



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Especies selectas del género *Malbranchea* como una fuente de inhibidores de enzimas alfa-glucosidasas y proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B)”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Daniela Rebollar Ramos

Tutora:

Dra. Rachel Mata Essayag
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, octubre 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Francisco Hernández Luis

Vocal: Dr. Héctor García Ortega

Vocal: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Vocal: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Secretario: Dr. José Alberto Rivera Chávez

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia.

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

CONGRESOS

2022. **Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy.** Charleston, Carolina del Norte, Estados Unidos de América. Modalidad Cartel.

2022. **17a Reunión Anual de Investigación en Productos Naturales.** Monterrey, Nuevo León, México. Modalidad Cartel.

2018. **57th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America.** San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. Modalidad Cartel.

PUBLICACIONES

- Rebollar-Ramos, D., Ovalle-Magallanes, B., Palacios-Espinosa, J.F., Macías-Rubalcava, M.L., Raja, H.A., González-Andrade, M., Mata, R. (2021). α -glucosidase and PTP-1B inhibitors from *Malbranchea dendritica*. *ACS Omega*, 6, 35, 22969–22981.
- Anaya-Eugenio, G.D., Rebollar-Ramos, D., González, M.D.C., Raja, H., Mata, R., Carcache De Blanco, E.J. (2019). Apoptotic activity of xanthoquinodin JBIR-99, from *Parengyodontium album* MEXU 30054, in PC-3 human prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 311, 108798.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por el apoyo brindado para continuar con mis estudios de posgrado, con la finalidad de tener una mejor preparación académica y profesional.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT) y DGAPA-UNAM por el financiamiento requerido para realizar la presente investigación a través de los proyectos CONACyT-CY011226 y DGAPA PAPIIT IN217320. Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU 768720).

A la Dra. Rachel Mata Essayag por permitirme formar parte de su equipo de trabajo durante tanto tiempo, por sus valiosas enseñanzas y por contribuir a mi formación como investigadora, mi más grande respeto, cariño y admiración. Muchas gracias por todo.

A las Dras. Isabel Rivero Cruz y Araceli Pérez Vásquez por el apoyo técnico proporcionado para el desarrollo de este proyecto, así como sus consejos, paciencia y amistad durante estos años. Sin ustedes el laboratorio no podría funcionar. Muchas gracias.

A la Dra. Martha L. Macías Rubalcava y al Dr. Francisco Hernández Luis, miembros del Comité Tutor, por sus valiosas observaciones, sugerencias y comentarios a lo largo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes, por su apoyo y asesoría en los experimentos farmacológicos, así como su paciencia y sobre todo por compartir su conocimiento conmigo. Muchas gracias.

Al Dr. Francisco Palacios Espinosa de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, por su apoyo en la realización de algunos experimentos *in vivo*. Al la M.V.Z. Lucía Macías Rosales de la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química, por su apoyo en los experimentos farmacológicos.

Al Dr. Martín González Andrade por su apoyo en los estudios *in silico* de dinámica molecular y por proporcionar la enzima recombinante PTP-1B.

Al Dr. Huzefa A. Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro por su valiosa contribución a la identificación filogenética de los hongos trabajados en el presente proyecto.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química. A la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo, a las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux por el registro de los espectros de RMN.

A los miembros del jurado por sus observaciones y comentarios, los cuales permitieron enriquecer el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124, a los que están y a los que ya se titularon, gracias por sus enseñanzas, consejos, risas y cafecitos. Trabajar en el 124 no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

DEDICATORIAS

A mis padres, Daniel y Ana Laura, por guiarme, apoyarme en todo momento y por enseñarme a creer en mí y perseguir mis sueños. No sería nadie sin ustedes.

A mis hermanas, Diana y Ceci, por su apoyo incondicional, por sus consejos, por las lágrimas y las risas. Muchas gracias por siempre estar conmigo.

A todas las personas que de alguna u otra forma me apoyaron en este largo camino académico, sus palabras de aliento, su motivación o simplemente su presencia me impulsaron a seguir adelante.

*“Tras el vivir y el soñar,
está lo que más importa:
el despertar.”*

-Antonio Machado

Contenido

Lista de Figuras	IV
Lista de Cuadros.....	VI
Lista de Esquemas	VII
Lista de Tablas.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
I. Antecedentes	5
1. Homeostasis de la glucosa	5
2. Diabetes mellitus	8
Diagnóstico	9
Complicaciones	10
Panorama mundial de la diabetes.....	12
Tratamiento	12
3. Inhibidores de α -glucosidasas	19
Generalidades de las enzimas glicósido-hidrolasas.....	19
α -glucosidasas presentes en el intestino humano	20
Inhibidores de α -glucosidasas	21
4. Generalidades sobre la enzima PTP-1B.....	23
Inhibidores de PTP-1B.....	26
5. Antecedentes del género <i>Malbranchea</i>	28
<i>Malbranchea filamentosa</i>	30
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	32
<i>Malbranchea aurantiaca</i>	34
<i>Malbranchea graminicola</i>	35
<i>Malbranchea flavorosea</i>	36
<i>Malbranchea circinata</i>	37
<i>Malbranchea albolutea</i>	38
6. Antecedentes de la especie <i>Parengyodontium album</i>	39
II. Justificación	44
III. Hipótesis	46
IV. Objetivos	46
Objetivo General	46
Objetivos Particulares.....	46

V. Metodología Experimental.....	48
1. Procedimientos cromatográficos generales	48
2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	49
3. Obtención del material fúngico	50
3.1 ACA-14	50
3.2 <i>Malbranchea dendritica</i> , <i>M. flocciformis</i> y <i>M. arcuata</i>	50
3.3 Identificación taxonómica de los hongos objeto de estudio	50
4. Condiciones de cultivo de los hongos, obtención y fraccionamiento de los extractos orgánicos	51
4.1 <i>Parengyodontium album</i>	51
4.2 <i>Malbranchea dendritica</i>	52
4.3 <i>Malbranchea flocciformis</i>	55
4.4 <i>Malbranchea arcuata</i>	57
5. Síntesis de los compuestos.....	59
5.1 Reducción del compuesto gymnoascólido A (46).....	59
5.2 Síntesis del compuesto 105	60
5.3 Reducción del trímero de ácido antranílico (105).....	60
6. Evaluaciones <i>in vitro</i> de los compuestos y/o extractos.....	61
6.1 Evaluación enzimática de las α -glucosidasas	61
6.1.1 Estudios de cinética enzimática	62
6.2 Evaluación enzimática sobre la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP-1B)	62
6.2.1 Estudios de cinética enzimática	63
6.3 Ensayo en células INS-1E	63
6.3.1 Secreción de insulina en células INS-1E.....	63
7. Evaluaciones <i>in vivo</i>	64
7.1 Protocolo de inducción de hiperglucemia en los sujetos de experimentación	64
7.2 Prueba de tolerancia a la sacarosa oral (PTSO).....	64
7.3 Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO).....	65
7.4 Prueba de efecto hipoglucemiante	65
7.5 Análisis estadístico	66
8. Estudios <i>in silico</i>	66
8.1 Cálculos de diámetro circular electrónico	66
8.2 Herramientas bioinformáticas para la determinación de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química farmacéutica y toxicológicas de los compuestos bioactivos.....	66
8.3 Estudios de acoplamiento molecular	67
8.4 Estudios de dinámica molecular	68

VI.	Resultados y Discusión	70
	<i>Parengyodontium album</i>	70
	Estudio químico del hongo.....	70
	Identidad taxonómica del hongo	73
	<i>Malbranchea dendritica</i>	74
	Estudio químico del hongo.....	74
	Evaluación de metabolitos aislados en la enzima α -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i>	83
	Evaluación <i>in vivo</i> del compuesto 46	85
	Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química-medicinal y toxicológicas de los compuestos 46 , 167a y 167b	85
	Derivado dihidrogenado del gymnoascólido A (167).....	87
	Evaluación de la mezcla enantiomérica 167a/167b frente a la enzima α -glucosidasa de levadura	90
	Estudios de acoplamiento molecular de los compuestos bioactivos con las enzimas α -glucosidasas...91	
	Evaluación enzimática de los metabolitos en la enzima PTP-1B	94
	Estudios de acoplamiento y dinámica molecular del compuesto 121 en PTP-1B.....	95
	Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química-medicinal y toxicológicas del compuesto 121	96
	<i>Malbranchea flocciformis</i>	98
	Estudio químico del hongo.....	98
	Evaluación biológica del compuesto 105	102
	Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química-medicinal y toxicológicas del compuesto 105	104
	Trímero de ácido antranílico reducido (168)	106
	Evaluación de los compuestos 105 y 168 sobre la secreción de insulina	109
	<i>Malbranchea arcuata</i>	111
	Citosina (166)	111
	RM11PEP	112
VII.	Conclusiones	114
VIII.	Perspectivas	115
IX.	Referencias.....	116
X.	Apéndice.....	129
XI.	Publicaciones	176

Lista de Figuras

Figura 1. Representación esquemática del transporte de la glucosa en los enterocitos. Imagen creada en BioRender.com	5
Figura 2. Esquema de liberación de insulina en las células β -pancreáticas. Imagen creada en BioRender.com	6
Figura 3. Esquema de la acción de la insulina en tejidos blanco y traslocación del transportador GLUT4. Imagen creada en BioRender.com.....	7
Figura 4. Diferencias entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. Imagen creada con BioRender.com.....	8
Figura 5. Complicaciones crónicas de la diabetes. Imagen modificada de https://www.umassmed.edu/dcoe/diabetes-education/complications/	11
Figura 6. Mapa mundial con el número estimado de personas con diabetes en 2021. Modificado del Atlas de la Diabetes 2021.....	12
Figura 7. Sitios de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de la DT2. Imagen creada con BioRender.com	13
Figura 8. Mecanismo de acción de los inhibidores de α -glucosidasas.....	21
Figura 9. Acción de la enzima PTP-1B en las vías de señalización de la insulina y la leptina. Modificado de Singh <i>et al.</i> , 2022.....	25
Figura 10. Estructuras de rayos X de las enzimas TCPTP y PTP-1B. En la imagen central se observa el traslape de las enzimas PTP-1B en rosa y TCPTP en rojo. Imagen tomada de Johnson <i>et al.</i> , 2002...	26
Figura 11. <i>Malbranchea pulchella</i> , encontrada en una cartulina húmeda, los dibujos en tinta pertenecen a A. Malbranche y los dibujos en lápiz a P. A. Saccardo. Imagen tomada de Rodríguez-Andrade <i>et al.</i> , 2021.	29
Figura 12. Especies fúngicas objeto de estudio. A) ACA 14; B) <i>M. dendritica</i> (ATCC 34527), C) <i>M. flocciformis</i> (ATCC 34530), y D) <i>M. arcuata</i> (ATCC 34523).....	50
Figura 13. Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción ELMD _{F2} . Condiciones de análisis: Columna XBridge Shield RP C18; Fase móvil: gradiente de elución MeCN (A)-H ₂ O (B; 0.1% ácido fórmico) 30:70 a 85% A en 20 minutos; Flujo: 17.06 mL/min; Detector UV/visible, λ = 254 y 365 nm.	53
Figura 14. Cromatograma obtenido del fraccionamiento en columna flash del extracto orgánico desgrasado de <i>M. flocciformis</i>	56
Figura 15. Cromatograma obtenido del fraccionamiento en columna flash del extracto orgánico desgrasado de <i>M. arcuata</i>	58
Figura 16. Estructura ORTEP generada por el análisis de difracción de rayos X del compuesto 154	72
Figura 17. Ruta biosintética propuesta para la síntesis de los compuestos JBIR-99 (154) y JBIR-97 (152). Tomado de Wu <i>et al.</i> , 2016.	72
Figura 18. Árbol filogenético obtenido donde se muestra la identidad de ACA-14 como <i>Parengyodontium album</i>	73
Figura 19. Representación ORTEP obtenida por difracción de rayos X del compuesto 164	82
Figura 20. Curva C-R del compuesto 46 sobre las enzimas α -glucosidasas de <i>S. cerevisiae</i>	83
Figura 21. Gráficos de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de las curvas de saturación por sustrato de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas a diferentes concentraciones del inhibidor 46	84
Figura 22. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones. VEH: vehículo; ACA: acarbosa. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01 y *** p < 0.001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.	85
Figura 23. Radar de biodisponibilidad de los compuestos 46 , 167a y 167b obtenidos con el programa SwissADME.....	86
Figura 24. Gráfico tipo BOILED-EGG de los compuestos 46 , 167a y 167b , donde se muestra la permeabilidad en barrera hematoencefálica (BBB) indicada en color amarillo, la permeabilidad	

intestinal (HIA) indicada en color blanco y si el compuesto es sustrato a la glicoproteína P (PGP+/PGP-).	87
Figura 25. A) Cromatograma que muestra el pico correspondiente al sustrato de la reacción (46) con un $t_R = 25$ min. B) Cromatograma donde se muestran los picos correspondientes al producto reducido ($t_R = 23.2$ min) y al sustrato de la reacción ($t_R = 25$ min). C) Espectro de masas del compuesto 46 con un ión molecular en m/z 250. D) Espectro de masas del producto reducido (167), donde se puede ver el ión molecular en m/z 252, indicando la adición de dos unidades de masa al peso molecular del sustrato.	88
Figura 26. Espectros de dicroísmo circular electrónico experimental para la mezcla 167a/167b (línea verde punteada) y calculados para los enantiómeros <i>3S,4S</i> (rojo) y <i>3R,4R</i> (azul) en metanol.	90
Figura 27. Curva C-R del compuesto 167a/167b sobre las enzimas α -glucosidasas de <i>S. cerevisiae</i>	90
Figura 28. Gráficos de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de las curvas de saturación por sustrato de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas a diferentes concentraciones del inhibidor 167a/167b	91
Figura 29. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima α -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> (PDB:3A4A) representada en caricatura azul claro, con los compuestos 46 (azul rey), 167a , <i>3S,4S</i> (amarillo) y 167b , <i>3R,4R</i> (magenta). La acarbosa está representada en color verde en el sitio catalítico de la enzima. Las imágenes fueron generadas con PyMOL.	92
Figura 30. Modelo estructural de los sitios de unión de la subunidad C-terminal de la maltasa glucoamilasa de humano (PDB:3TOP) representada en caricatura verde claro, con los compuestos 46 (azul rey), 167a (amarillo) y 167b (magenta). La acarbosa está representada en color rojo en el sitio catalítico de la enzima. Las imágenes fueron generadas con PyMOL.	93
Figura 31. Curva C-R del compuesto 121 sobre la enzima PTP-1B.	94
Figura 32. Gráficos de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de las curvas de saturación por sustrato de la inhibición de la enzima PTP-1B a diferentes concentraciones del inhibidor 121	94
Figura 33. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima PTP-1B (PDB:1T49) representada en caricatura amarilla, con el compuesto 121 (verde agua). El ácido ursólico, control positivo, está representado en color morado en el sitio alostérico de la enzima. Las imágenes fueron generadas con PyMOL.	95
Figura 34. Modelos estructurales de la dinámica molecular en el sitio alostérico de la enzima PTP-1B con el compuesto 121 y el control positivo ácido ursólico (AU).	96
Figura 35. Gráfico tipo BOILED-EGG del compuesto 121 , donde se muestra la permeabilidad en barrera hematoencefálica (BBB) indicada en color amarillo, la permeabilidad intestinal (HIA) indicada en color blanco y si el compuesto es sustrato a la glicoproteína P (PGP+/PGP-).	97
Figura 36. Comparación de los espectros de ^1H -RMN del producto natural adquirido en CDCl_3 y el producto de síntesis adquirido en CD_3OD	100
Figura 37. Comparación de los espectros de ^{13}C -RMN del producto natural adquirido en CDCl_3 y el producto de síntesis adquirido en CD_3OD	100
Figura 38. Estructura ORTEP generada por el análisis de difracción de rayos X del compuesto 105	101
Figura 39. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones del producto 105 . VEH: vehículo; ACA: acarbosa. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05 y *** p < 0.001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.	102
Figura 40. Curvas de tolerancia a la glucosa del producto 105 en A) ratones normoglucémicos y B) ratones hiperglucémicos. VEH: vehículo; MET: metformina. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p < 0.0001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.	103

Figura 41. Curvas de efecto hipoglucemiante del producto 105 en A) ratones normoglucémicos y B) ratones hiperglucémicos. VEH: vehículo; GLI: glibenclamida. Cada punto representa la media ± EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p<0.0001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.	104
Figura 42. Radar de biodisponibilidad de los compuestos 105 y 168 obtenidos con el programa SwissADME.....	105
Figura 43. Gráfico tipo BOILED-EGG de los compuestos 105 y 168 , donde se muestra la permeabilidad en barrera hematoencefálica (BBB) indicada en color amarillo, la permeabilidad intestinal (HIA) indicada en color blanco y si el compuesto es sustrato a la glicoproteína P (PGP+/PGP-).	105
Figura 44. Espectro de ¹ H-RMN del compuesto 168 en CD ₃ OD a 400 MHz.	107
Figura 45. Espectro de ¹³ C-RMN del compuesto 168 en CD ₃ OD a 100 MHz.	107
Figura 46. Curva C-R del compuesto 168 en la enzima PTP-1B.	108
Figura 47. Curvas de tolerancia a la glucosa en A) ratones normoglucémicos y B) ratones hiperglucémicos para el compuesto 168 . VEH: vehículo; MET: metformina. Cada punto representa la media ± EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p<0.0001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.	108
Figura 48. Efecto del compuesto 105 en la secreción de insulina en células de insulinoma de rata. Cada barra representa la media ± EEM (n=4). *p < 0.05 representa diferencia significativa en una ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey para comparación múltiple respecto al vehículo.....	109
Figura 49. Efecto del compuesto 168 en la secreción de insulina en células de insulinoma de rata. Cada barra representa la media ± EEM (n=4). **p < 0.01 representa diferencia significativa en una ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey para comparación múltiple respecto al vehículo.....	110
Figura 50. <i>Malbranchea arcuata</i> con un halo de inhibición frente a otro microorganismo fúngico.....	111
Figura 51. Espectro de ¹ H-RMN del compuesto RM11PEP en DMSO- δ_6 (700 MHz).....	112
Figura 52. Espectro de ¹³ C-RMN del compuesto RM11PEP en DMSO- δ_6 (175 MHz).....	113

