃ del compuesto **10**.

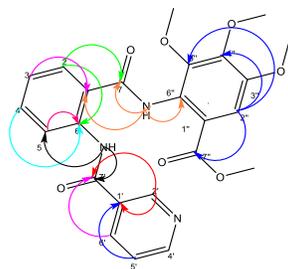


Figura 71. Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **10**.

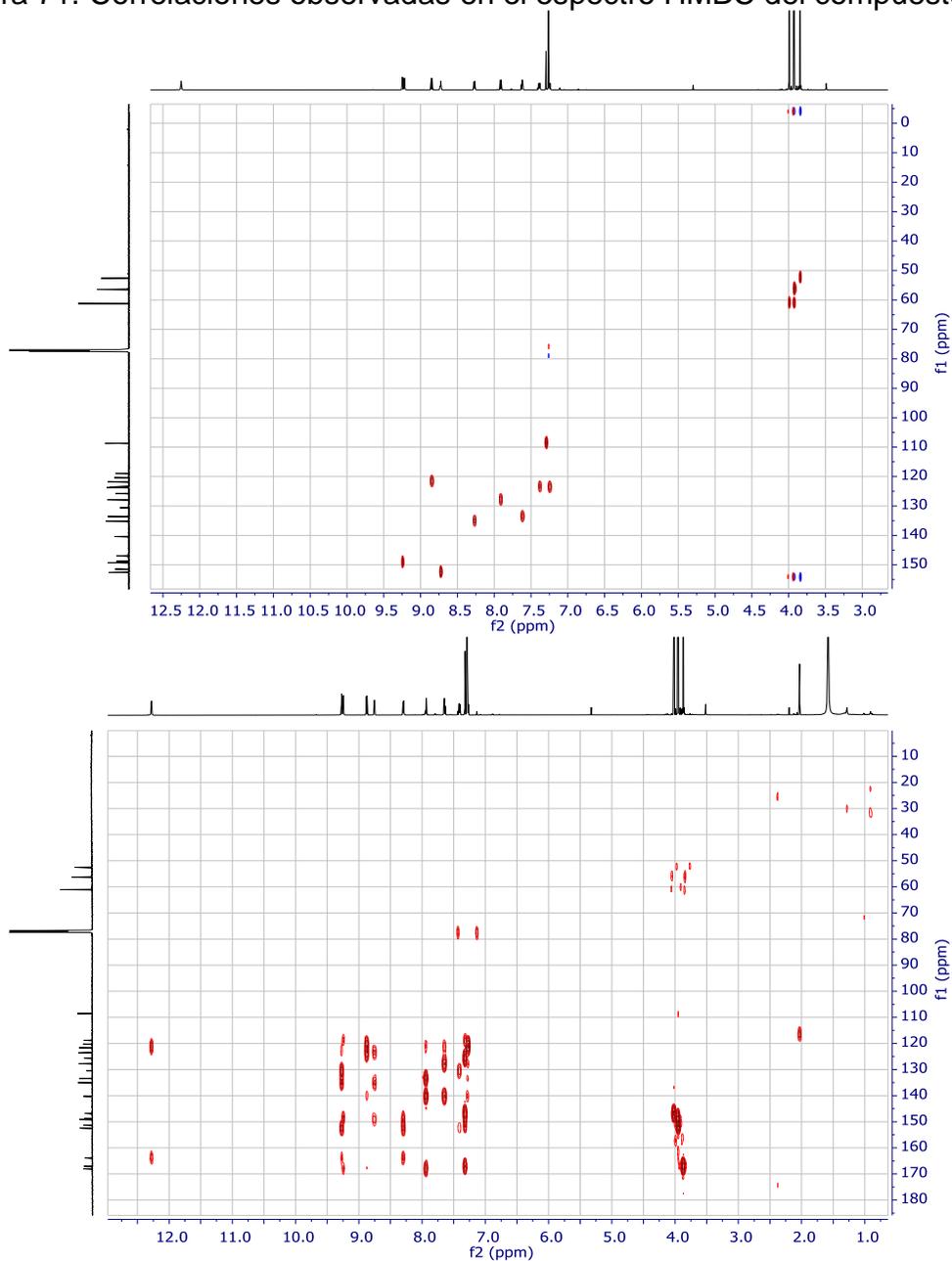


Figura 72. Espectro bidimensional HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto **10**.

7.4 Estudios *in silico* y evaluación *in vitro*.

Para evaluar la actividad *in silico* de los compuestos aislados y derivados de butirolactona I (**1**), se empleó la estructura cristalográfica de la enzima α GHY, obtenida del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) [código PDB: 3A4A].

Estudios previos muestran que solo la isomaltosa se une al sitio catalítico de esta proteína, lo cual le confiere especificidad por los sustratos que poseen enlaces α -1-6.^{69,70} Una vez seleccionada la proteína se realizó el ensayo de acoplamiento como se describe en la sección correspondiente, obteniendo el valor de la constante de inhibición para cada compuesto, así como un sitio de unión (**Tabla 15**).

Los sitios de unión para la inhibición de la enzima α GHY de los compuestos estudiados, son diferentes. Las moléculas se pueden agrupar de acuerdo con sitios de unión como se visualiza de manera general (**Figura 74**). De lo anterior se obtiene para el primer grupo de moléculas lo siguiente:

La butirolactona I (**1**), se une en un sitio de unión conformado por los aminoácidos: LYS373, PRO488, SER490, ASN493, PHE494, PHE563, PRO567, LYS568, VAL571, LEU561, GLY564 y TYR566.

La aspernólida A (**2**), se une con los aminoácidos: LYS373, PRO488, ASN489, PHE494, GLU497, LYS563, GLY564, ASN565, TRY566 y LYS568.

El compuesto asperteretona D (**6**) con configuración *S*, en el carbono 4 tiene interacción con los aminoácidos: LYS373, ASN489, PHE494, GLU497, PHE563, GLY564, ASN565, TRY566, LYS568, PRO567 y LYS56.

La butirolactona IV (**7**) con configuración *R* en la posición 2''', presenta inhibición al unirse con los aminoácidos: LYS373, ASN489, ASN493, PHE494, GLU497, GLU562, PHE563, GLY564 y LYS568.

La chrisamida B (**8**), inhibe al unirse en los aminoácidos: LYS373, PRO488, ASN489, PHE494, PHE563, GLY564, ASN565, TRY566, PRO567, LYS568 y LYS569.

En resumen, la estructura de la butirolactona I (**1**), al sufrir modificaciones estructurales cambia su tipo de inhibición, hecho observable en los compuestos **3**, **4** y **5**, los cuales interaccionan con aminoácidos semejantes a los que constituyen el sitio de unión de la acarbosa, por lo cual su tipo de inhibición se consideraría de carácter competitivo.

La configuración de los centros quirales de la molécula también es otro factor para considerar, puesto que se planteó el estudio para ambos centros quirales tanto para un compuesto de semisíntesis la asperteretona D (**6**) y para el producto natural butirolactona IV (**7**). De esta manera se obtuvo que para la asperteretona D (**6**) con configuración *S* en el carbono 4, el sitio de unión es diferente a la molécula con configuración *R* (inhibición competitiva).

En el caso de la butirolactona IV (**7**), ninguna de las configuraciones planteadas es semejante a la acarbosa, inclusive el sitio de unión de esta molécula con configuración *S* es diferente a todas las demás moléculas estudiadas en este trabajo.

De lo anterior se comprueba que la proteína empleada tiene estereoespecificidad por el ligando para su inhibición, por lo cual es útil para su empleo en la búsqueda de nuevos fármacos con potencial antidiabético.

La evaluación sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura (α GHY) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito previamente de la sección experimental. Para monitorear la actividad de esta enzima se empleó el principio de que la actividad de la enzima α -glucosidasa correlaciona con la cantidad de sustrato (α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo, *p*NPG) que hidroliza en presencia del compuesto prueba. Así la cantidad de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado a partir del sustrato es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (**Figura 73**).⁷¹

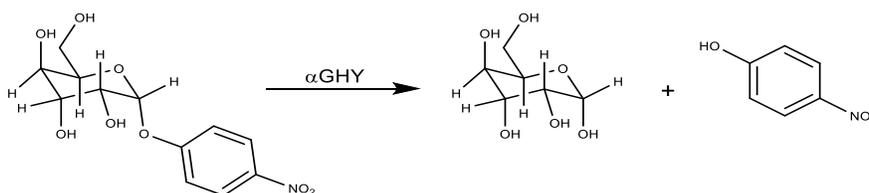


Figura 73. Reacción de hidrólisis de *p*NPG en presencia de α -glucosidasa

Empleando como referencia la butirolactona I (**1**), se observa que los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* (**Figura 75**), no correlacionan con los obtenidos a partir de los estudios *in silico*. Por ejemplo, estos modelos predijeron una menor afinidad de los compuestos **3**, **4** y **7** con la enzima, sin embargo, su actividad *in vitro* fue mayor que la del compuesto de referencia (**1**). En contraste, para los compuestos **5** y **6** esta correlación fue acertada.

La evaluación *in vitro* (**Figura 75**) mostró un aumento en la actividad de la molécula **1** tratada con bromo (**5**) y la asperteretona D (**6**), en comparación con la butirolactona I (**1**). En cambio, la aspernólida A (**2**), presenta un valor similar de porcentaje de inhibición.

Tabla 15. Modelo estructural para los compuestos aislados y conformaciones teóricas.