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico de diabetes (IDF, 2021).	10
Cuadro 2. Fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la DT2.	17
Cuadro 3. Inhibidores de α -glucosidasas y los productos naturales de los cuales se derivaron.	22
Cuadro 4. Inhibidores de PTP-1B que llegaron a evaluarse en estudios clínicos.	27
Cuadro 5. Antrasteroides aislados de <i>M. filamentosa</i>	30
Cuadro 6. Derivados C6C3-C6C2 de <i>M. filamentosa</i>	31
Cuadro 7. Terpenoides de <i>M. filamentosa</i>	32
Cuadro 8. Otros metabolitos aislados de <i>M. filamentosa</i>	32
Cuadro 9. Malbranpirroles aislados de <i>M. cinnamomea</i>	33
Cuadro 10. Benzoquinonas e hidroquinonas aisladas de <i>M. cinnamomea</i>	33
Cuadro 11. Metabolitos varios de <i>M. cinnamomea</i>	34
Cuadro 12. Malbranqueamidas aisladas de <i>M. aurantiaca</i>	35
Cuadro 13. Otros metabolitos aislados de <i>M. aurantiaca</i>	35
Cuadro 14. Indol-alcaloides aislados de <i>M. graminicola</i>	36
Cuadro 15. Policétidos de <i>M. flavorosea</i>	36
Cuadro 16. Otros metabolitos de <i>M. flavorosea</i>	37
Cuadro 17. Policétidos aislados de <i>M. circinata</i>	38
Cuadro 18. Derivados de ácido antranílico y alcaloides aislados de <i>M. circinata</i>	38
Cuadro 19. Metabolitos tipo ardeeminas aisladas de <i>M. albolutea</i>	39

Cuadro 20. Otros metabolitos de <i>M. albolutea</i>	39
Cuadro 21. Xantonas aisladas de <i>P. album</i>	40
Cuadro 22. Derivados fenólicos obtenidos de <i>P. album</i>	41
Cuadro 23. Antraquinonas aisladas de <i>P. album</i>	42
Cuadro 24. Dímeros xantona-antraquinona obtenidos de <i>P. album</i>	43
Cuadro 25. Otros metabolitos producidos por <i>P. album</i>	43
Cuadro 26. Estructura química del compuesto JBIR-99 (154).....	70
Cuadro 27. Estructura química del compuesto JBIR-97 (152).....	72
Cuadro 28. Metabolitos secundarios obtenidos del extracto líquido de <i>M. dendritica</i>	74
Cuadro 29. Metabolitos secundarios obtenidos del extracto sólido de <i>M. dendritica</i>	79
Cuadro 30. Compuesto 46 y sus derivados dihidrogenados 167a y 167b	88
Cuadro 31. Metabolitos aislados del hongo <i>Malbranchea flocciformis</i>	98
Cuadro 32. Compuesto 105 y su derivado reducido 168	106
Cuadro 33. Estructura química de la citosina (166).....	111

Lista de Esquemas

Esquema 1. Mecanismo de hidrólisis de las glicósido-hidrolasas presentes en el intestino humano. A) α -glucosidasas con retención de la configuración; B) β -glucosidasas con retención de la configuración y C) α -glucosidasas con inversión de la configuración. Tomado de Kötzer <i>et al.</i> , 2014.....	20
Esquema 2. Mecanismo de acción de la PTP-1B. Modificado de Sharma <i>et al.</i> , 2020.....	24
Esquema 3. Resumen del fraccionamiento del extracto orgánico de <i>P. album</i>	52
Esquema 4. Fraccionamiento del extracto ELMD.....	53
Esquema 5. Fraccionamiento del extracto ESMD.....	54
Esquema 6. Fraccionamiento del extracto EOMF.....	57
Esquema 7. Fraccionamiento del extracto EOMA.....	58
Esquema 8. Síntesis del compuesto 167	59
Esquema 9. Síntesis del compuesto 105	60
Esquema 10. Reducción de la imina del compuesto 105	61

Lista de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de moléculas con nuevos blancos moleculares para el tratamiento de la DT2.....	18
Tabla 2. Ejemplos selectos de inhibidores de α -glucosidasas de origen fúngico.....	23
Tabla 3. Ejemplos selectos de inhibidores de PTP-1B a partir de fuentes naturales.....	27
Tabla 4. Gradiente de polaridad utilizado en el fraccionamiento primario del extracto de <i>M. flocciformis</i>	55
Tabla 5. Gradiente de polaridad empleado para el fraccionamiento primario del extracto de <i>M. arcuata</i>	57
Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN para los compuestos 154 y 152 en CDCl_3 (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz).....	71
Tabla 7. Actividad del extracto CPD frente a las enzimas α -glucosidasa y PTP-1B.....	74
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN para el compuesto 46 en CDCl_3 (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).....	75
Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 120 en CDCl_3 (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).....	76
Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 121 en $\text{DMSO}-d_6$ (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).....	77
Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 124 en CDCl_3 (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).....	78
Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 162 en CDCl_3 (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz).....	79

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 57 en CDCl ₃ (¹ H a 700 MHz y ¹³ C a 175 MHz). .80	
Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 163 en CD ₃ OD (¹ H a 700 MHz y ¹³ C a 175 MHz).	81
Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 55 en CD ₃ OD (¹ H a 700 MHz y ¹³ C a 175 MHz).81	
Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 165 en CD ₃ OD (¹ H a 700 MHz y ¹³ C a 175 MHz).	82
Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 167a/167b en CDCl ₃ (¹ H a 400 MHz y ¹³ C a 100 MHz).....	89
Tabla 18. Análisis de resultados de docking para los compuestos 46, 167a y 167b en la enzima isomaltasa (PDB: 3A4A).	92
Tabla 19. Análisis de resultados de docking para los compuestos 46, 167a y 167b en la enzima CtMGAM (PDB: 3TOP).	93
Tabla 20. Análisis de resultados de acoplamiento y dinámica molecular de los compuestos 121 y ácido ursólico en la enzima PTP-1B (PDB: 1T49).	95
Tabla 21. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 105 en CD ₃ OD (¹ H a 400 MHz y ¹³ C a 100 MHz).	99
Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 106 en CD ₃ OD (¹ H a 400 MHz y ¹³ C a 100 MHz).	101
Tabla 23. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto 166 en DMSO- δ_6 (¹ H a 400 MHz y ¹³ C a 100 MHz).....	112

Lista de abreviaturas

A.F.	Ácido fórmico
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATCC	American Type and Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina
c	Concentración
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
C-R	Concentración-Respuesta
CtMGAM	Dominio carboxi-terminal de la maltasa-glucoamilasa
CtSI	Dominio carboxi-terminal de la sacarasa-isomaltasa
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de dobles de dobles
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
DG	Diabetes Gestacional
DM	Dinámica Molecular
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
dt	Señal doble de triples
DT1	Diabetes Tipo 1
DT2	Diabetes Tipo 2
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EM	Espectrometría de masas
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico

GLP-1	Péptido similar al glucagon tipo 1
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
Hex	Hexano
His	Histidina
Hz	Hertz
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
Ile	Isoleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Leu	Leucina
Lys	Lisina
<i>m</i>	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MHz	Megahertz
NtMGAM	Dominio amino-terminal de la maltasa-glucoamilasa
NtSI	Dominio amino-terminal de la sacarasa-isomaltasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDB	Protein Data Bank
Phe	Fenilalanina
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato
<i>p</i> -NPG	<i>para</i> -nitrofenilglucopiranosido
PPAR- γ	Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma
Pro	Prolina
PTP-1B	Proteína Tirosina Fosfatasa 1B
<i>q</i>	Señal cuádruple
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	Señal simple
<i>s.a.</i>	Señal ancha
SGLT2	Cotransportador de sodio y glucosa tipo 2
SUR1	Receptor de sulfonilurea 1
<i>t</i>	Señal triple
<i>td</i>	Señal triple de dobles
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
δ_C	Desplazamiento químico de carbono
ΔG	Energía libre de Gibbs
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe el estudio químico y biológico de cuatro especies fúngicas: *Parengyodontium album* (ACA-14), *Malbranchea dendritica*, *M. flocciformis* y *M. arcuata*.

Los microorganismos fúngicos se obtuvieron de dos diferentes fuentes: *P. album* (ACA-14) se obtuvo de una muestra de arena en el estado de Guerrero, México, mientras que *Malbranchea dendritica*, *M. flocciformis* y *M. arcuata* se obtuvieron de la American Type Culture Collection, con los números de catálogo 34527, 34530 y 34523, respectivamente.

Los microorganismos fúngicos se cultivaron en diferentes medios y se aislaron diversos metabolitos de las 4 especies estudiadas. De *P. album* se obtuvieron las xantonas-antraquinonas JBIR-99 (**154**) y JBIR-97 (**152**); de *M. dendritica* los metabolitos gymnoascólido A (**46**), adenosina (**55**), eritroglaucina (**57**), sydowinina A (**120**), sydowinina B (**121**), AGI-B4 (**124**), orcinol (**162**), desoxiadenosina (**163**), timidina (**164**) y uridina (**165**); de *M. flocciformis* se aislaron los compuestos **46**, **55**, un trímero de ácido antranílico (**105**) y un derivado hidroxilado del trímero de ácido antranílico (**106**); finalmente de *M. arcuata* se aislaron la citosina (**166**) y un péptido no identificado (**RM11PEP**).

El microorganismo ACA-14 se identificó *a priori* como una especie de *Malbranchea*, sin embargo, su estudio filogenético mostró su identidad como *Parengyodontium album*, por lo que su estudio químico fue detenido, no obstante, se analizó su potencial biológico entrándose que el compuesto JBIR-99 (**154**) es un agente citotóxico frente a células cancerígenas de próstata. Su estructura se demostró inequívocamente por un análisis de difracción de rayos-X.

Del hongo *M. dendritica* se obtuvieron dos compuestos bioactivos: el gymnoascólido A (**46**), un inhibidor de las α -glucosidasas *in vitro* e *in vivo*; y la sydowinina B (**121**), inhibidor de la enzima PTP-1B. Ambos compuestos fueron estudiados con herramientas de libre acceso (SwisADME y Osiris Property Explorer) para predecir *in silico* su similitud a fármacos. Como resultado de este análisis, se propuso la reducción del doble enlace del compuesto **46**, y así mejorar de sus características de biodisponibilidad. La reducción catalítica con Pd/C de **46** generó una mezcla enantiomérica de los derivados reducidos, **167a** (3*S*,4*S*) y **167b** (3*R*,4*R*). Estos derivados también presentaron actividad inhibitoria *in vitro* frente a las enzimas α -glucosidasas. Los estudios de acoplamiento molecular con la subunidad C-terminal de la enzima humana maltasa-glucoamilasa permitieron predecir que **46** se une a un sitio diferente que los derivados dihidrogenados; pero ninguno de los tres compuestos se une al sitio catalítico, como la acarbosa.

Sin embargo, la energía de unión de del isómero **167a** (3*S*,4*S*) por la enzima fue mejor que la de la acarbosa (-7.1 vs -6.3 kcal/mol, respectivamente).

Del hongo *M. flocciformis* se obtuvo el compuesto **105** que mostró actividad como inhibidor de la enzima PTP-1B, también se utilizaron las herramientas SwisADME y Osiris Property Explorer y se propuso la reducción de la imina presente en **105**, lo que llevó a la obtención del derivado dihidrogenado **168**, que también mostró actividad como inhibidor de la PTP-1B. Los compuestos **105** y **168** demostraron un efecto significativo *in vivo* en pruebas de tolerancia oral a la glucosa e hipoglucemiante, disminuyendo los niveles de glucosa posprandial y en condiciones de ayuno controlado.

Finalmente se demostró el potencial antifúngico de *M. arcuata*, de cuyo medio de cultivo se aisló un péptido minoritario que se encuentra en proceso de caracterización.

ABSTRACT

This work describes the chemical and biological study of four fungal species: *Parengyodontium album* (ACA-14), *Malbranchea dendritica*, *M. flocciformis* and *M. arcuata*.

The fungi were obtained from two different sources: *P. album* (ACA-14) was obtained from a sand sample in Guerrero, Mexico. At the same time, *M. dendritica*, *M. flocciformis* and *M. arcuata* were purchased from the American Type Culture Collection, with the catalog numbers ATCC 34527, 34530 y 34523, respectively.

The fungal microorganisms were cultivated in different media and some metabolites were isolated. From *P. album*, the xanthono-anthraquinones JBIR-99 (**154**) and JBIR-97 (**152**) were obtained; from *M. dendritica*, gymnoascolide A (**46**), adenosine (**55**), erythroglaucon (**57**), sydowinins A and B (**120**, **121**), AGI-B4 (**124**), orcinol (**162**), deoxyadenosine (**163**), thymidine (**164**) and uridine (**165**) were characterized. Compounds **46**, **55**, and two anthranilic acid peptides (**105** and **106**) were isolated from *M. flocciformis*. Finally, cytosine (**166**) and an unidentified peptide (**RM11PEP**) were isolated from *M. arcuata*.

The microorganism ACA-14 was identified initially as a *Malbranchea* species. However, a phylogenetic study showed its identity as *Parengyodontium album*; compound JBIR-99 (**154**) showed potential as an antitumoral agent against prostate cancer cells. The chemical structure of **154** was unequivocally demonstrated by X-ray diffraction analysis.

From *M. dendritica*, two bioactive compounds were isolated: gymnoascolide A (**46**) which showed *in vitro* and *in vivo* activity against α -glucosidases; and sydowinin B (**121**) with *in vitro* PTP-1B inhibitory activity. Both compounds were analyzed with web free tools, SwissADME and Osiris Property Explorer, to predict *in silico* their drug-likeness. As a result of this analysis, the reduction of the double bond of compound **46** was proposed to improve its bioavailability characteristics. Catalytic reduction with Pd/C of **46** generated an enantiomeric mixture of the reduced derivatives, **167a** (3S,4S) and **167b** (3R,4R). These derivatives also showed *in vitro* inhibitory activity against α -glucosidase enzymes. Molecular docking studies with the C-terminal subunit of the human maltase-glucoamylase enzyme predicted that **46** binds to a different site than dihydrogenated derivatives. However, none of the three compounds binds to the catalytic site like acarbose. However, the binding energy to the enzyme of the **167a** (3S,4S) isomer was better than that of acarbose (-7.1 vs. -6.3 kcal/mol, respectively).

From *M. flocciformis*, compound **105** was obtained, and it showed activity as a PTP-1B inhibitor. SwissADME and Osiris Property Explorer tools were also used, and the reduction of the

imine present in **105** was proposed; the dehydrogenated derivative **168** also showed activity as a PTP-1B inhibitor. Compounds **105** and **168** demonstrated a significant effect *in vivo* in hypoglycemic and oral glucose tolerance tests, lowering postprandial glucose levels and under controlled fasting conditions.

Finally, the antifungal potential of *M. arcuata* was demonstrated and a minor peptide, which is in characterization process, was isolated.

I. Antecedentes

1. Homeostasis de la glucosa

El buen funcionamiento del cuerpo humano depende de un balance en los niveles de glucosa en sangre, el cual resulta de la acción de distintas hormonas y neuropéptidos liberados del cerebro, páncreas, músculo, hígado, intestino y tejido adiposo.

Tras la ingesta de alimentos, los carbohidratos son hidrolizados por la amilasa salival y por las α -glucosidasas en el tracto gastrointestinal, liberando glucosa y otros monosacáridos en el lumen del intestino delgado. En este sitio se lleva a cabo la absorción de la glucosa mediante el transportador Na^+ /Glucosa (SGLT1), el cual permite el ingreso de la glucosa a los enterocitos. Posteriormente la glucosa es liberada en sangre mediante difusión facilitada por el transportador GLUT2 como se muestra en la Figura 1 (Blanco & Blanco, 2017).

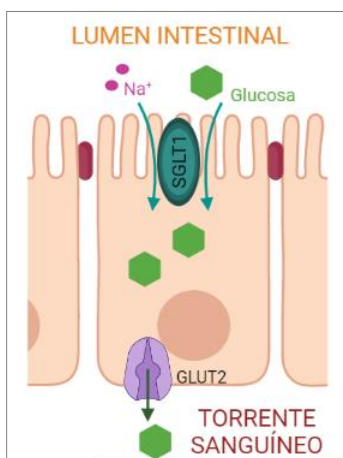


Figura 1. Representación esquemática del transporte de la glucosa en los enterocitos. Imagen creada en BioRender.com

Una vez que la glucosa está en torrente sanguíneo, es distribuida a diferentes órganos, entre ellos, las células β -pancreáticas, donde la glucosa ingresa a las células mediante el transportador GLUT-2. Una vez dentro de la célula, se lleva a cabo el metabolismo de la glucosa, que incluye la glucólisis, ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, en consecuencia, aumentan los niveles de ATP dentro de la célula. El incremento del cociente ATP/ADP provoca el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP. El cierre de estos canales produce la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El incremento en la concentración de calcio intracelular desencadena la fusión de los gránulos de insulina en la membrana, provocando su liberación en torrente sanguíneo (Blanco & Blanco, 2017; Röder *et al.*, 2016).