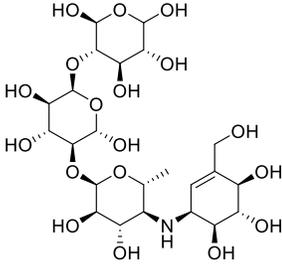
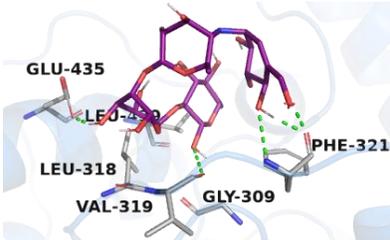
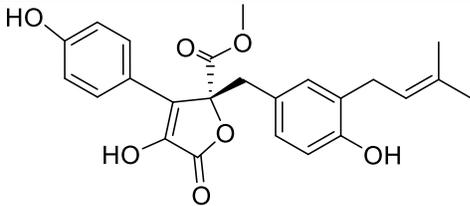
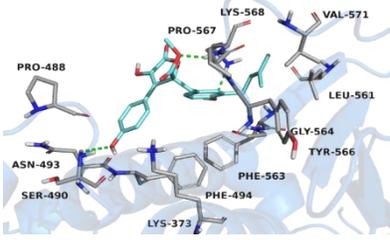
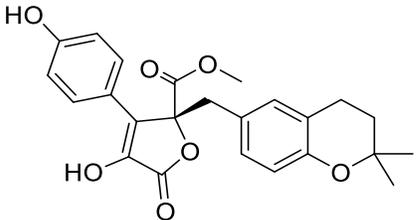
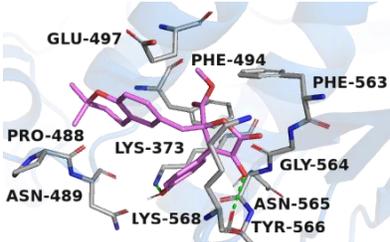
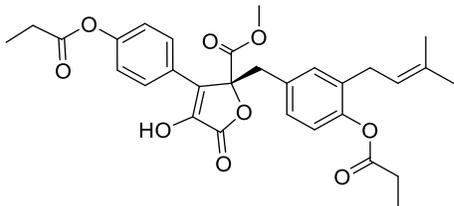
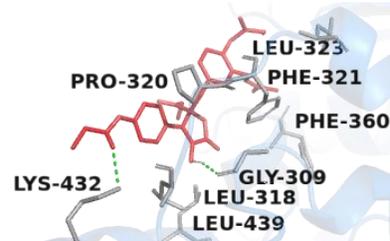
Molécula	Ki (μM)	% Inhibición	Acoplamiento
 <p>Acarbosa</p>	938.08*	47.18	
 <p>Butirolactona I (1)</p>	82.03	11.81	
 <p>Aspernólida A (2)</p>	67.21	10.52	
 <p>4',4''-dipropanóico de butirolactona I (3)</p>	1.11*	16.89	

Tabla 15. Modelo estructural para los compuestos aislados y conformaciones teóricas (continuación).

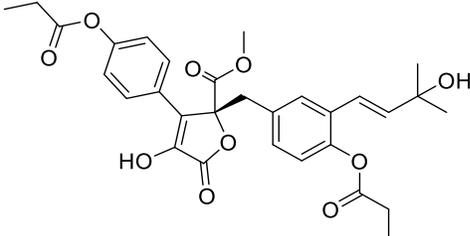
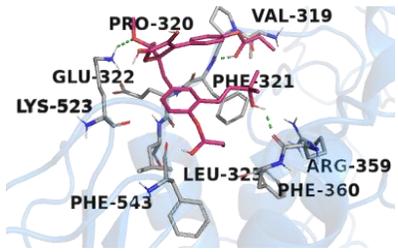
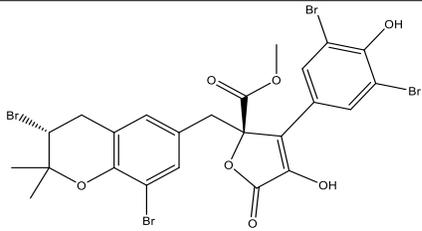
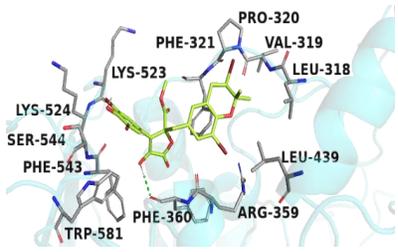
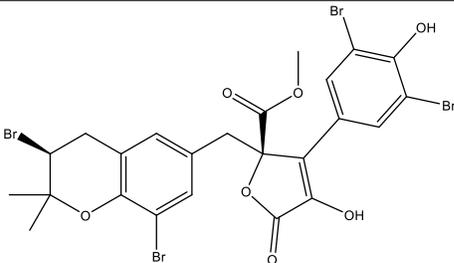
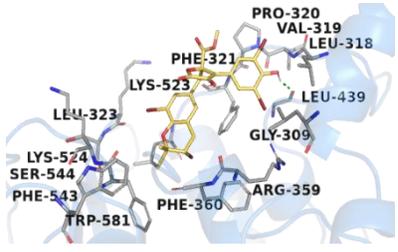
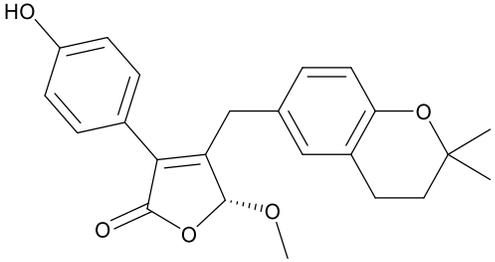
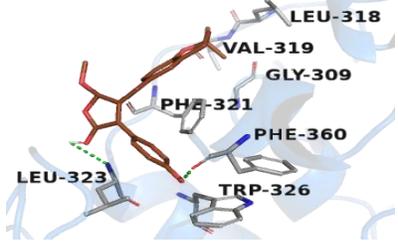
Molécula	Ki (μM)	% Inhibición	Acoplamiento
 <p>Δ^{1''},^{2''}-3''-hidroxi-4',4''-dipropiónico de butirolactona I (4)</p>	2.94*	17.74	
 <p>5',3'',5'',2''-tetrabromo aspernólida A (5R)</p>	36.38	42.48	
 <p>5',3'',5'',2''-tetrabromo aspernólida A (5S)</p>	59.47	42.48	
 <p>Asperteretona D (6R)</p>	58.96	30.41	

Tabla 15. Modelo estructural para los compuestos aislados y conformaciones teóricas (continuación).

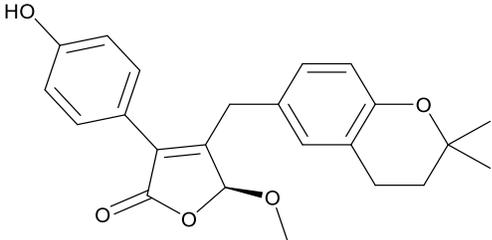
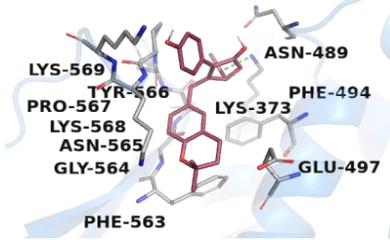
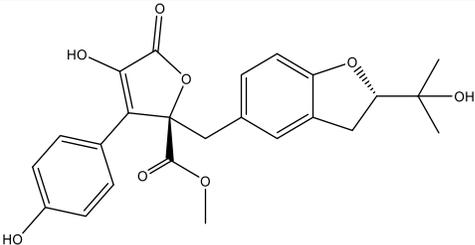
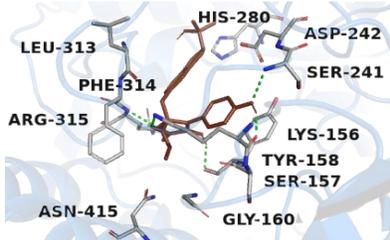
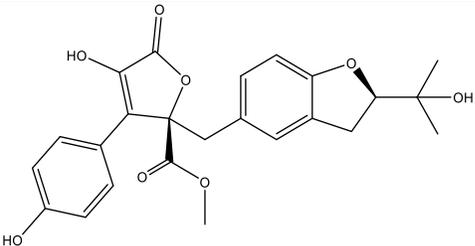
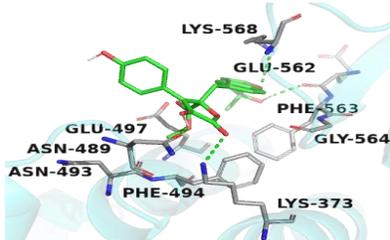
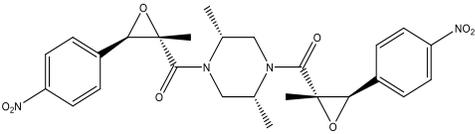
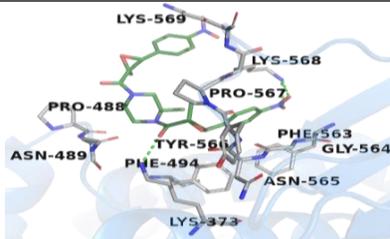
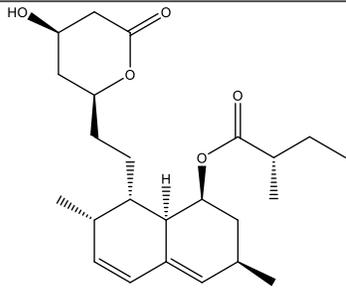
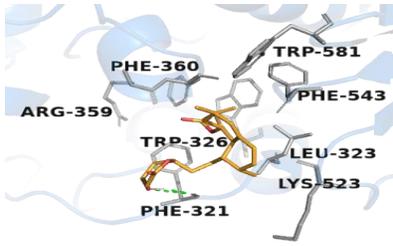
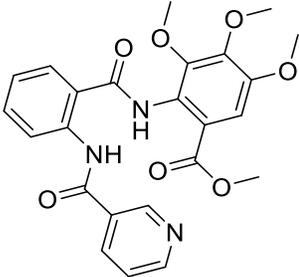
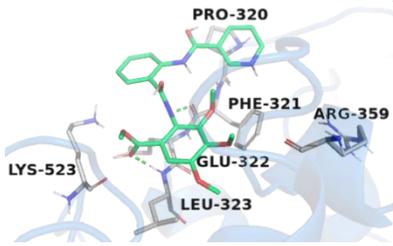
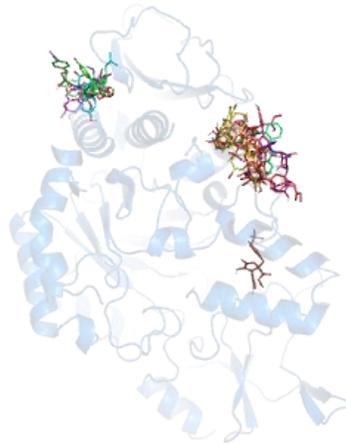
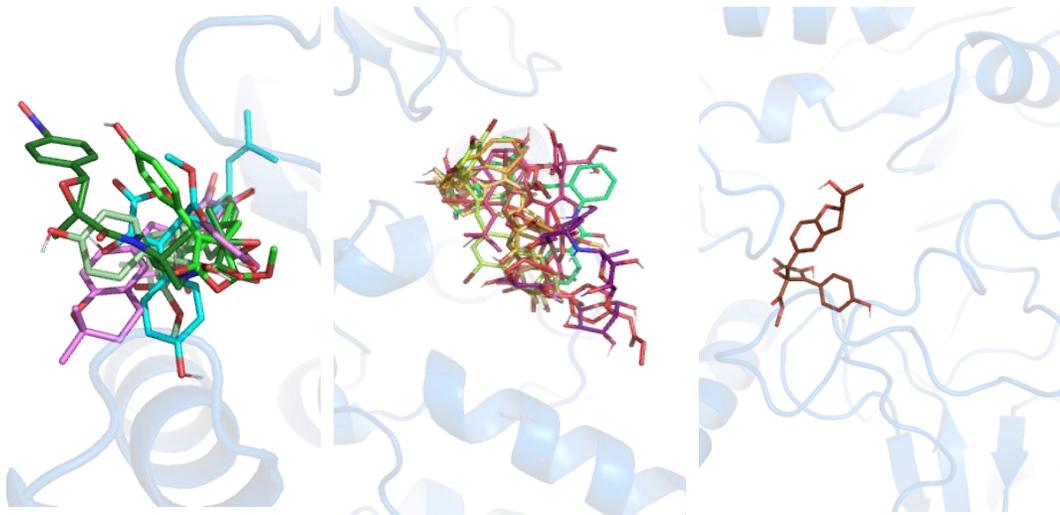
Molécula	Ki (μM)	% Inhibición	Acoplamiento
 <p>Asperteretona D (6S)</p>	26.63	30.41	
 <p>Butirolactona IV (7S)</p>	245.49	16.94	
 <p>Butirolactona IV (7R)</p>	470.40	16.94	
 <p>Chrisamida B (8)</p>	27.38	6.35	