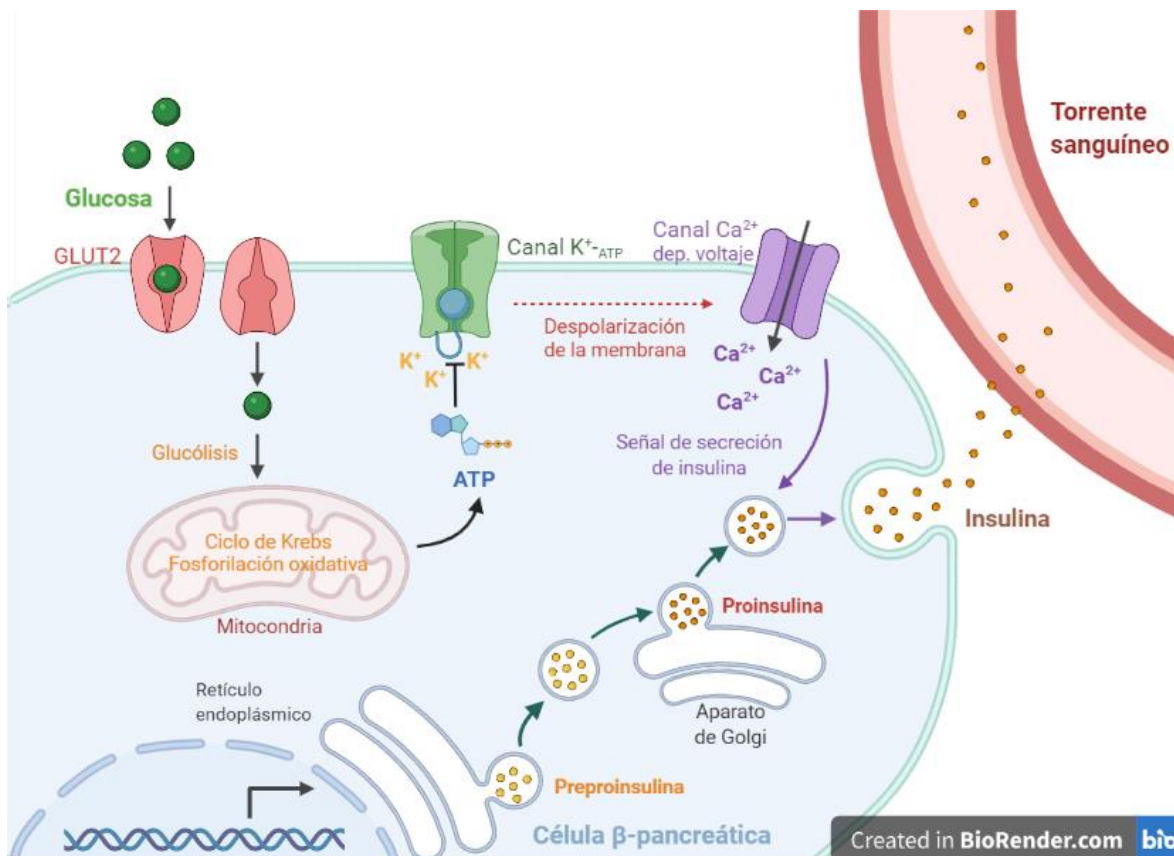


Figura 2. Esquema de liberación de insulina en las células β -pancreáticas. Imagen creada en BioRender.com

La insulina es una hormona compuesta por 51 aminoácidos (AA); se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, primero como preproinsulina, que tiene 109 AA. Posteriormente, el péptido inicial pierde 24 AA para formar la proinsulina que contiene tres cadenas, péptidos A-C. La proinsulina se pliega mediante puentes disulfuro, y pasa al aparato de Golgi donde se encapsula en vesículas. Dentro de las vesículas, mediante la acción de endopeptidasas, la proinsulina se convierte en insulina al perder el péptido C, y mantener las cadenas A y B unidas con dos puentes disulfuro (Nesterova *et al.*, 2020). La liberación de insulina a partir de las células β -pancreáticas se encuentra esquematizada en la Figura 2.

Una vez que se da la señal para la fusión de los gránulos de insulina para su liberación en torrente sanguíneo, la hormona llega a sus órganos blancos (músculo y tejido adiposo) donde se une a su receptor y permite la captura de glucosa en estos órganos. La captura de glucosa en estas células se da mediante la translocación del transportador de glucosa GLUT4, el cual es dependiente de insulina para trasladarse a la membrana de la célula y permitir así la entrada de glucosa.

Al unirse a su receptor, la insulina desencadena una cascada de señalización (Figura 3); el receptor es un tetrámero con dos subunidades alfa y dos subunidades beta. La insulina se une a las subunidades alfa en el exterior de la célula induciendo un cambio conformacional en las subunidades beta y llevan a la autofosforilación del receptor. Esta autofosforilación provoca el reclutamiento del sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés) el cual se fosforila e induce la activación de PI3K, que activa Akt, que a su vez induce la producción de las vesículas donde se encuentra el transportador GLUT4 se mueva hacia la membrana (Norton *et al.*, 2022).

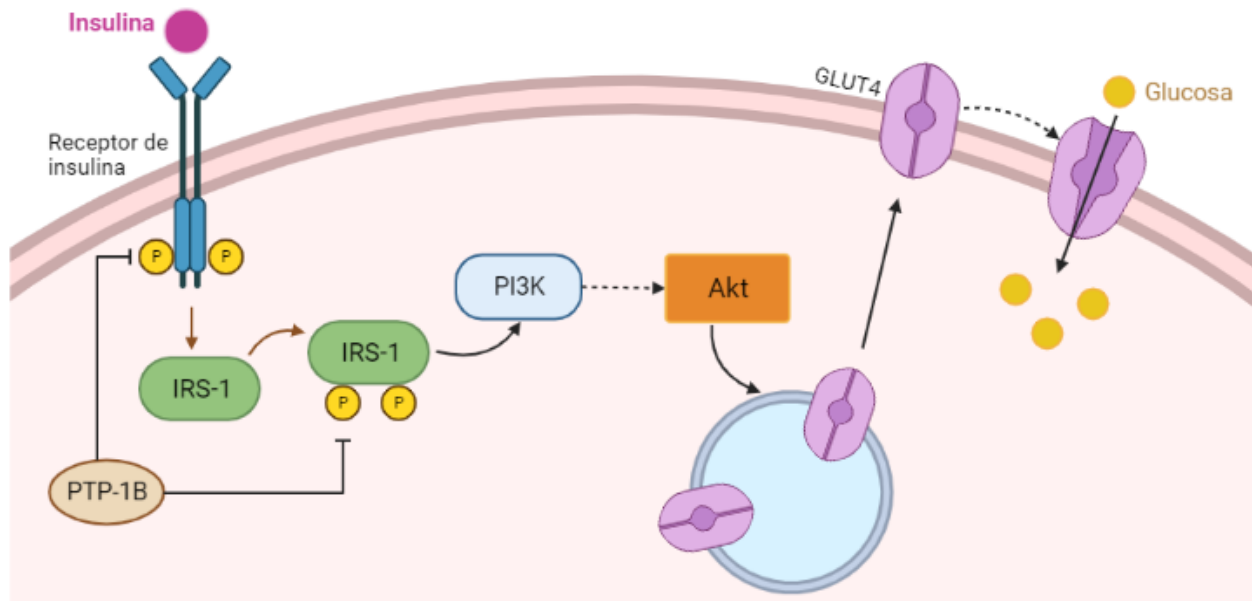


Figura 3. Esquema de la acción de la insulina en tejidos blancos y traslocación del transportador GLUT4. Imagen creada en BioRender.com

Una vez que el transportador GLUT4 está en la membrana permite la entrada de la glucosa a las células para su uso como fuente de energía. En músculo esquelético la glucosa se sigue metabolizando por fosforilación oxidativa para su uso como fuente de energía. Por otro lado, en tejido adiposo la insulina provoca la síntesis de triglicéridos y la supresión de la lipólisis (Röder *et al.*, 2016).

La insulina también es utilizada por el hígado, donde inhibe de primera instancia la glucogenólisis, mediante la acción de PI3K/Akt al activar la fosfatasa sintasa de glucógeno (PP1) que a su vez estimula la glucógeno sintasa, favoreciendo la síntesis de glucógeno en lugar de su degradación (glucogenólisis). Asimismo, la insulina inhibe la gluconeogénesis en hígado, favoreciendo el uso de la glucosa proveniente de la dieta (Norton *et al.*, 2022).

2. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una condición seria, crónica que ocurre cuando existen niveles elevados de glucosa en sangre debido a la disminución o ausencia en la producción de insulina o una falla en la acción de esta hormona (IDF, 2021).

La diabetes mellitus puede clasificarse en cuatro tipos principales: Diabetes mellitus tipo 1 (DT1), diabetes mellitus tipo 2 (DT2), diabetes gestacional (DG) y un cuarto grupo que engloba otras formas de diabetes (American Diabetes Association, 2020).

La DT1, anteriormente llamada diabetes juvenil o insulina-dependiente, es una enfermedad autoinmune, en la cual hay destrucción de las células β -pancreáticas por el propio organismo, por lo que no hay producción alguna de insulina (Figura 4). Este tipo de diabetes abarca del 5 al 10% de los casos totales de diabetes en el mundo, y es más común su detección en niños y jóvenes, aunque puede detectarse también en adultos. Sus síntomas principales son polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, cansancio extremo, etc. (IDF, 2021).

La DT2 es el tipo más común de diabetes, su prevalencia es del 90 al 95% de los casos totales de la enfermedad. La DT2 se da por dos razones principales: una disminución en la producción o utilización de insulina en forma eficiente en el organismo (Figura 4). La etiología de esta enfermedad es desconocida, en contraste con la DT1 con sus implicaciones autoinmunes, sin embargo, existen factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

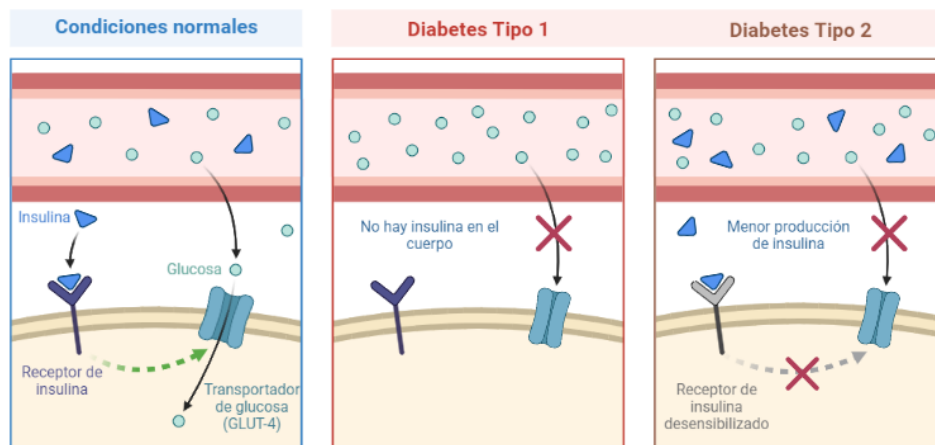


Figura 4. Diferencias entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. Imagen creada con BioRender.com

Los factores de riesgo de la DT2 se pueden dividir en modificables y no modificables. Dentro de los primeros está la mala alimentación, tener sobrepeso u obesidad, el sedentarismo, tabaquismo, alcoholismo, hipertensión arterial y estrés. Por otro lado, están los factores no modificables como antecedentes familiares; los subgrupos étnicos, por ejemplo: afroamericanos,

nativos americanos, hispanos/latinos y asiático-americanos; mujeres que presentaron diabetes gestacional o síndrome de ovario poliquístico (American Diabetes Association, 2020).

El tercer tipo de diabetes es la gestacional (DG), la cual se define como cualquier alteración en el metabolismo de los carbohidratos detectada por primera vez durante el embarazo y que se espera que desaparezca después del parto. Este tipo de diabetes se da en mujeres con alguna deficiencia en la secreción de insulina ya que la producción de hormonas en la placenta conlleva a una ligera resistencia a la insulina, que el cuerpo no puede compensar. La importancia de este tipo de diabetes radica en que las mujeres con este padecimiento tienen mayor riesgo de desarrollar DT2 y complicaciones durante el embarazo, incluyendo preeclampsia. Además, los bebés nacidos de mujeres con DG tienen también mayor riesgo de ser obesos y desarrollar DT2 (American Diabetes Association, 2020; IDF, 2021).





Finalmente, el cuarto grupo engloba tipos de diabetes que son causados por un agente conocido, por ejemplo: a) diabetes causada por enfermedades del páncreas (pancreatitis, cáncer de páncreas, etc.); b) diabetes inducida por fármacos (por ejemplo, estreptozotocina o aloxano); c) diabetes causada por desórdenes endocrinos, por ejemplo el síndrome de Cushing; d) diabetes autoinmune diferente a la diabetes tipo 1; e) diabetes relacionada con destrucción de células pancreáticas causada por infecciones virales; f) otros síndromes genéticos asociados a diabetes, por ejemplo síndrome de Down, síndrome Prader-Willi, y ataxia de Friederich, entre otros (IDF, 2021).

La falla en la producción de la insulina o la inhabilidad de los órganos blancos a responder provocan los altos niveles de glucosa en sangre, es por ello, que es el principal indicador de esta enfermedad.

Diagnóstico

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) y la Norma Oficial Mexicana (*NOM-015-SSA2-2010*), para establecer un diagnóstico de diabetes se debe presentar síntomas clásicos de hiperglucemia (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, entre otras), y al menos una de estas pruebas positivas: niveles de glucosa en sangre en ayuno ≥ 126 mg/dL (≥ 7 mmol/L); glucemia casual ≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L) o después de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO), la cual consiste en administrar una carga de glucosa (75 g) y medir los niveles de glucosa en sangre dos horas después. Si no se presentan los síntomas clásicos de hiperglucemia, entonces se deben presentar dos pruebas positivas.

No obstante, existe una condición llamada prediabetes, la cual se caracteriza por tener niveles elevados de glucosa en sangre, pero sin llegar al estado de diabetes. Cuando la glucosa en ayuno es ≥ 100 mg/dL y ≤ 125 mg/dL, se presenta GAA (Glucosa Anormal en Ayunas); por otro lado, cuando la glucemia en sangre está entre 140 mg/dL y 200 mg/dL después de una PTGO, entonces se presenta Intolerancia a Glucosa (ITG) (NOM-015-SSA2-2010). Por otro lado, un indicador adicional para el diagnóstico de un estado de prediabetes son los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) cuando se encuentran de 39-47 mmol/mol (5.7%-6.4%) (IDF, 2021).

Prueba	Diabetes	Glucosa Anormal en Ayunas (GAA)	Intolerancia a la Glucosa (ITG)
 Glucemia en ayunas	≥ 126 mg/dL (≥ 7.0 mmol/L)	100-125 mg/dL (6.1-6.9 mmol/L)	< 126 mg/dL (< 7.0 mmol/L)
 Glucemia 2 hrs PTGO	≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L)	< 140 mg/dL (< 7.8 mmol/L)	140-200 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L)
 HbA1c	$\geq 6.5\%$ (≥ 48 mmol/L)	5.7-6.4 % (39-47 mmol/L)	5.7-6.4 % (39-47 mmol/L)
 Glucemia casual	≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L)		

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico de diabetes (IDF, 2021).

La importancia de la prediabetes radica en que se tiene mayor riesgo de que estos estados alterados en el metabolismo de glucosa se conviertan en DT2 en los cinco años siguientes, además se tiene un aumento en el riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, la detección oportuna de estos estados es útil para que se puedan realizar acciones preventivas para evitar su progreso a DT2 (IDF, 2021).

Complicaciones

La falta en la producción o acción de la insulina en los pacientes diabéticos incrementa el riesgo de desarrollar complicaciones en su salud. Estas complicaciones pueden ser:

- Retinopatía diabética, la cual se desarrolla como un daño en los vasos sanguíneos de la retina y que puede llevar a la ceguera, también se tiene el mayor riesgo de presentar cataratas y glaucoma.

- b) Nefropatía diabética, los altos niveles de glucosa en sangre pueden llegar a dañar los riñones lo que puede terminar en una insuficiencia renal importante.
- c) Neuropatía diabética, que involucra un daño en los nervios, principalmente afecta a los pies y piernas lo que puede llevar al llamado pie diabético, que se caracteriza por presentar pérdida en la sensibilidad con infecciones difíciles de controlar y que pueden llevar incluso a la amputación del miembro.
- d) Enfermedades cardiovasculares, como infartos, derrames cerebrales y enfermedad vascular periférica. Estas complicaciones son las más graves ya que son las principales causas de muerte en pacientes con DT2 (Du *et al.*, 2020).

Las complicaciones (Figura 5) generalmente se dan a largo plazo y pueden no tener ningún síntoma, por lo que el control médico continuo en personas diabéticas es importante, así como cambios en los hábitos de vida para mejorar la salud de estas personas (CDC, 2021). Las complicaciones más comunes son la nefropatía y la neuropatía.

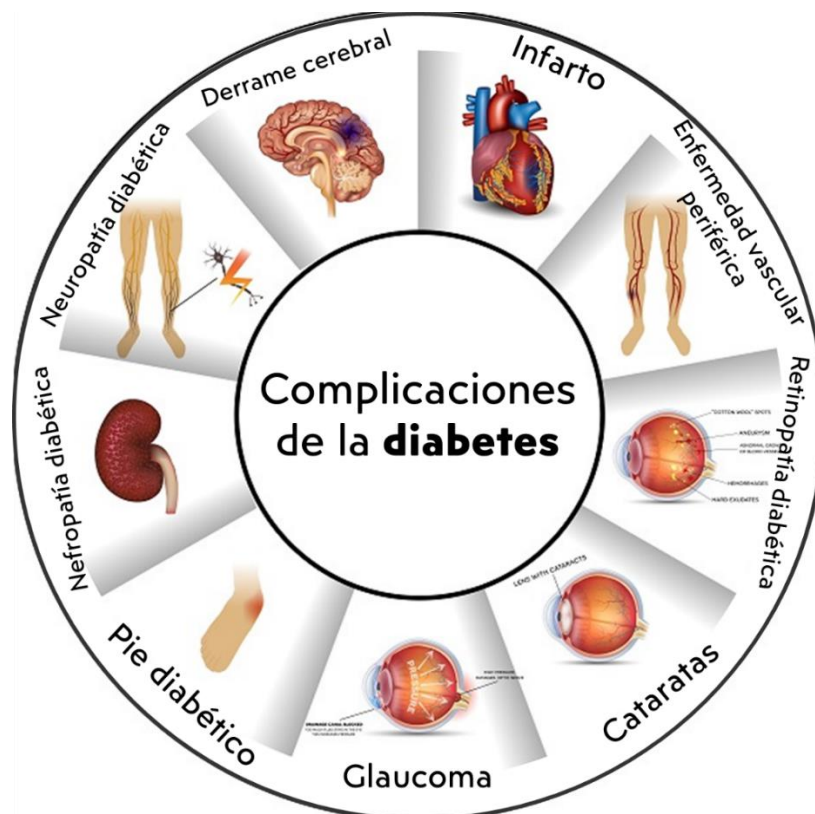


Figura 5. Complicaciones crónicas de la diabetes. Imagen modificada de <https://www.umassmed.edu/dcoe/diabetes-education/complications/>

Panorama mundial de la diabetes

De acuerdo con el estudio más reciente de la Federación Internacional de la Diabetes, actualmente existen 537 millones de personas con diabetes en el mundo (Figura 6), representado una prevalencia del 10.5 % de la población adulta global. Además, provocó la muerte de 6.7 millones de personas en el año 2021, siendo una de las principales causas de muerte en el mundo (IDF, 2021).