Tabla 15. Modelo estructural para los compuestos aislados y conformaciones teóricas (continuación).

Molécula	Ki (μM)	% Inhibición	Acoplamiento
 <p>Lovastatina (9)</p>	61.66	5.71	
 <p>3,4,5-trimetoxi-2-(2-(nicotinamida)benzamida)benzoato (10)</p> <p>*mM</p>	666.17	-21.50	



Proteína completa con todas regiones donde se une alguna molécula



<p>Sitio de unión de las moléculas 1 (Azul), 2 (Rosa), 6S (Verde limón), 7R (Verde pálido) y 8 (Verde bandera)</p>	<p>Sitio de unión de las moléculas 3 (Rojo), 4 (Rosa), 5 (Amarillo), 6R (Anaranjado), 9 (Anaranjado pálido), 10 (Verde) y acarbosa (Morado)</p>	<p>Sitio de unión de la molécula 7S (Café)</p>
---	---	---

Figura 74. Sitios de unión a α -glucosidasa de las diferentes moléculas.

En la literatura se ha demostrado que los compuestos halogenados, predominantemente con cloro y bromo (~4000 moléculas obtenidas de fuentes naturales) poseen actividad biológica relevante contra diversas dianas terapéuticas. Este hecho, ha resultado en el desarrollo de estrategias sintéticas conducentes a la incorporación de halógenos en productos naturales, permitiendo el desarrollo de futuros medicamentos más eficaces.^{49,50} En cuanto a la molécula **6**, también se observó un aumento de la actividad biológica en comparación con el compuesto **1**. Este hecho se puede explicar tomando en cuenta las diferencias estructurales entre ambas moléculas. Por ejemplo, el reacomodo en el anillo furano y la distribución espacial de los anillos aromáticos y sustituyentes de las posiciones 1 y 4 en el producto **6** (configuración 4*R*).

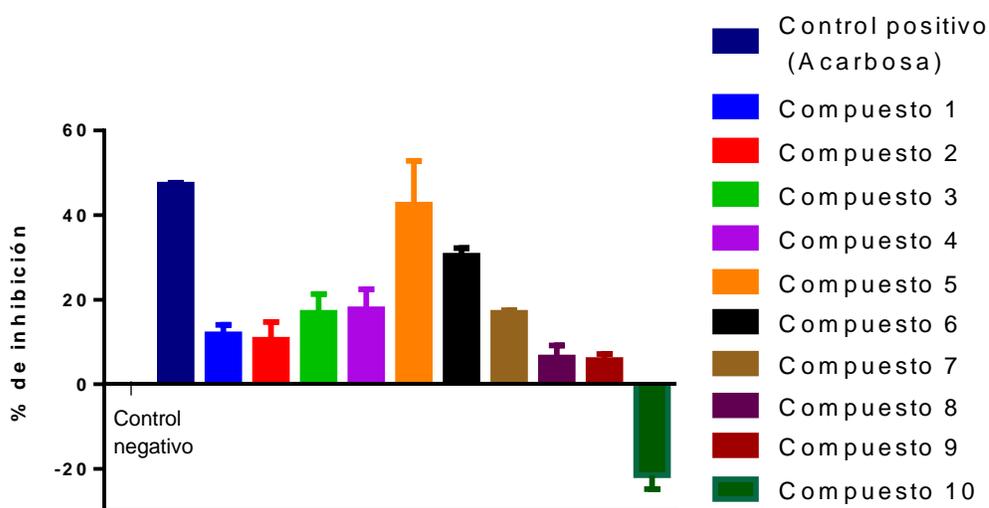


Figura 75. Porcentaje de inhibición de α GHY de los compuestos **1-10** evaluados a 100 ppm. Los datos mostrados son el promedio \pm el sem de tres experimentos independientes.

8. CONCLUSIONES.

En este proyecto se demostró a través de la evaluación *in vitro* de extractos orgánicos, que los microorganismos fúngicos aislados de humedales tienen un alto potencial como inhibidores de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

El estudio químico de hongo IQ-046 identificado como *Aspergillus terreus* permitió explorar la gran diversidad estructural de metabolitos secundarios producidos por la especie, entre ellos, la butirolactona I (**1**), la butirolactona IV (**7**), la lovastatina (**9**) y un derivado del ácido antranílico (**10**), moléculas que podrían funcionar como marcadores de este microorganismo. Es importante mencionar que el presente estudio representa el primer reporte del aislamiento de la chrisamida B (**8**) a partir de una especie del género *Aspergillus*.

La exploración de la reactividad química de la butirolactona I (**1**) permitió la formación de nuevos compuestos a través de la formación de derivados empleando reactivos convencionales. Las modificaciones estructurales de **1** (**5** y **6**) permitieron mejorar el potencial inhibitorio sobre la enzima α GHY.

Los estudios de acoplamiento molecular indicaron que los compuestos **1**, **2**, **6S**, **7** y **8**, se unen a la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en sitios diferentes al dominio catalítico, mientras que el resto de los compuestos podrían inhibir a la enzima de manera competitiva, al unirse en su sitio catalítico.

9. PERSPECTIVAS

Realizar la búsqueda de posibles dianas terapéuticas con las cuales los nuevos derivados semisintéticos de butirolactona (1) tengan mayor afinidad.

Plantear estrategias con mejores rendimientos para la síntesis de asperteretona D (6) a partir de butirolactona I (1).

Explorar si existe una ruta de biotransformación de butirolactona I (1) a asperteretona D (6) en el hongo *Aspergillus terreus*.

Realizar el estudio del hongo IQ-046 explorando todos los metabolitos secundarios que produce este microorganismo.

10. REFERENCIAS

1. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(6):3670–3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
2. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011;46(10):4769–4807. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.057
3. Mata R, Figueroa M, Rivero-Cruz. Insights in Fungal Bioprospecting in Mexico. *Planta Med.* 2018;84(9–10):594–605. doi:10.1055/s-0044-101551
4. Lumbreras-Martínez H, Espinoza C. Bioprospecting of fungi with antiproliferative activity from the mangrove sediment of the Tampamachoco coastal lagoon, Veracruz, Mexico. *Sci Fungorum.* 2018;48(October):53–60. doi:10.33885/sf.2018.48.1234
5. Chen J, Li W, Yao H, Xu J. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia.* 2015;103:231–241. doi:10.1016/j.fitote.2015.04.012
6. Guo Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(2):119–136. doi:10.1016/j.apsb.2016.06.003
7. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 9th.* Brussels, Belgium; 2019. <https://www.diabetesatlas.org>.
8. Dewi RT, Tachibana S, Darmawan A. Effect on α -glucosidase inhibition and antioxidant activities of butyrolactone derivatives from *Aspergillus terreus* MC751. *Med Chem Res.* 2014;23(1):454–460. doi:10.1007/s00044-013-0659-4
9. Zhongbin C., Yuanli L. Butenolide Derivatives with α -Glucosidase Inhibitions from the Deep-Sea-Derived Fungus *Aspergillus terreus* YPGA10. *Mar Drugs.* 2019;17(Figure 1):1–9. doi:<https://doi.org/10.3390/md17060332>
10. Abdel Raouf GF, Mohamed KY. Natural Products for the Management of Diabetes. Vol 59. 1a ed. Elsevier B.V.; 2019. doi:10.1016/B978-0-444-64179-3.00010-4
11. Belén Julieta Velasco-Guzmána VMB-RR. Artículos de Revisión Diabetes Mellitus Tipo 2: Epidemiología y Emergencia en Salud. *Consenso Mex Resist a la Insul y síndrome metabólico Rev Mex.* 2014;1:1–6. doi:10.1038/ncb1724
12. Nathan AJ, Scobell A. How China sees America. *Foreign Aff.* 2012;91(5):1–150. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
13. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral Antidiabetic Agents Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. 2005;65(3):385–411.