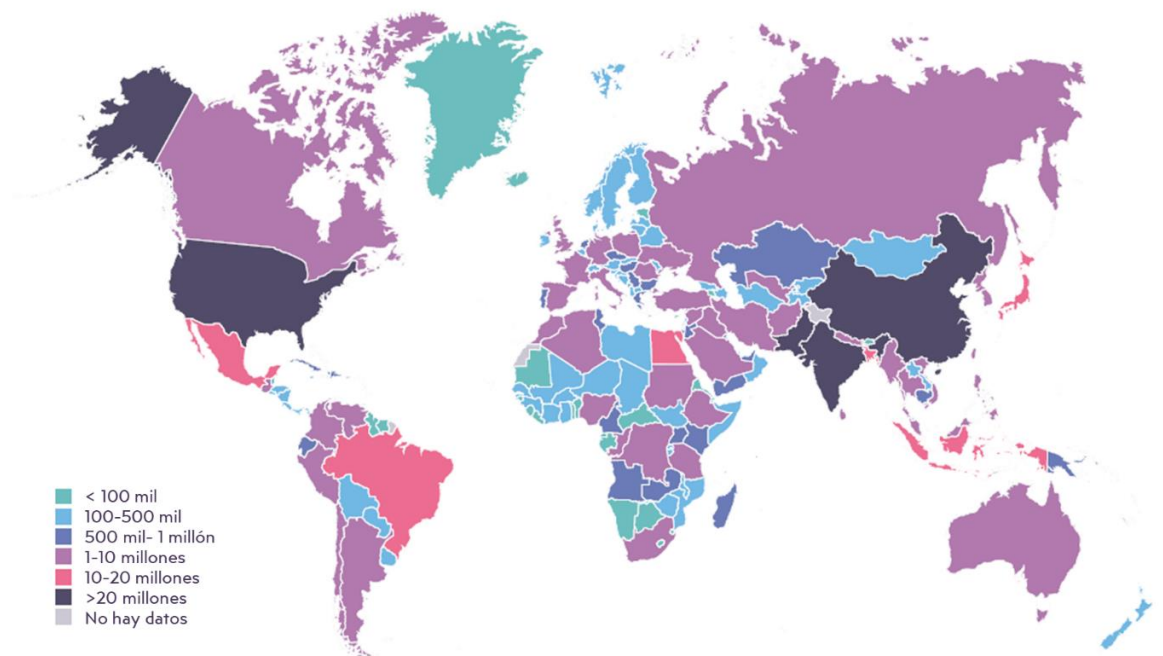


Figura 6. Mapa mundial con el número estimado de personas con diabetes en 2021. Modificado del Atlas de la Diabetes 2021.

En México, existen 14.1 millones de personas con diabetes, por lo que nuestro país ocupa el séptimo lugar de países con mayor prevalencia de diabetes en el mundo, solo detrás de Brasil a nivel Latinoamérica. Por otro lado, de acuerdo con cifras del INEGI, en el primer semestre del 2021 fue la tercera causa de muerte con 74 418 personas fallecidas, solo con el COVID-19 y las enfermedades del corazón siendo el primer y segundo lugar, respectivamente. Es importante mencionar que además, la tasa de mortalidad por diabetes ha aumentado, de 8.4 en 2019 a 11.95 en 2020, por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2021b; 2022).

Tratamiento

Actualmente, no existe cura para la diabetes, sin embargo, su tratamiento depende del tipo de diabetes que se padezca. En el caso de la DT1, al haber una carencia absoluta de insulina, el

tratamiento consiste en la administración exógena de esta hormona, la cual es insulina recombinante.

Por otro lado, de acuerdo con la ADA, el tratamiento de la DT2 consiste en un cambio en los hábitos de vida y, además, tratamiento farmacológico. El cambio en los hábitos de vida reside en mantener un plan alimenticio saludable, con una disminución en la ingesta de alimentos ricos en fructosa y sacarosa, practicar ejercicio, dormir al menos siete horas al día, controlar el consumo de alcohol, evitar el consumo de tabaco y finalmente, recibir ayuda psicológica ya que esta enfermedad aumenta el riesgo de padecer ansiedad y depresión (Garber *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que el tratamiento farmacológico debe ser individualizado, considerando el estado actual del paciente y debe tener los siguientes objetivos: disminuir el riesgo de hipoglucemia, favorecer la pérdida de peso y/o evitar el aumento de peso en pacientes con obesidad y mantener la hemoglobina glucosilada ≤ 6.5 %. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2 tienen distintos sitios de acción como puede observarse en la Figura 7.

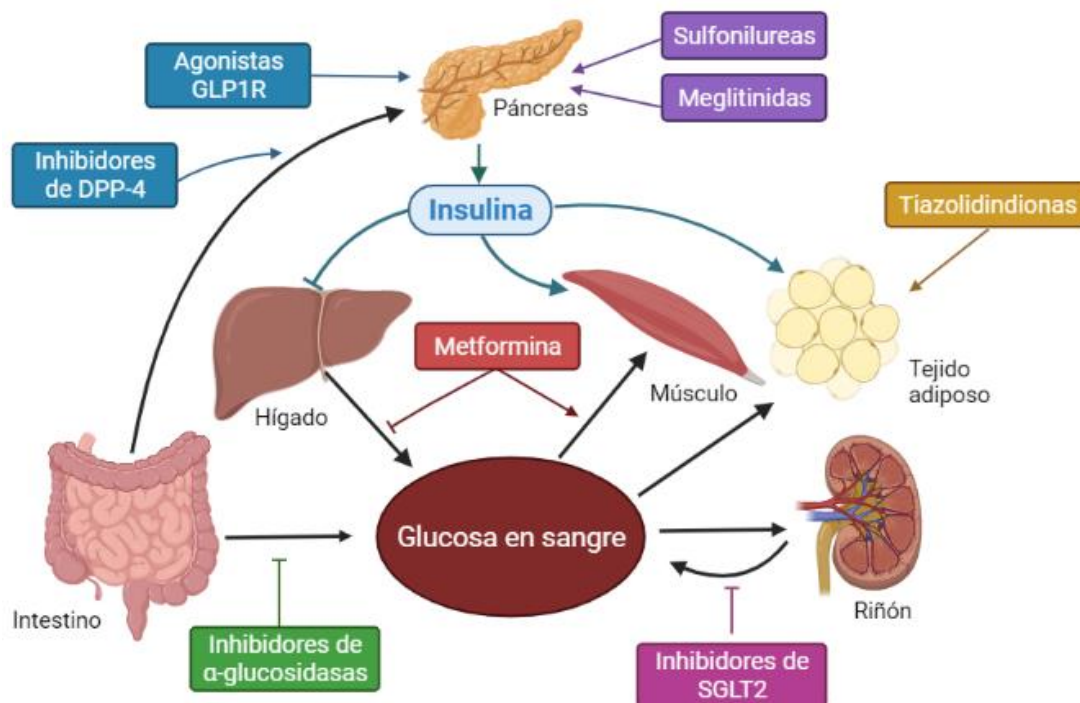


Figura 7. Sitios de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de la DT2. Imagen creada con BioRender.com

a) Metformina (1)

Es el fármaco de primera línea indicado para los pacientes en monoterapia. La metformina actúa disminuyendo la producción de glucosa por el hígado, inhibiendo la gluconeogénesis;

mejora la sensibilidad a la insulina en los órganos periféricos, como el músculo esquelético y disminuye la absorción de la glucosa en el intestino (Rena *et al.*, 2017).

El mecanismo de acción de la metformina consiste en la inhibición del Complejo I de la cadena respiratoria en la mitocondria, lo que disminuye la producción de ATP y un cambio en la relación AMP/ATP. El aumento en la concentración de AMP en la célula inhibe la acción de la enzima fructosa 1,6-bifosfatasa inhibiendo la gluconeogénesis en el hígado. De manera adicional, el aumento en la concentración de AMP también activa la AMPK, inhabilitando la síntesis de lípidos, favoreciendo la β -oxidación y la translocación del transportador de glucosa GLUT4 (Rena *et al.*, 2017), por lo que se da una sensibilización a la insulina en sus órganos blancos.

b) Sulfonilureas

Previo a la aprobación de la metformina por la FDA, las sulfonilureas eran el tratamiento de primera línea para los pacientes diabéticos. Actualmente existen tres sulfonilureas en el mercado, glibenclamida (**2**), glipizida (**3**) y glimepirida (**4**), sin embargo, su mayor uso es en terapias combinadas con metformina. Las combinaciones que existen en el mercado son glibenclamida/metformina y glipizida/metformina (Dahlén *et al.*, 2022).

Las sulfonilureas son secretagogos de insulina, lo que indica que su mecanismo de acción lleva a la liberación de insulina por las células β -pancreáticas de forma independiente a los niveles de glucosa en sangre, por lo que existe un riesgo de hipoglucemia.

En el lumen de las células β se encuentra el receptor de sulfonilureas (SUR1), el cual, al interactuar con su ligando, las sulfonilureas, permite el cierre del canal de potasio sensible a ATP, lo que permite la repolarización de la célula y por ende los canales de calcio dependientes de voltaje se abren, permitiendo la entrada de Ca^{2+} , el cual favorecerá la fusión de los gránulos de insulina a la membrana y su liberación a torrente sanguíneo.

c) Tiazolidindionas

Las tiazolidindionas son fármacos que actúan como sensibilizadores de insulina al activar los receptores PPAR que son receptores nucleares. Estos fármacos al interactuar con sus receptores PPAR- α y PPAR- γ , con mayor expresión en tejido adiposo y músculo esquelético, favorecen la expresión de genes cuyos efectos celulares son: el aumento de adiponectinas, la disminución de la gluconeogénesis y un incremento en la captura de glucosa por el tejido adiposo y el músculo liso.

Actualmente existen dos de este tipo de fármacos: la rosiglitazona (**5**) y la pioglitazona (**6**), cuyo uso en monoterapia es muy limitado y prefieren utilizarse en combinación con la metformina. El principal efecto adverso de este tipo de fármacos es el incremento de peso (Dahlén *et al.*, 2022).

d) Terapias dependientes de incretinas

El sistema incretina se basa en una mayor liberación de insulina cuando se consumen carbohidratos por vía oral. Esto se debe a que en el intestino se liberan dos hormonas incretinas: el péptido similar al glucagón 1 y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GLP-1 y GIP, por sus siglas en inglés, respectivamente). Particularmente la incretina GLP-1 llega a los islotes pancreáticos y se une a su receptor (GLP1R), el cual favorece la liberación de insulina y detiene la liberación de glucagón. Es importante mencionar que las incretinas tienen una vida media muy corta, ya que existe una enzima que se encarga de hidrolizar las hormonas, llamada dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4) (Upadhyay *et al.*, 2018; Dahlén *et al.*, 2022).

Las terapias dependientes de incretinas incluyen dos tipos de fármacos:

i) Miméticos de GLP-1

Actualmente en el mercado existen seis fármacos agonistas del receptor GLP1R: exenatida (**7**), un péptido obtenido del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*), liraglutida (**8**), dulaglutida (**9**), albiglutida, lixisenatida y semaglutida. Estos péptidos actúan como miméticos del GLP-1 y llevan a una mayor liberación de insulina por las células pancreáticas. Además, se ha comprobado su efecto para la disminución de peso y como cardioprotectores.

ii) Inhibidores de la DPP-4

Los inhibidores de la DPP-4 actúan bloqueando la acción de la enzima que degrada las incretinas, por lo que aumentan el tiempo de vida media de estas hormonas y con ello su efecto. Hoy en día existen cuatro de este tipo de fármacos: sitagliptina (**10**), saxagliptina (**11**), linagliptina (**12**) y alogliptina (**13**). Son ampliamente utilizados a pesar de no tener efecto en la disminución de peso de los pacientes y una principal desventaja es el posible riesgo de complicaciones cardiovasculares.

e) Meglitinidas

Las meglitinidas son fármacos que actúan de forma muy similar a las sulfonilureas, su mecanismo de acción es básicamente el mismo, ya que promueven la liberación de insulina al unirse al receptor SUR en las células pancreáticas, sin embargo, las meglitinidas se unen en un sitio diferente al de las sulfonilureas. Actualmente existen dos fármacos de este tipo: nateglinida

(14) y repaglinida (15), el primero posee una acción farmacológica sensible a la glucosa. Sin embargo, este tipo de fármacos tiene un alto riesgo de hipoglucemia, además de estar asociadas a ganancia de peso y el desarrollo de hiperinsulinemia (Dahlén *et al.*, 2022).

f) Inhibidores del co-transportador de sodio glucosa (SGLT2)

La glucosa al estar en circulación inevitablemente debe pasar por los riñones, donde es filtrada y reabsorbida en el túbulo proximal de la nefrona. La cantidad de glucosa que es filtrada es proporcional a la glucosa en circulación, sin embargo, el transporte de glucosa tiene un límite en donde ya no es capaz de reabsorber el exceso de glucosa en sangre. En condiciones normales, la glucosa es completamente reabsorbida, por lo que no hay presencia de glucosa en la orina (glucosuria).

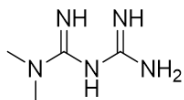
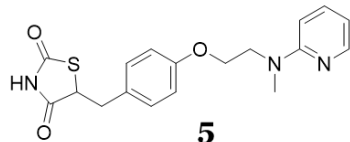
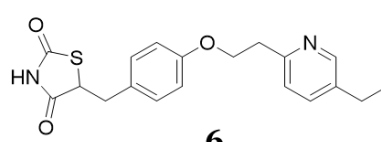
La reabsorción de la glucosa se da mediante el transportador SGLT2, por lo que, al inhibir al transportador, se favorece la glucosuria y, por ende, la disminución de glucosa en sangre. Los inhibidores de SGLT2 también pueden favorecer la pérdida de peso en los pacientes y mejorar las condiciones cardiovasculares de los pacientes. La principal desventaja de estos fármacos es la mayor susceptibilidad a infecciones en vías urinarias (Dahlén *et al.*, 2022; Upadhyay *et al.*, 2018).

Actualmente existen cuatro fármacos en el mercado, los cuales pueden utilizarse en monoterapia o en combinación con otro tipo de fármacos. Los inhibidores de SGLT2 que están en el mercado son canagliflozina (16), dapagliflozina (17), empagliflozina (18) y ertugliflozina (19).

g) Inhibidores de α -glucosidasas

Los carbohidratos consumidos en la dieta deben ser hidrolizados en monosacáridos para que puedan ser absorbidos. Las enzimas encargadas de llevar a cabo esta reacción son las α -glucosidasas, las cuales permiten la absorción de los carbohidratos en forma de glucosa. Los inhibidores de las α -glucosidasas, se encargan de bloquear la acción de estas enzimas, con la finalidad de evitar el aumento en la concentración de glucosa en sangre después de consumir alimentos (aumento de la glucosa posprandial).

Los inhibidores de α -glucosidasas actualmente en el mercado son la acarbosa (20), el miglitol (21) y la voglibosa (22), fármacos que han demostrado poseer buena eficacia y pérdida de peso en pacientes con alteraciones en el metabolismo de glucosa. También se ha observado que su combinación con metformina disminuye el riesgo cardiovascular en los pacientes (Du *et al.*, 2020). Sin embargo, estos fármacos tienen distintos efectos adversos como son diarrea, flatulencias y distensión abdominal (Dahlén *et al.*, 2022).

Metformina**1****Tiazolidindionas****5****6****Miméticos de GLP-1**

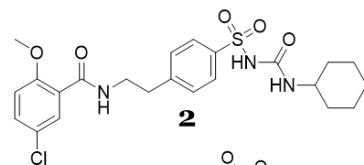
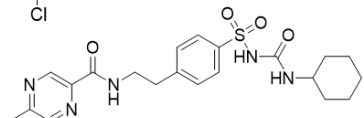
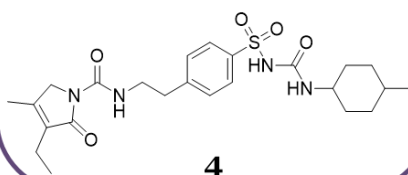
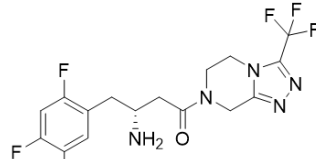
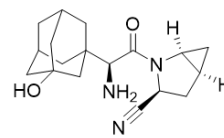
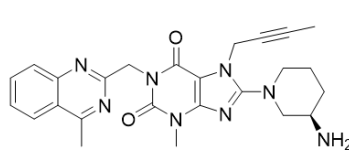
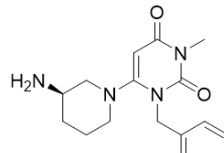
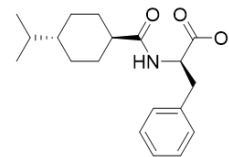
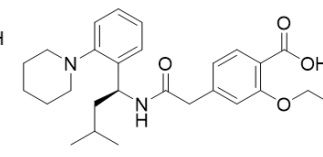
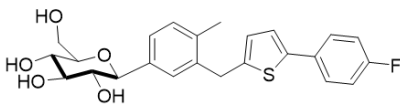
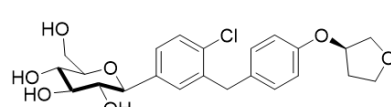
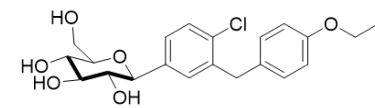
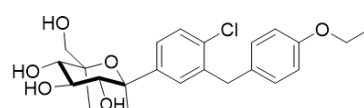
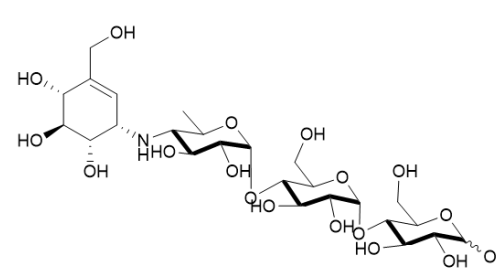
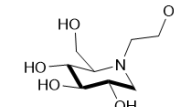
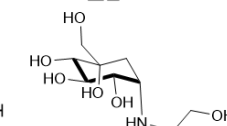
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

7

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVRGRG

8

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGGGGGG
 GSAESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPDLMISRTEVTCV
 VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

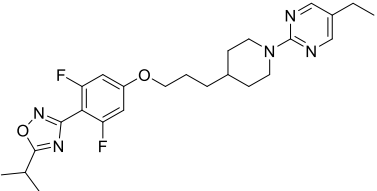
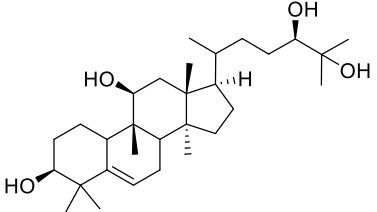
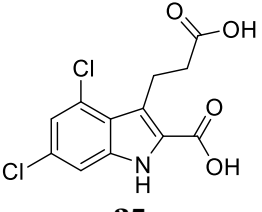
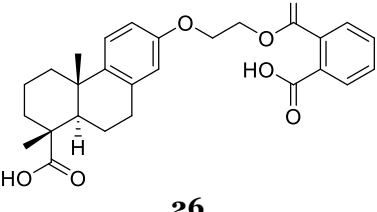
9**Sulfonilureas****2****3****4****Inhibidores de DPP-4****10****11****12****13****Meglitinidas****14****15****Inhibidores de SGLT2****16****18****17****19****Inhibidores de alfa-glucosidasas****20****21****22**

Cuadro 2. Fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la DT2.

h) Nuevos blancos moleculares

Actualmente existen muchos otros blancos moleculares para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de DT2. La mayoría de estos blancos moleculares son receptores y enzimas. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de moléculas en desarrollo con estos nuevos blancos moleculares.

Tabla 1. Ejemplos de moléculas con nuevos blancos moleculares para el tratamiento de la DT2.

Compuesto	Blanco molecular	Referencia
 <p>23</p>	Agonista GPR119	(Kim <i>et al.</i> , 2021)
 <p>24</p>	Activador AMPK	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
 <p>25</p>	Inhibidor FBP1	(Bie <i>et al.</i> , 2015)
 <p>26</p>	Inhibidor PTP-1B	(Yang <i>et al.</i> , 2020)

A. Agonistas del receptor GPR119.

El receptor acoplado a proteína G (GPR119) se encuentra en las células β -pancreáticas. Cuando un ligando se une a este receptor ($G\alpha$) se aumenta la concentración de *AMPc* y por ende se estimula la secreción de insulina (Kerru *et al.*, 2018; Dahlén *et al.*, 2022).

B. Activadores de AMPK

Los activadores de la enzima AMPK promueven la captación de glucosa en músculo esquelético y reduce la gluconeogénesis en hígado (Dahlén *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2021).

C. Inhibidores de la fructosa 1,6-bifosfatasa 1 (FBP1)

La FBP1 es una enzima involucrada en la gluconeogénesis en el hígado. Su inhibición produce una disminución indirecta en los niveles de glucosa en personas con DT2 (Dahlén *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2021).

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

La enzima PTP-1B es una enzima involucrada en la retroalimentación negativa de la cascada de señalización de la insulina y la leptina. Los inhibidores de esta enzima amplifican la fosforilación del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina, mejorando la acción de la insulina en sus órganos blancos (Sharma *et al.*, 2021; Kerru *et al.*, 2018).

3. Inhibidores de α -glucosidasas

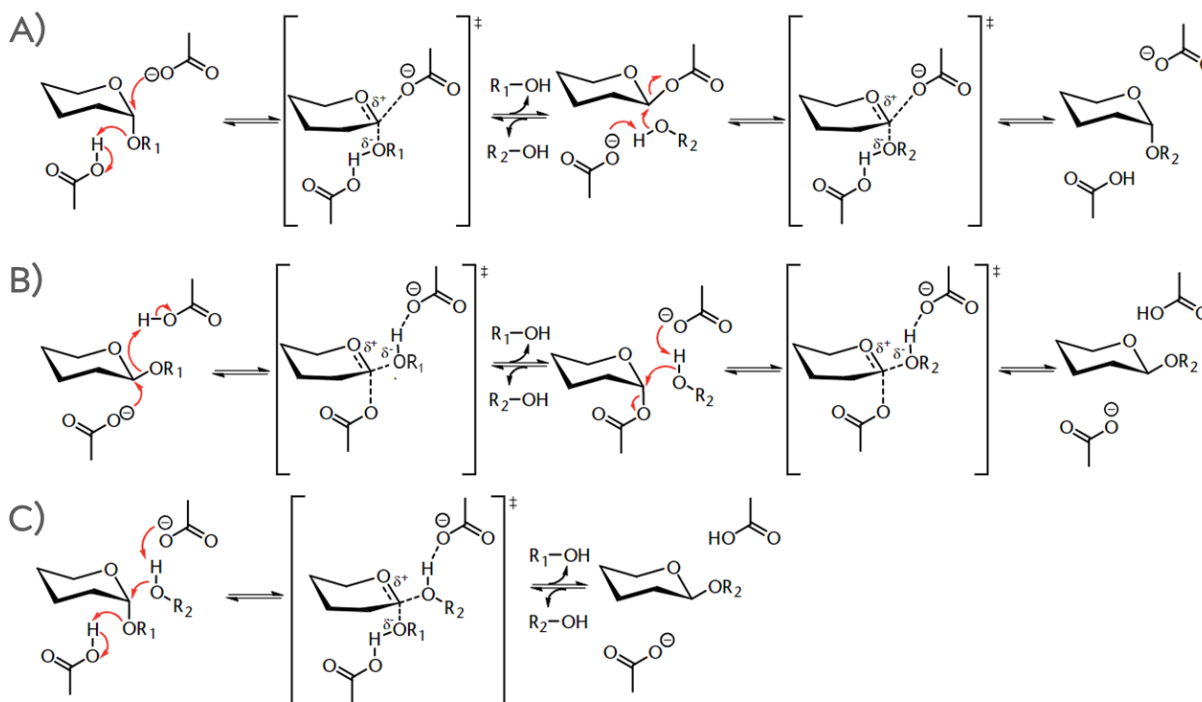
Generalidades de las enzimas glicósido-hidrolasas

Los carbohidratos constituyen la mayor fuente de energía para el cuerpo, estos son consumidos mediante oligosacáridos y disacáridos por la dieta. Para que estos componentes puedan utilizarse por el cuerpo es necesario que se hidrolicen en monosacáridos, esta función la realizan las glicósido-hidrolasas.

El primer paso para la simplificación de los carbohidratos se da por la amilasa salival y los jugos pancreáticos, sin embargo, la importancia de las glicósidos-hidrolasas predomina en el intestino, donde se llevan a cabo las reacciones para la digestión de los carbohidratos y su absorción (Blanco & Blanco, 2017).

Las glicósido-hidrolasas presentes en el borde del intestino son la maltasa glucoamilasa (MGAM), sacarasa-isomaltasa (SI), lactasa (LPH) y trehalasa (TREH). Estas hidrolasas pueden mantener o invertir la configuración del carbono anomérico. El mecanismo por el cual las glicósidos-hidrolasas catalizan la reacción de hidrólisis involucra la participación de dos ácidos carboxílicos presentes en el sitio catalítico de la enzima, uno actúa como donador de protones y el otro como base nucleofílica (Elferink *et al.*, 2020).

Las α -glucosidasas, como la MGAM y SI, hidrolizan enlaces alfa y mantienen la configuración del enlace glucosídico, por lo que liberan α -glucosa; la enzima LPH, es una β -glucosidasa, la cual hidroliza enlaces β manteniendo la configuración β ; y finalmente, la enzima TREH, hidroliza enlaces alfa, pero invirtiendo la configuración del carbono anomérico, por lo que el residuo hidrolizado tiene configuración β . En el Esquema 1 puede observarse el mecanismo de reacción de las glicósido-hidrolasas presentes en el intestino.



Esquema 1. Mecanismo de hidrólisis de las glicósido-hidrolasas presentes en el intestino humano. A) α -glucosidasas con retención de la configuración; B) β -glucosidasas con retención de la configuración y C) α -glucosidasas con inversión de la configuración. Tomado de Kötzler *et al.*, 2014.

α -glucosidasas presentes en el intestino humano

- Maltasa-Glucoamilasa (MGAM), realiza el 20 % de la actividad maltasa (hidrólisis α 1 \rightarrow 4). Contiene dos subunidades, la subunidad N-terminal con actividad maltasa y la subunidad C-terminal con actividad glucoamilasa (hidrólisis de oligosacáridos de maltosa). Esta enzima representa el 2 % de las enzimas presentes en el borde del intestino delgado, además la mayor cantidad de estas enzimas se encuentran en el íleon distal (Elferink *et al.*, 2020; Blanco & Blanco, 2017).
- La enzima Sacarasa-Isomaltasa (SI), constituye el 80 % de la actividad maltasa que se da en el intestino, particularmente en el yeyuno; esta enzima también posee dos subunidades, la subunidad C-terminal tiene actividad sacarasa y la subunidad N-terminal, actividad

isomaltasa (hidrólisis α 1 \rightarrow 6). Es importante mencionar que esta enzima tiene baja afinidad por la hidrólisis de oligosacáridos y representa el 10 % de las proteínas totales expresadas en el borde del intestino (Blanco & Blanco, 2017; Elferink *et al.*, 2020).

- Finalmente, la enzima Trehalasa (TREH), la cual es específica para hidrolizar el carbohidrato trehalosa, presente en alimentos de origen fúngico, se encuentra en cantidad muy limitada ya que representa el 0.3 % de las enzimas expresadas en el intestino (Elferink *et al.*, 2020; Blanco & Blanco, 2017).

Inhibidores de α -glucosidasas

Los inhibidores de α -glucosidasas (IAG), tienen como objetivo evitar la acción catalítica de las enzimas MGAM y SI, encargadas de romper los oligosacáridos y liberar glucosa, que posteriormente se absorbe y pasa a la circulación sistémica, por lo que evitan el pico posprandial. Este mecanismo puede observarse en la Figura 8.

También se ha observado que los IAGs indirectamente promueven la liberación de incretinas (GLP-1 específicamente), ya que, al retardar la digestión de los carbohidratos, sus concentraciones a nivel intestinal se mantienen elevadas por mayor tiempo, favoreciendo así la liberación continua de GLP-1, y por consiguiente de insulina (Hossain *et al.*, 2020).

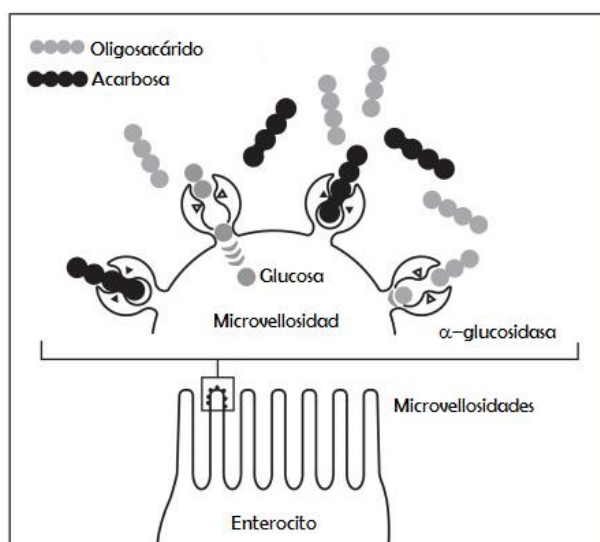


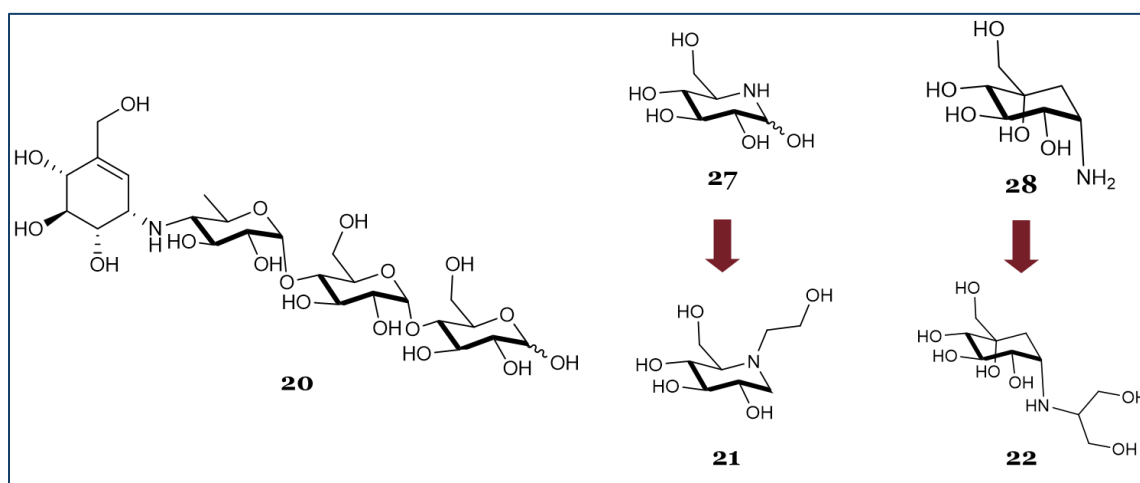
Figura 8. Mecanismo de acción de los inhibidores de α -glucosidasas.

El mayor impacto de los IAGs radica en evitar el pico posprandial, mismo que ocasiona estrés oxidativo, y los consiguientes daños. El estrés oxidativo se presenta en las personas con DT2 cuando los tejidos independientes de insulina absorben más glucosa de la necesaria debido a la hiperglucemia crónica y a la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo e

hígado. El exceso de glucosa dentro de estas células disminuye la relación de NADPH/NADP⁺ y la concentración de glutatión (GSH); por otro lado, se favorece la producción de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés), con la consecuente disminución de agentes antioxidantes, y un aumento en especies reactivas de oxígeno (Hossain *et al.*, 2020).

El uso de IAGs en combinación con metformina y algunas glitazonas disminuyen el riesgo de complicaciones cardiovasculares, causadas por el daño en el endotelio vascular debido a la disminución de óxido nítrico en los estados de hiperglucemia posprandial (Du *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2018). También se ha reconocido que el tratamiento de la condición prediabética con IAGs retrasa la progresión a DT2 (Mangan *et al.*, 2018).

Los IAG que actualmente están en el mercado son la acarbosa, el miglitol y la voglibosa (Cuadro 3). Estos tres fármacos son productos naturales o derivados. Así, la acarbosa (**20**), aislada del actinomiceto *Actinoplanes utahensis*, es un tetrapseudosacárido que inhibe también la actividad frente a la α -amilasa. El miglitol (**21**), un derivado de la nojirimicina (**27**), obtenido de *Streptomyces roseochromogenes* y la morera (*Morus* sp, Moraceae) asimismo favorece el gasto energético en el tejido adiposo. Ambos productos escinden todos los enlaces α -glicosídicos. Finalmente, la voglibosa (**22**), un derivado *N*-sustituido del producto natural valiolamina (**28**) obtenido del microorganismo *Streptomyces hygroscopicus*, tiene una actividad específica para las α -glucosidasas intestinales, principalmente contra las disacaridasas (Ghani, 2015; Hossain *et al.*, 2020).

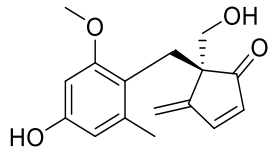
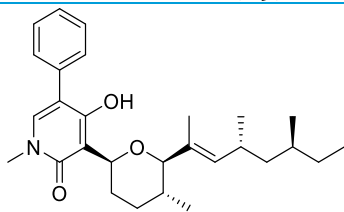
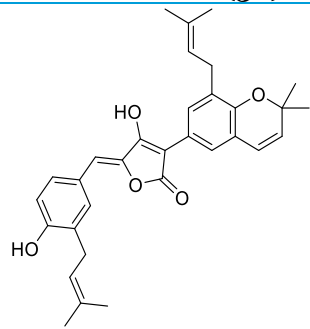
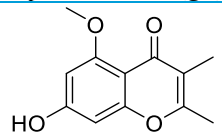
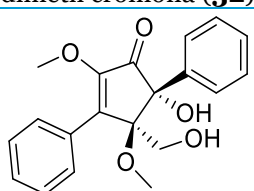


Cuadro 3. Inhibidores de α -glucosidasas y los productos naturales de los cuales se derivaron.

Como se puede observar, los microorganismos son una excelente fuente de obtención de compuestos bioactivos, particularmente de IAGs. En la Tabla 2 se indican algunos metabolitos de

origen microbiano descubiertos en los últimos años con actividad inhibitoria de las de α -glucosidasas.

Tabla 2. Ejemplos selectos de inhibidores de α -glucosidasas de origen fúngico.

Compuesto	CI ₅₀	Fuente de obtención	Referencia
 Peniorcinol C (29)	38.9 ± 4.9 μ M	<i>Penicillium brefeldianum</i> F4a	(Bai <i>et al.</i> , 2021)
 Sambutoxina A (30)	12.6 ± 0.9 μ M	<i>Talaromyces</i> sp. CY-3	(Yang <i>et al.</i> , 2021)
 Aspulvinona V (31)	2.2 ± 0.4 μ M	<i>Aspergillus terreus</i> ASM-1	(Wu <i>et al.</i> , 2021)
 7-hidroxi-5-metoxi-2,3-dimetil cromona (32)	13 μ M	<i>Daldinia eschscholtzii</i> HJ004	(Liao <i>et al.</i> , 2019)
 Phomopsina A (33)	30.07 ± 0.75 μ M	<i>Phomopsis asparagi</i>	(Zhou <i>et al.</i> , 2021)

4. Generalidades sobre la enzima PTP-1B

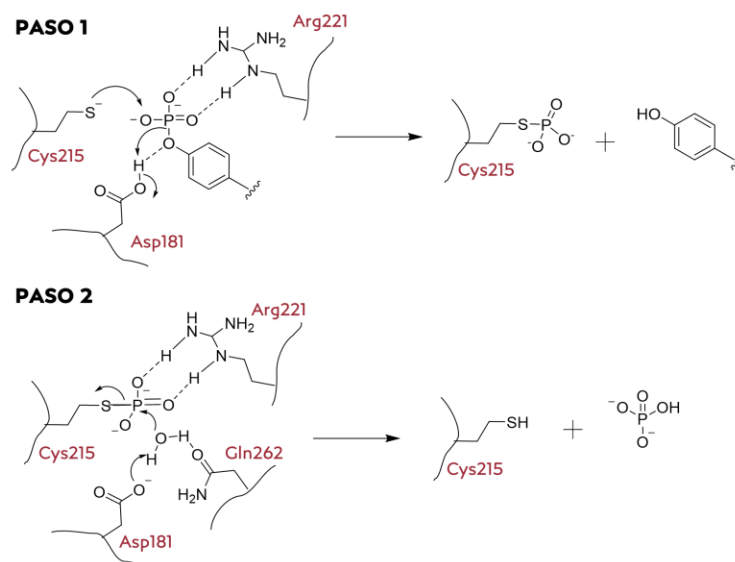
La fosforilación y desfosforilación de las proteínas de tirosina son mecanismos regulatorios para la diferenciación y crecimiento celular. Estos procesos están regulados por dos tipos de enzimas, las proteínas tirosinas cinasas y fosfatasa (PTK y PTP, por sus siglas en inglés, respectivamente).

La familia de las PTP puede clasificarse en cuatro clases; las clases I-III tienen como base la cisteína. Las enzimas clase I, son las clásicas fosfatasa conocidas como fosfotirosinas (pTyr) y estas se subdividen en dos grupos: las PTPs intracelulares y las transmembranales. Las enzimas clase II tiene una especificidad dual, y las de clase III son conocidas como Cdc25 fosfatasa. Por otro lado, las PTP clase IV son a base de aspartato, tienen bajo peso molecular y están expresadas en varios tipos de tejidos (Tamrakar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2022).

La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) es una de las enzimas más importantes de la familia de las PTP, pertenece a la clase I y es una proteína intracelular; se encuentra en la cara del citoplasma del retículo endoplásmico en los tejidos sensibles a insulina, como hígado, músculo y tejido adiposo (Singh *et al.*, 2022).