14. Stocker CJ. Type 2 Diabetes Methods and protocols. 2a ed. Springer Protocols; 2019. doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9882-1>
15. Quintanilla-García C, Zúñiga-Guajardo S. El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2010;48(5):509–520.
16. Borges de Melo E, da Silveira Gomes A, Carvalho I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron.* 2006;62(44):10277–10302. doi:10.1016/j.tet.2006.08.055
17. Kimura A, Lee JH, Lee IS. Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II. *Carbohydr Res.* 2004;339(6):1035–1040. doi:10.1016/j.carres.2003.10.035
18. Nakai H, Okuyama M, Kim. Molecular analysis of alpha-glucosidase belonging to GH-family 31. *Biol - Sect Cell Mol Biol.* 2005;60(SUPPL. 16):131–135.
19. Okuyama M. Function and structure studies of GH family 31 and 97 α -glycosidases. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(12):2269–2277. doi:10.1271/bbb.110610
20. Mata R, Cristians S, Escandón-Rivera. Mexican antidiabetic herbs: Valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J Nat Prod.* 2013;76(3):468–483. doi:10.1021/np300869g
21. Ghani U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *Eur J Med Chem.* 2015;103:133–162. doi:10.1016/j.ejmech.2015.08.043
22. S.H.N. Moorthy N, J. Ramos M, A. Fernandes P. Studies on α -Glucosidase Inhibitors Development: Magic Molecules for the Treatment of Carbohydrate Mediated Diseases. *Mini-Reviews Med Chem.* 2012;12(8):713–720. doi:10.2174/138955712801264837
23. Israili ZH. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Ther.* 2011;18(2):117–152. doi:10.1097/MJT.0b013e3181afb51
24. José-Luis Ríos, Flavio-Francini GRS. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med.* 2015;81:975–994. doi:<http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1546131>
25. Márquez Arabia JJ, Ramón Suárez G, Márquez Tróchez J. El ejercicio en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Argent Endocrinol Metab.* 2012;49(4):203–212.
26. Asano N. Glycosidase inhibitors: Update and perspectives on practical use. *Glycobiology.* 2003;13(10):93–104. doi:10.1093/glycob/cwg090
27. Alam F, Kamal MA, Gan SH. Updates on Managing Type 2 Diabetes Mellitus

- with Natural Products: Towards Antidiabetic Drug Development. 2018;5395–5431. doi:10.2174/0929867323666160813222436
28. Abhijeet Singh YM. Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *J Microb Biochem Technol*. 2014;s8(01). doi:10.4172/1948-5948.s8-004
 29. The drug book: from arsenic to Xanax, 250 milestones in the history of drugs. *Choice Rev Online*. 2014. doi:10.5860/choice.51-5048
 30. Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):167–180. doi:10.1038/s41579-018-0121-1
 31. Bills GF, Gloer and J. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol Spectr*. 2016;6(4):1–32. doi:10.1128/9781555819583
 32. Alberti F, Foster GD, Bailey AM. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(2):493–500. doi:10.1007/s00253-016-8034-2
 33. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot Vol*. 2005;58(1):1–26. <https://0-www-nature-com.pugwash.lib.warwick.ac.uk/articles/ja20051.pdf>.
 34. Steinbeck MSC. On the redundancy of natural products public databases and where to find data in 2020 - a review on natural products databases. Vol 53.; 2019. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 35. Chávez R, Fierro F, García-Rico. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Front Microbiol*. 2015;6(SEP):1–7. doi:10.3389/fmicb.2015.00903
 36. Ancheeva E, Daletos G, Proksch P. Lead compounds from mangrove-associated microorganisms. *Mar Drugs*. 2018;16(9). doi:10.3390/md16090319
 37. Park HS, Jun SC, Han KH, Hong SB, Yu JH. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Adv Appl Microbiol*. 2017;100:161–202. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001
 38. Aparicio-Cuevas MA, Rivero-Cruz I, Sánchez-Castellanos M, et al. Dioxomorpholines and Derivatives from a Marine-Facultative *Aspergillus* Species. *J Nat Prod*. 2017;80(8):2311–2318. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00331
 39. Zak JC, Wildman HG. Fungi in Stressful Environments. Elsevier Inc.; 2004. doi:10.1016/B978-012509551-8/50017-9
 40. Pearce CJ. Review of New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* System Properties and

- Applications. *J Nat Prod.* 2019;82(4):1051. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00211
41. Frisvad JC, Larsen TO. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(19):7859–7877. doi:10.1007/s00253-015-6839-z
 42. Siddiquee S. Recent Advancements on the Role of Biologically Active Secondary Metabolites from *Aspergillus*. Elsevier B.V.; 2018. doi:10.1016/b978-0-444-63501-3.00004-1
 43. Li H, Xu D, Sun. HPLC-DAD-Directed Isolation of Linearly Fused Prenylated Indole Alkaloids from a Soil-Derived *Aspergillus versicolor*. *J Nat Prod.* 2019;82(8):2181–2188. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00183
 44. Tsang CC, Tang JYM, Lau SKP, Woo PCY. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:197–210. doi:10.1016/j.csbj.2018.05.003
 45. Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Vol 86. 1a ed. Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4
 46. Qi C, Gao W, Guan D. Butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus* with antitumor activities against pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Bioorganic Med Chem.* 2018;26(22):5903–5910. doi:10.1016/j.bmc.2018.10.040
 47. Palonen E, Neffling M-R, Raina S, et al. Butyrolactone I Quantification from Lovastatin Producing *Aspergillus terreus* Using Tandem Mass Spectrometry— Evidence of Signalling Functions. *Microorganisms.* 2014;2(2):111–127. doi:10.3390/microorganisms2020111
 48. Parvatkar, R. R., D'Souza, C., Tripathi, A., & Naik, C. G. (2009). Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry*, 70(1),. *Phytochemistry.* 2009;70(1):128–132. doi:10.1016/j.phytochem.2008.10.017
 49. Ding Y, Ye X, Zhu J, Zhu X, Li X, Chen B. Structural modification of berberine alkaloid and their hypoglycemic activity. *J Funct Foods.* 2014;7(1):229–237. doi:10.1016/j.jff.2014.02.007
 50. Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. Halogenation Strategies In Natural Product Biosynthesis. *Chem Biol.* 2008;15(2):99–109. doi:10.1016/j.chembiol.2008.01.006
 51. Cazar ME, Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2005;21(6–7):1067–1075.