La PTP-1B es enzima monomérica con 431 aminoácidos, de los cuales, los aminoácidos 30-278 comprenden el sitio catalítico. Los 35 aminoácidos presentes en el carboxilo terminal son ricos en prolina y están involucrados en el anclaje de la enzima en el retículo endoplásmico.

El mecanismo de acción catalítico de la PTP1B consta de dos pasos, en el primer paso se lleva a cabo una reacción nucleofílica por parte del azufre del residuo catalítico Cys215 al grupo fosfato; también se adiciona un protón de la Asp181 a la tirosina fosforilada. En este punto se forma un intermediario cisteína-fosfato. El segundo paso inicia con el residuo Gln262 que se coordina con una molécula de agua, y el residuo Asp181 actúa como una base que hidroliza el enlace formado en el intermediario cisteína-fosfato, y como resultado se libera fosfato. mecanismo de la reacción se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Mecanismo de acción de la PTP-1B. Modificado de Sharma *et al.*, 2020.

La enzima tiene varias características estructurales. Las más importantes se resumen a continuación:

- (i) La base del sitio catalítico es un motivo PTP (con los aminoácidos 214-221) y en él se encuentra los residuos catalíticos Cys215 y Arg221, cuya función consiste en reorientar el sustrato para favorecer las interacciones de puente salino en el sitio catalítico.
- (ii) El “loop” WPD (aminoácidos 179-187), sitio altamente conservado entre las PTPs, cuya función consiste en abrir o cerrar el “pocket” del sitio catalítico para que pueda llevarse a cabo la reacción, además en este loop se encuentra el Asp181, aminoácido necesario para la reacción enzimática.
- (iii) Otro motivo es el loop Q que contiene al aminoácido Gln262 y el loop pTyr que contiene el residuo de tirosina que es fosforilado (Tyr46) (Tonks, 2003; Sharma *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 2002).

La PTP-1B está involucrada en la regulación negativa de la señalización de la insulina y la leptina (Figura 9). La PTP-1B cataliza la defosforilación del receptor de insulina (IR) y del sustrato del receptor de insulina (IRS) interrumpiendo la cascada de señalización de PI3K y Akt y por ende disminuyendo la traslocación del transportador GLUT4, por lo que la sensibilidad de los tejidos a la glucosa se ve disminuida (Singh *et al.*, 2022).

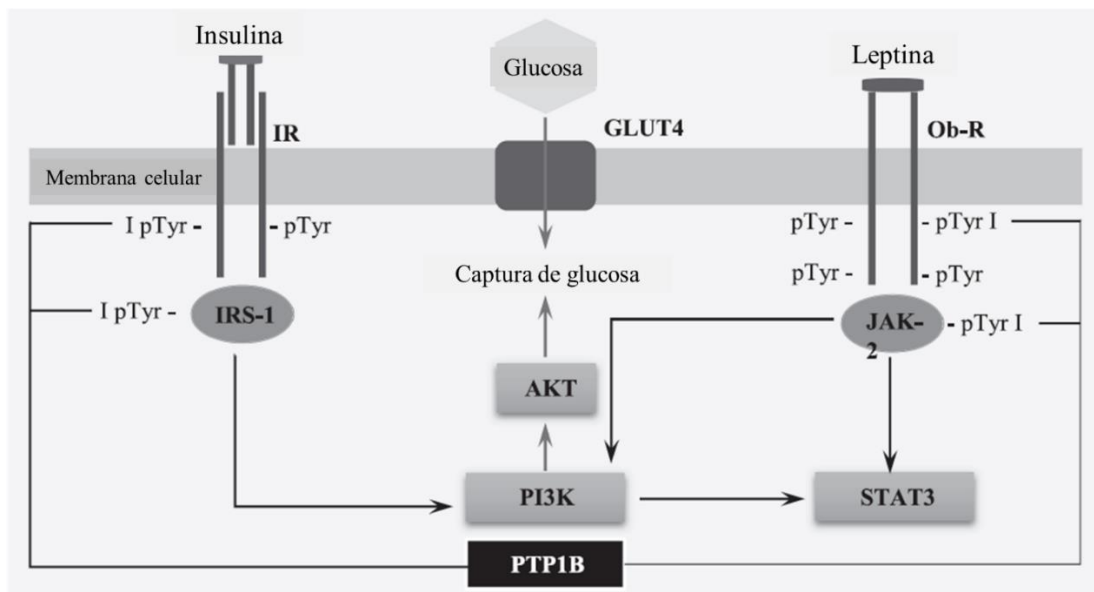


Figura 9. Acción de la enzima PTP-1B en las vías de señalización de la insulina y la leptina. Modificado de Singh *et al.*, 2022.

En cuanto a la señalización de la leptina, en condiciones normales, la leptina llega a su receptor ObR y se autofosforila, posteriormente se fosforila la proteína JAK2 que traduce señales a la proteína STAT3. STAT3 se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes que

promueven la disminución de acción de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACC), malonil coenzima A y de la síntesis de ácidos grasos, por lo que se favorece la β -oxidación de los ácidos grasos. La PTP-1B desfosforila la proteína JAK2, evitando la oxidación de grasas y favoreciendo la síntesis de ácidos grasos (Johnson *et al.*, 2002).

Inhibidores de PTP-1B

Por la acción que tiene la PTP-1B en las vías de señalización de la leptina y la insulina, se ha sugerido que la inhibición de esta enzima favorecería la sensibilización de la insulina y disminuiría la obesidad en pacientes con DT2.

Esta alternativa es bastante novedosa, sin embargo, existe una alta conservación del sitio catalítico de la enzima PTP-1B con otras PTPs, particularmente de la proteína tirosina fosfatasa de células T (TCPTP), ya que existe un 74% de identidad en sus secuencias (Figura 10), además de una gran similitud en sus sitios activos. Es por eso por lo que el descubrimiento de inhibidores alostéricos en lugar de inhibidores catalíticos podría favorecer la selectividad para su uso sobre la PTP-1B.

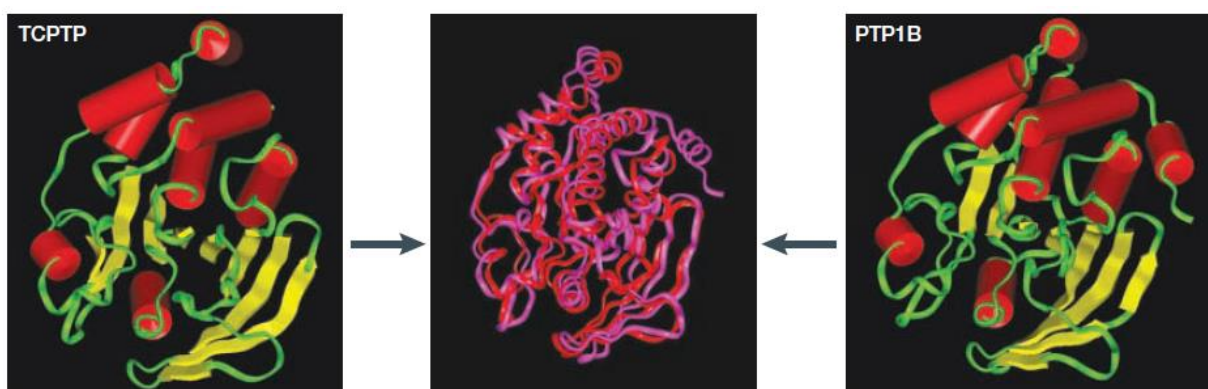
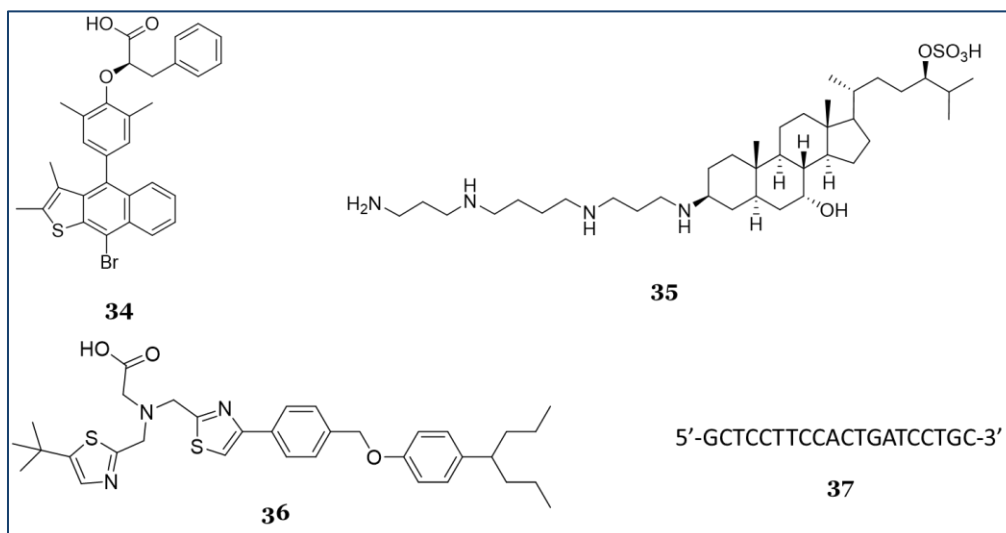


Figura 10. Estructuras de rayos X de las enzimas TCPTP y PTP-1B. En la imagen central se observa el trasape de las enzimas PTP-1B en rosa y TCPTP en rojo. Imagen tomada de Johnson *et al.*, 2002.

Actualmente el descubrimiento y síntesis de inhibidores de PTP-1B ha cobrado fuerza, y se han obtenido varias moléculas con potencial para el tratamiento de DT2. Particularmente existen cuatro compuestos que llegaron a fases clínicas pero que desafortunadamente tuvieron que ser suspendidos debido a efectos adversos considerables. Estos compuestos son el ertiprotafib (**34**) desarrollado por la compañía farmacéutica Takeda & Wyeth (Zhang & Lee, 2003); la trodusquemina (**35**), un producto natural aislado del tiburón *Squalus acanthias* (Lantz *et al.*, 2010) y JTT-551 (**36**), un compuesto sintetizado por la compañía Japan Tobacco Central Pharmaceutical Research Institute (Fukuda *et al.*, 2010). Finalmente, el cuarto producto es el

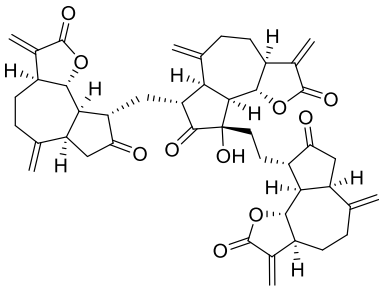
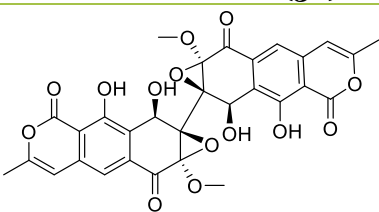
oligonucleótido ISIS-113715 (37), desarrollado por la compañía ISIS Pharmaceuticals (He *et al.*, 2014; Swarbrick *et al.*, 2009). Las estructuras de estos inhibidores pueden observarse en el Cuadro 4.

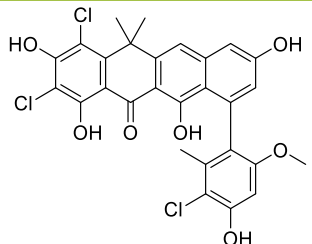
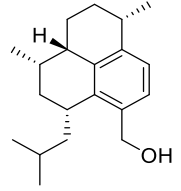
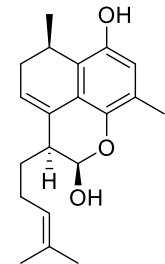


Cuadro 4. Inhibidores de PTP-1B que llegaron a evaluarse en estudios clínicos.

A pesar del desafortunado destino de estos cuatro inhibidores, actualmente existe una amplia biblioteca de compuestos de síntesis, extractos de origen natural y metabolitos secundarios (Tabla 3) con buena actividad frente a la PTP-1B, por lo que se podría pensar que alguno de ellos pueda alcanzar nuevamente los estudios clínicos y ser aprobado para su uso contra la DT2 y la obesidad.

Tabla 3. Ejemplos selectos de inhibidores de PTP-1B a partir de fuentes naturales.

Compuesto	CI ₅₀	Fuente de obtención	Referencia
 Macrocefatriolida B (38)	26.26 ± 0.88 μM	<i>Ainsliaea macrocephala</i> (planta)	(Ren <i>et al.</i> 2021)
 Xantoepocina (39)	8.8 ± 1.0 μM	<i>Penicillium</i> sp. IQ-429 (hongo)	(Martínez-Aldino <i>et al.</i> , 2021)

 <p>Naftacemicina B10 (40)</p>	$2.11 \pm 0.54 \mu\text{M}$	<i>Streptomyces</i> sp. N12W1565 (actinobacteria)	(Huo <i>et al.</i> , 2020)
 <p>Acrepseudoterina (41)</p>	$22.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$	<i>Acremonium</i> sp. SF-7394 (hongo)	(Kim <i>et al.</i> , 2021)
 <p>Myoporulatano A (42)</p>	$97.4 \mu\text{M}$	<i>Myoporium insulare</i> (planta)	(Kjaerulff <i>et al.</i> , 2020)

5. Antecedentes del género *Malbranchea*

El género *Malbranchea* fue creado por Saccardo en 1882 con una única especie, *Malbranchea pulchella*. Este género se caracteriza por poseer artroconidios alternados y ramificaciones curvas o arqueadas en sus hifas. La descripción de este hongo se realizó complementando el trabajo de A. Malbranche, un naturalista francés que realizó sus estudios botánicos y micológicos en Normandía; por lo que Saccardo nombró el género en su honor (Rodríguez-Andrade *et al.*, 2021). En la Figura 11 puede observarse el depósito original de *M. pulchella* en el Herbario de la Universidad de Padua en Italia.

Posteriormente en 1964, Cooney y Emerson identificaron a *M. pulchella* como una especie mesófila, y a *M. sulfurea* como una especie termófila (*M. sulfurea* actualmente es conocida como *M. cinnamomea*). Años más tarde, en 1976, Sigler y Carmichael agregaron 11 nuevas especies al género.

Como características principales, las especies de *Malbranchea* son comunes en el suelo y tienen una distribución global. Las especies pueden ser mesófilas, termotolerantes o termófilas y con actividad queratinolítica o celulolítica (Sigler & Carmichael, 1976).



Figura 11. *Malbranchea pulchella*, encontrada en una cartulina húmeda, los dibujos en tinta pertenecen a A. Malbranche y los dibujos en lápiz a P. A. Saccardo. Imagen tomada de Rodríguez-Andrade *et al.*, 2021.

De acuerdo con el Species Fungorum, perteneciente al Index Fungorum, gestionado por el Jardín Botánico Real de Kew en el Reino Unido, el Instituto Landcare Research de Nueva Zelanda y el Instituto de Microbiología de la Academia China de Ciencias, el género *Malbranchea* consta de 23 especies, mismas que se enlistan a continuación:

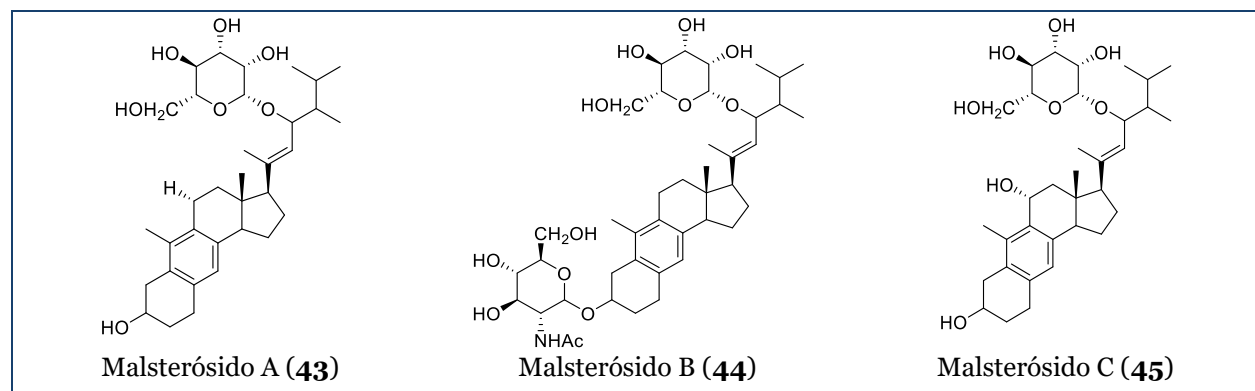
- *Malbranchea albolutea* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea arcuata* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea aurantiaca* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea californiensis* (G.F. Orr & Kuehn) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano (2021)
- *Malbranchea chlamydospora* (M. Solé, Cano & Guarro) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel (2021)
- *Malbranchea chrysosporioidea* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea circinata* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea compacta* (G.F. Orr & Plunkett) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel (2021)
- *Malbranchea concentrica* (M. Solé, Cano & Guarro) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano (2021)
- *Malbranchea dendritica* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea filamentosa* Sigler & J.W. Carmich. (1982)
- *Malbranchea flava* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea flavorosea* Sigler & J.W. Carmich. (1976)

- *Malbranchea flocciformis* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea fulva* Sigler & J.W. Carmich. (1976)
- *Malbranchea graminicola* Sigler & J. Lacey (1982)
- *Malbranchea kambayashii* Kambay. (1934)
- *Malbranchea longispora* (Stchigel, Y. Marín, Guarro & Cano) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano (2021)
- *Malbranchea multicolor* Mannina & Mosca (1984)
- *Malbranchea ostraviensis* (Hubka, Dobiášová & M. Kolařík) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel (2021)
- *Malbranchea pseudauxarthron* (G.F. Orr & Kuehn) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano (2021)
- *Malbranchea pulchella* Sacc. & Penz. (1882)
- *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Miehe) Cooney & R. Emers. (1964), (= *Malbranchea cinnamomea*)

De acuerdo con la literatura, el género *Malbranchea* es una fuente importante de metabolitos con actividad biológica y con una gran variedad estructural, incluyendo esteroides modificados designados con el nombre trivial de antraesteroides (**43-45**), alcaloides indólicos (**74-77**, **80-82**), purinas (**55**), terpenoides (**49-54**), eremofilanos (**79**), dímeros de compuestos C6C3-C6-C2 (**46-48**), y policétidos varios.

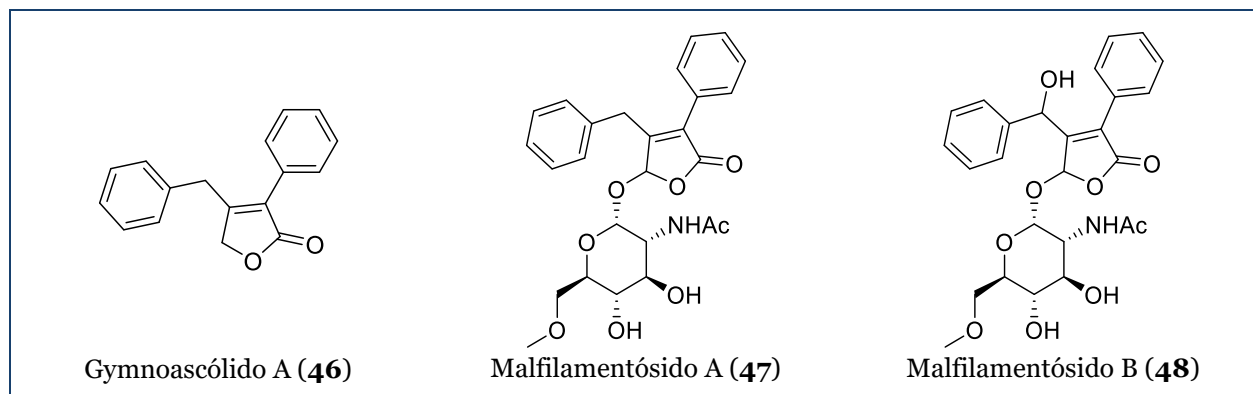
Malbranchea filamentosa

De *M. filamentosa* se han aislado diversos tipos de compuestos, entre ellos los malsterósidos A-C (**43-45**). Estos compuestos tienen como característica principal que el anillo B del núcleo esteroidal es de carácter aromático, y además son glicósidos. Los malsterósidos A y C (**43** y **45**) demostraron efectos citostáticos contra las líneas celulares HeLa y A549 (carcinoma de pulmón), mientras que el malsterósido B (**44**) no presentó actividad. Esto indica que la presencia de un hidroxilo libre en el anillo A es fundamental para la actividad biológica (Wakana *et al.*, 2014).



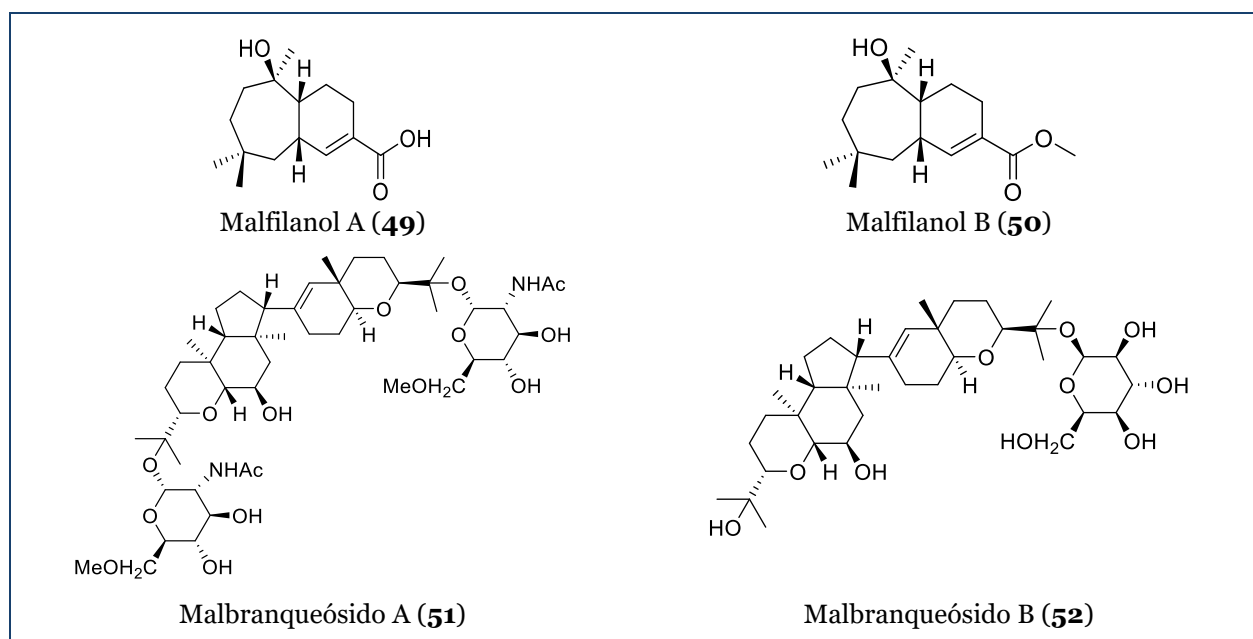
Cuadro 5. Antraesteroides aislados de *M. filamentosa*.

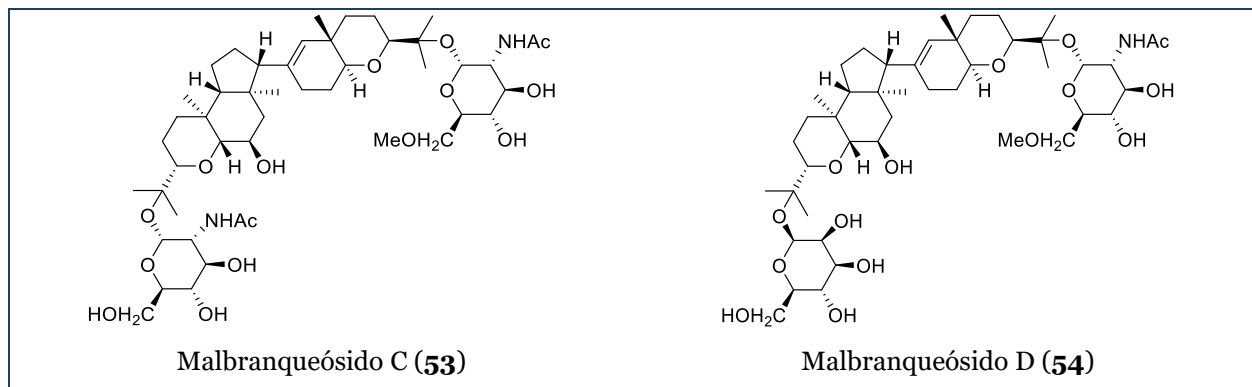
Otros metabolitos aislados de esta especie incluyen dímeros de compuestos C6C3-C6C2 (**46-48**), los cuales presentan una lactona de cinco miembros α , β -insaturada. El gymnoascólido A (**46**) es el más simple de estos productos y posee actividad vasodilatadora (Hosoe *et al.*, 2005), los malfilamentósidos A (**47**) y B (**48**) son de naturaleza glicosídica; el malfilamentósido A (**47**) es el glucósido del gymnoascólido A (Wakana *et al.*, 2008a).



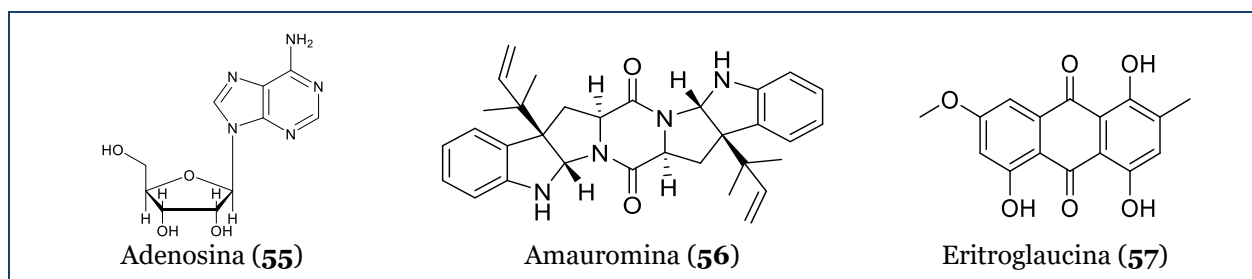
Cuadro 6. Derivados C6C3-C6C2 de *M. filamentosa*.

También se han aislado terpenoides de la especie *M. filamentosa*. El primer grupo incluye a los sesquiterpenoides llamados malfilanoles A (**49**) y B (**50**) los cuales presentaron actividad antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* y actividad citotóxica en la línea celular HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical) (Wakana *et al.*, 2009). Otros terpenoides, son los malbranqueósidos A-D (**51-54**), triterpenoides modificados, que contienen D-glucosamina como glicona (Wakana *et al.*, 2008b).



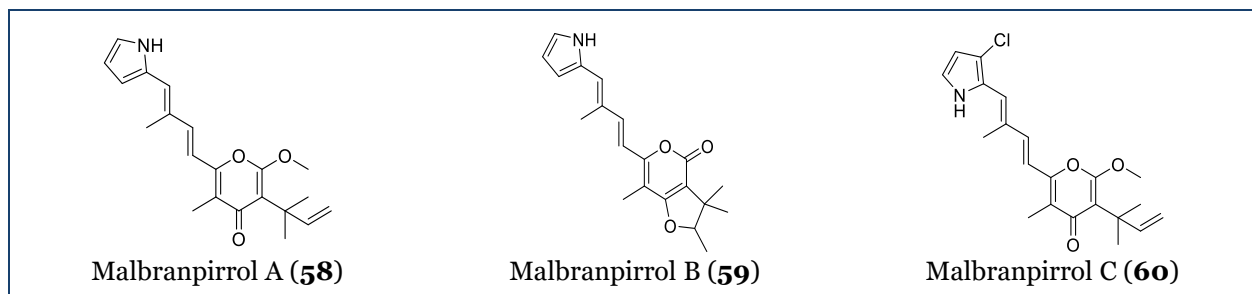
Cuadro 7. Terpenoides de *M. filamentosa*.

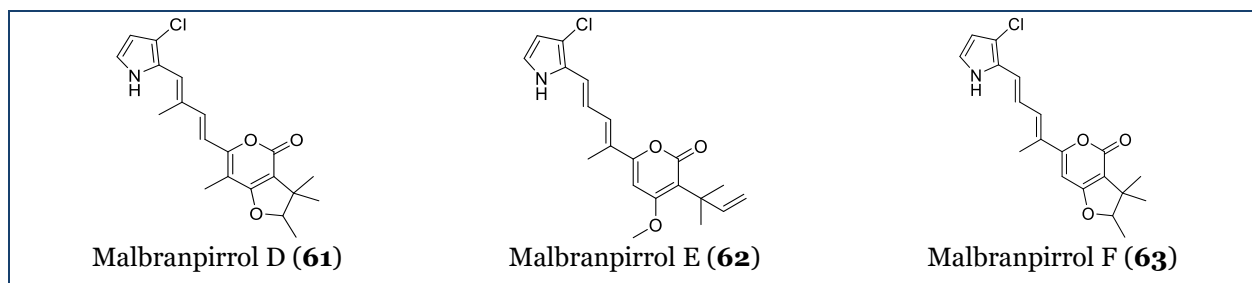
También de *M. filamentosa* se aisló la purina adenosina (**55**) que presentó actividad como inhibidor de la agregación plaquetaria (Moriyama *et al.*, 2009), la amauromina (**56**), un alcaloide indólico con el núcleo dicetopiperazina (Wakana *et al.*, 2008a) y la antraquinona eritroglaucina (**57**) (Hosoe *et al.*, 2005).

Cuadro 8. Otros metabolitos aislados de *M. filamentosa*.

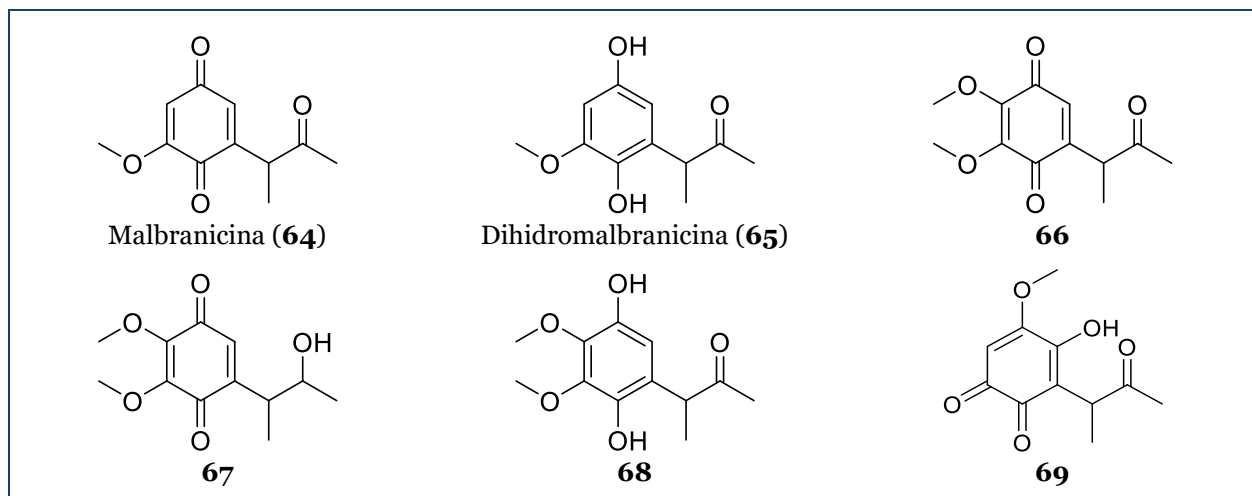
Malbranchea cinnamomea

Malbranchea cinnamomea es una especie termófila del género; previamente se conocía como *M. pulchella* var. *sulfurea* o *M. sulfurea*. Esta especie sintetiza una gran variedad de compuestos, entre ellos los malbranpirroles A-F (**58-63**), metabolitos secundarios con anillos tipo α - o γ -pironas. Estos compuestos tienen actividad citotóxica en las líneas celulares PANC-1 (carcinoma epitelioide de páncreas), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria).

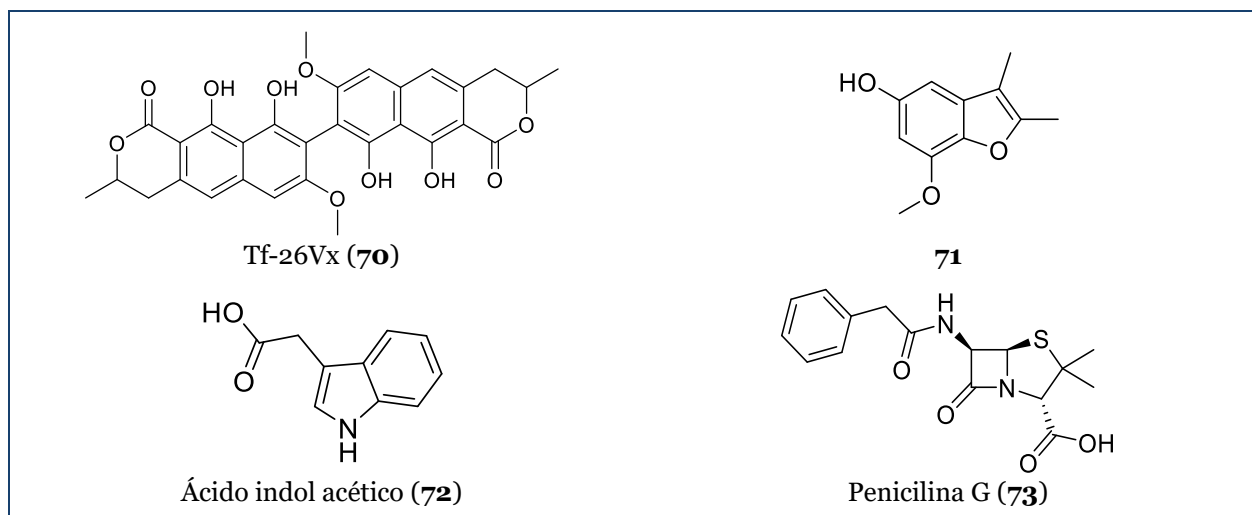


Cuadro 9. Malbranpirroles aislados de *M. cinnamomea*.

M. cinnamomea también biosintetiza benzoquinonas e hidroquinonas (**64-70**). De este grupo, la molécula base es la malbranicina (**64**), que tiene actividad antibiótica frente a bacterias Gram positivas y citotóxica contra las líneas celulares P388 (linfoma de monocitos) y KB (carcinoma/papiloma)(Chiung *et al.*, 1993). El resto de los derivados son *p*-benzoquinonas con excepción del compuesto **69** que es una *o*-benzoquinona y únicamente la 7-metoximalbranicina (**66**) presentó actividad inhibitoria del activador transcripcional del retrovirus HTLV-I causante del linfoma de Hodking (Schlegel *et al.*, 2003a).

Cuadro 10. Benzoquinonas e hidroquinonas aisladas de *M. cinnamomea*.

Otros metabolitos aislados de *M. cinnamomea* son el compuesto Tf-26Vx (**70**), un dímero de dihidroisocumarinas con actividad antibiótica frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas estrictamente anaerobias (Saito *et al.*, 1979). También se aisló el 7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (**71**), que presentó actividad antioxidante frente a la xantina oxidasa y a la peroxidasa (Schlegel *et al.*, 2003b) y el ácido indol acético (**72**) (Sujatha *et al.*, 2002). Finalmente, también se ha descrito la presencia de antibióticos peptídicos como la penicilina G (**73**) y las malbranchinas A y B. Aunque la estructura de estos compuestos aún no se determina, los autores describieron que la malbranchina A es un péptido cíclico compuesto por valina, leucina, alanina y glicina, y que esta es activa frente a bacterias Gram positivas (Premabai & Narasimharao, 1966).

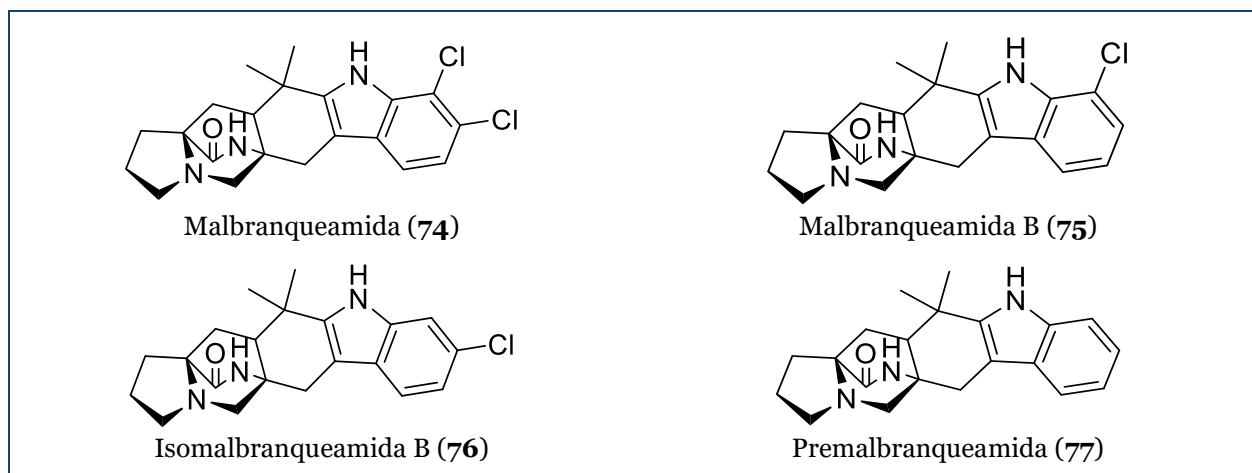
Cuadro 11. Metabolitos varios de *M. cinnamomea*.