doi:10.1007/s11274-004-8150-5

52. Hayata Y. Butyrolactones from *Aspergillus terreus*. *Chem Pharm Bull.* 2002;(43):2091.
53. Zhang YY, Zhang Y, Yao YB, Lei XL, Qian ZJ. Butyrolactone-I from coral-derived fungus *Aspergillus terreus* attenuates neuro-inflammatory response via suppression of NF- κ B pathway in BV-2 cells. *Mar Drugs.* 2018;16(6). doi:10.3390/md16060202
54. Haroon MH, Premaratne SR, Choudhry. A new β -glucuronidase inhibiting butyrolactone from the marine endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Nat Prod Res.* 2013;27(12):1060–1066. doi:10.1080/14786419.2012.708659
55. Fazio AT, Bertoni MD, Adler MT. Culture studies on the mycobiont isolated from *Parmotrema reticulatum* (Taylor) Choisy: Metabolite production under different conditions. *Mycol Prog.* 2009;8(4):359–365. doi:10.1007/s11557-009-0609-1
56. Sosa-Rodríguez T, Sánchez-Nieves J, Melgarejo L. Functional Roll of Fungi in Mangrove Ecosystems. *Boletín Investig Mar y Costeras - INVEMAR.* 2009;38(1):39–57.
57. Chen S, Wang J, Lin X, et al. Chrysamides A-C, Three Dimeric Nitrophenyl trans-Epoxyamides Produced by the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO41001. *Org Lett.* 2016;18(15):3650–3653. doi:10.1021/acs.orglett.6b01699
58. Nazri MM, Samat FD, Kavanagh. Nature's cholesterol-lowering drug: Isolation and structure elucidation of lovastatin from red yeast rice-containing dietary supplements. *J Chem Educ.* 2012;89(1):138–140. doi:10.1021/ed1004195
59. Liu M, Qi C, Sun W, et al. α -Glucosidase Inhibitors From the Coral-Associated Fungus *Aspergillus terreus*. *Front Chem.* 2018;6(September):1–11. doi:10.3389/fchem.2018.00422
60. Chen J, Li J, Zhu. Total synthesis and structure revision of chrysamide B. *Org Chem Front.* 2018;5(23):3402–3405. doi:10.1039/c8qo00949j
61. Arai K. Metabolic Products of *Aspergillus terreus* VI. *Chem Pharm Bull.* 1980;(43):2091.
62. Ouk S, Thiébaud S, Borredon E, Le Gars P. High performance method for O-methylation of phenol with dimethyl carbonate. *Appl Catal A Gen.* 2003;241(1–2):227–233. doi:10.1016/S0926-860X(02)00467-2
63. Zhao H-Y, Anbuchezhian R, Sun W, et al. Cytotoxic Nitrobenzoyloxy-substituted Sesquiterpenes from Spongederived Endozoic Fungus *Aspergillus insulicola* MD10-2. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(3):271–274. doi:10.2174/1389201017666151223123424

64. Rahbaek L, Christophersen C, Frisvad J, Bengaard HS, Larsen S, Rassing BR. Insulicolide A: A new nitrobenzoyloxy-substituted sesquiterpene from the marine fungus *Aspergillus insulicola*. *J Nat Prod*. 1997;60(8):811–813. doi:10.1021/np970142f
65. Rahbæk L, Christophersen C. Three new alkaloids, securamines E-G, from the marine bryozoan *Securiflustra securifrons*. *J Nat Prod*. 1997;60(2):175–177. doi:10.1021/np960602p
66. Fang W, Lin X, Zhou X, et al. Cytotoxic and antiviral nitrobenzoyl sesquiterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17. *Medchemcomm*. 2014;5(6):701–705. doi:10.1039/c3md00371j
67. Belofsky GN, Jensen PR, Renner MK, Fenical W. New Cytotoxic Sesquiterpenoid Nitrobenzoyl Esters from a Marine Isolate of the Fungus *Aspergillus versicolor* Gilbert. 1998;54:1715–1724.
68. Wang Q, Yang Y Bin, Yang XQ, et al. Lovastatin analogues and other metabolites from soil-derived *Aspergillus terreus* YIM PH30711. *Phytochemistry*. 2018;145:146–152. doi:10.1016/j.phytochem.2017.11.006
69. Rivera-Chávez J, Figueroa M, González MDC, Glenn AE, Mata R. α -Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* Associated with *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod*. 2015;78(4):730–735. doi:10.1021/np500897y
70. Yamamoto K, Nakayama A, Yamamoto Y, Tabata S. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 2004;271(16):3414–3420. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04276.x
71. Oki T, Matsui T, Osajima Y. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J Agric Food Chem*. 1999;47(2):550–553. doi:10.1021/jf980788t