Malbranchea aurantiaca

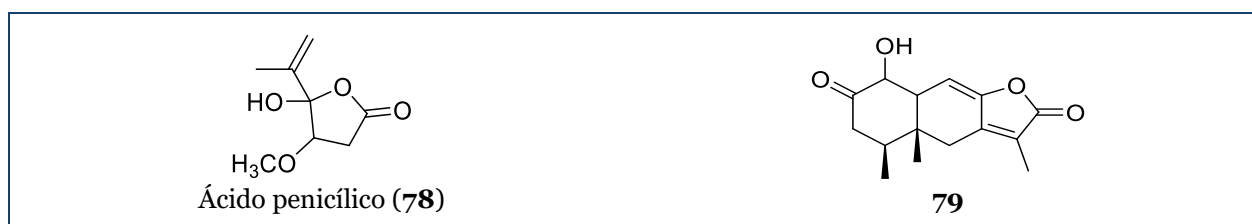
De *M. aurantiaca* se aislaron las malbranqueamidas (74-77), una serie de alcaloides de tipo indol-terpenoides los cuales derivan de una unidad de L-triptófano, una L-prolina y un residuo isopreno y que presentan un biciclo[2.2.2]diazaoctano (Martínez-Luis *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2011; 2008)

Esta familia de compuestos representa los únicos metabolitos con el sistema de anillo bicíclico [2.2.2] diazaoctano obtenidos de una fuente fúngica fuera de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*; además son los únicos que presentan halogenación en el anillo indólico. Se caracterizan también por la presencia de una monocetopiperazina en el biciclo y la configuración *syn* en el puente del biciclo (Finefield *et al.*, 2012).

En cuanto a su actividad biológica, las malbranqueamidas son inhibidoras de la calmodulina, en particular los productos 74-76 (Figueroa *et al.*, 2011; Figueroa, González, and Mata 2008). La malbranqueamida (74) posee además propiedades fitotóxicas ya que inhibe la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus* (Martínez-Luis *et al.*, 2006). Más recientemente se comprobó su efecto vasorrelajante en aorta de rata, el efecto fue dependiente de la concentración, y fue mayor en presencia del endotelio (Madariaga-Mazon *et al.*, 2015) y su efecto antihiper glucémico (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020).

Cuadro 12. Malbrancheamidas aisladas de *M. aurantiaca*.

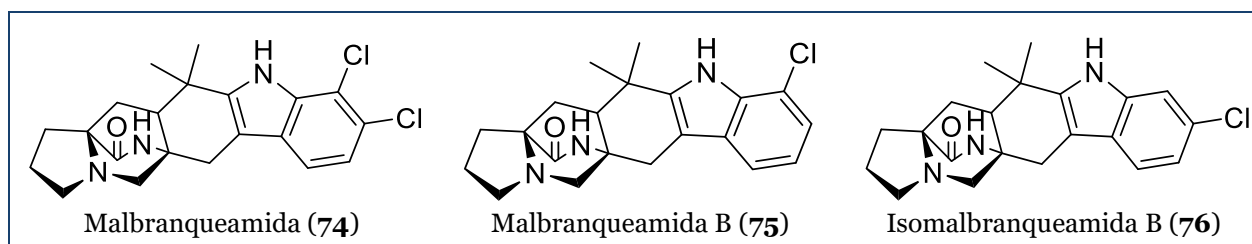
Además de los indol-alcaloides aislados, también se obtuvieron compuestos como el ácido penicílico (78) con propiedades fitotóxicas y un eremofilano (79) también con actividad como inhibidor de la calmodulina (Martínez-Luis *et al.*, 2005).

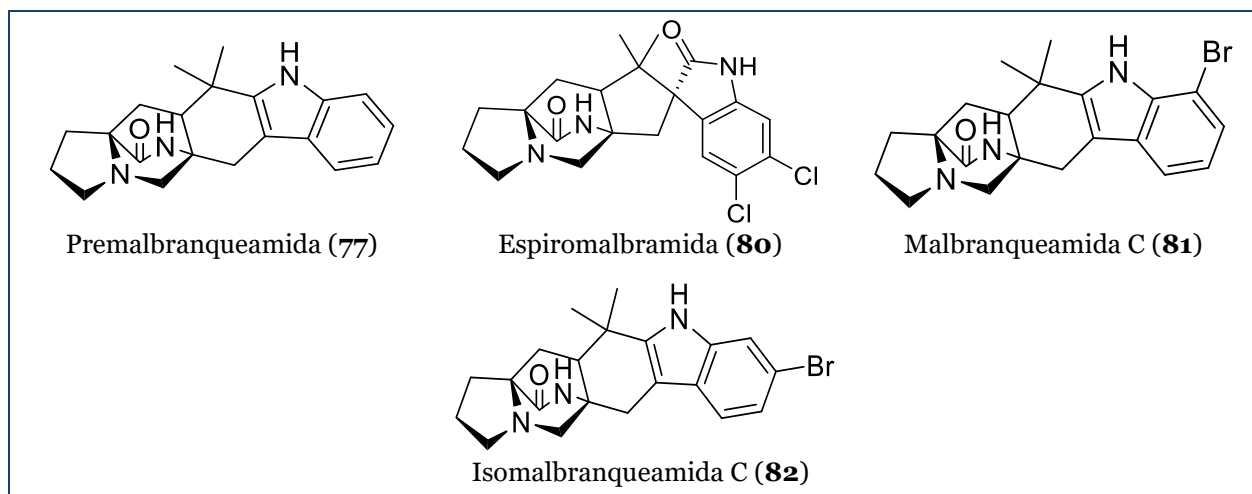
Cuadro 13. Otros metabolitos aislados de *M. aurantiaca*.

Malbranchea graminicola

Malbranchea aurantiaca no es la única especie de *Malbranchea* capaz de sintetizar alcaloides con el núcleo biciclo [2.2.2] diazaoctano; de *M. graminicola* también se aislaron una serie de malbrancheamidas (74-77), incluyendo la espiromalbrancheamida (80).

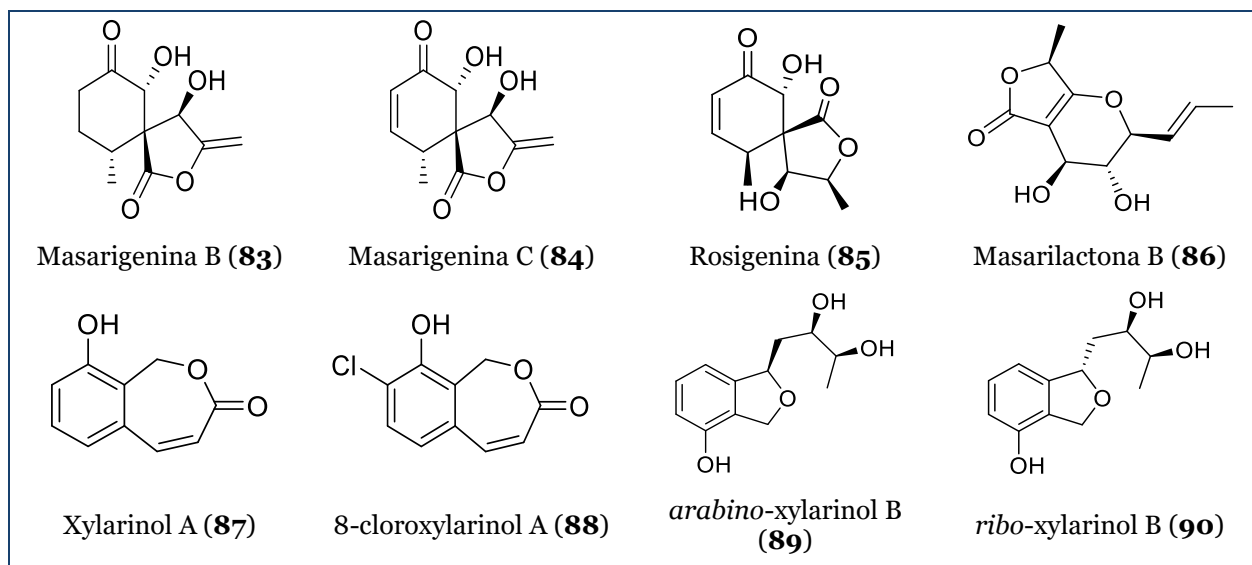
La adición de sales de bromo al medio de cultivo de *M. graminicola* llevaron al aislamiento de otros derivados de la malbrancheamida, con la particularidad de que presentan bromo en lugar de cloro en el anillo aromático de su estructura química. Estos metabolitos fueron llamados malbrancheamida C (81) e isomalbrancheamida C (82) (Watts *et al.*, 2011).



Cuadro 14. Indol-alcaloides aislados de *M. graminicola*.

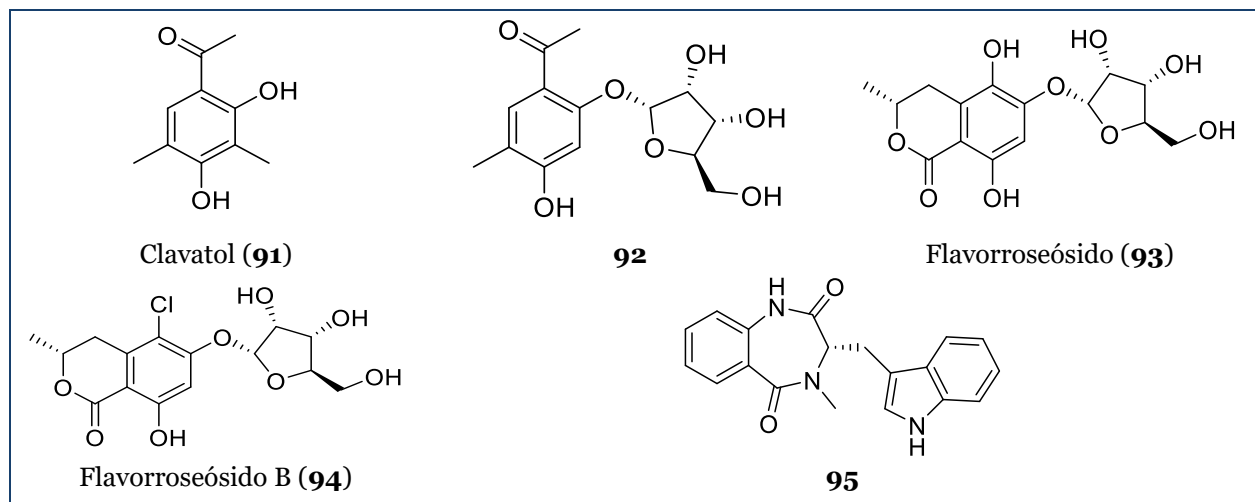
Malbranchea flavorosea

Malbranchea flavorosea es una especie que se caracteriza por la biosíntesis de policétidos, de esta especie se han aislado compuestos con el núcleo espiro como las masarigeninas B (83) y C (84) y la rosigenina (85); la masarilactona B (86), el xylarinol A (87), el 8-cloroxylarinol A (88) y los xylarinoles B: *arabino*-xylarinol B (89) y *ribo*-xylarinol B (90). Cabe mencionar que de estos metabolitos el compuesto 84 demostró tener una buena actividad como inhibidor de α -glucosidasas *in vitro* e *in vivo* (Verastegui-Omaña *et al.*, 2017).

Cuadro 15. Policétidos de *M. flavorosea*.

También se han aislado acetofenonas como el clavatul (91) y la 4-hidroxi-2-O- α -ribofuranosil-5-metilacetofenona (92), y lactonas novedosas como el flavorroseósido (93) y el

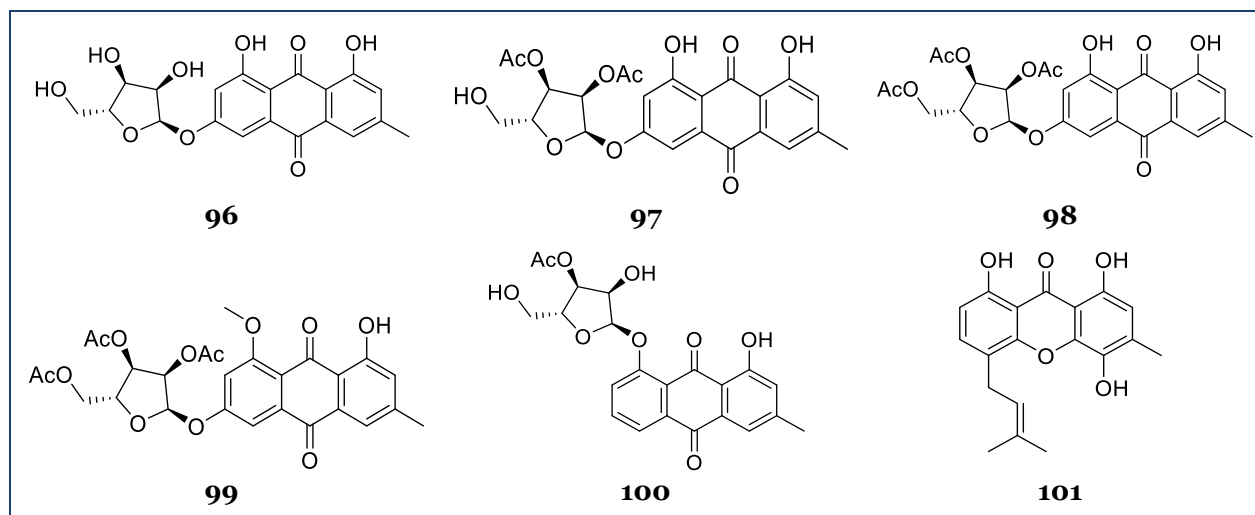
flavorroseósido B (**94**). Finalmente se aisló también un péptido de la familia de las ciclopeptinas, con un residuo de triptófano, llamado (*S*)-3,4-dihidro-3-(1*H*-indol-3-ilmetil)-4-metil-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-diona (**95**), este compuesto también resultó ser un buen inhibidor de α -glucosidasas, sin embargo, solo se realizaron experimentos *in vitro* para este compuesto (Rebollar-Ramos *et al.*, 2018).

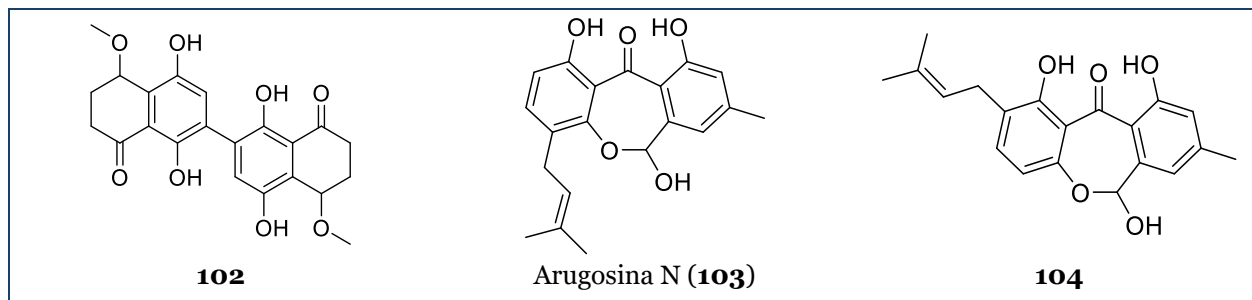


Cuadro 16. Otros metabolitos de *M. flavorosea*.

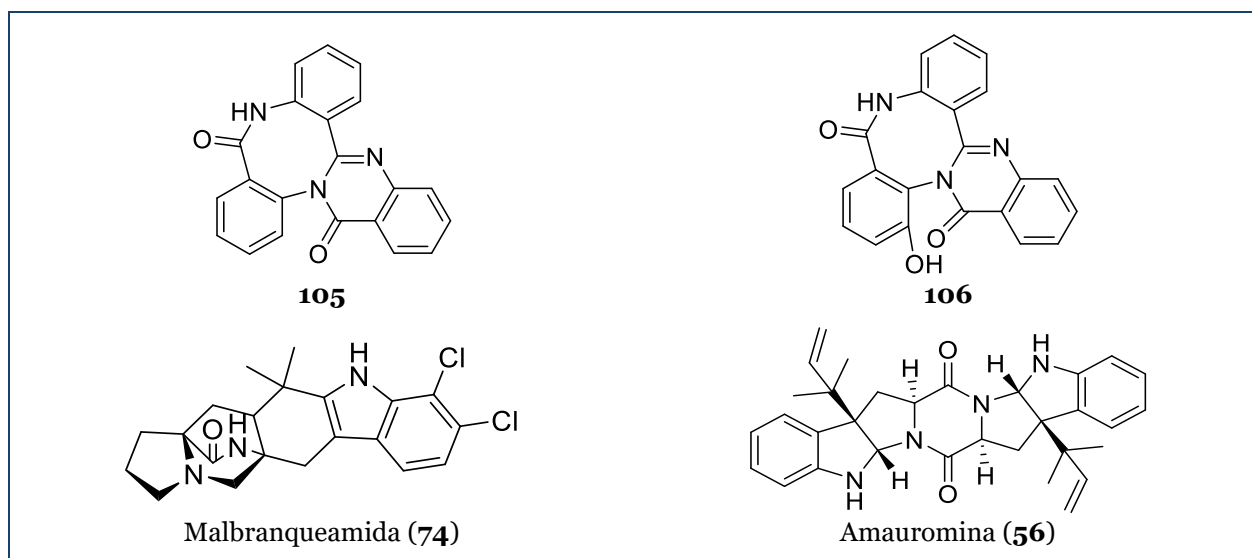
Malbranchea circinata

El estudio químico de *M. circinata* demostró que esta especie produce metabolitos de distinta naturaleza, se aislaron varias antraquinonas (**96-100**) glucosiladas, una xantona prenilada (**101**), un dímero de 5,8-dihidroxi-4-metoxi- α -tetralona (**102**), la arugosina N (**103**) y otra antraquinona modificada relacionada (**104**).



Cuadro 17. Policétidos aislados de *M. circinata*.

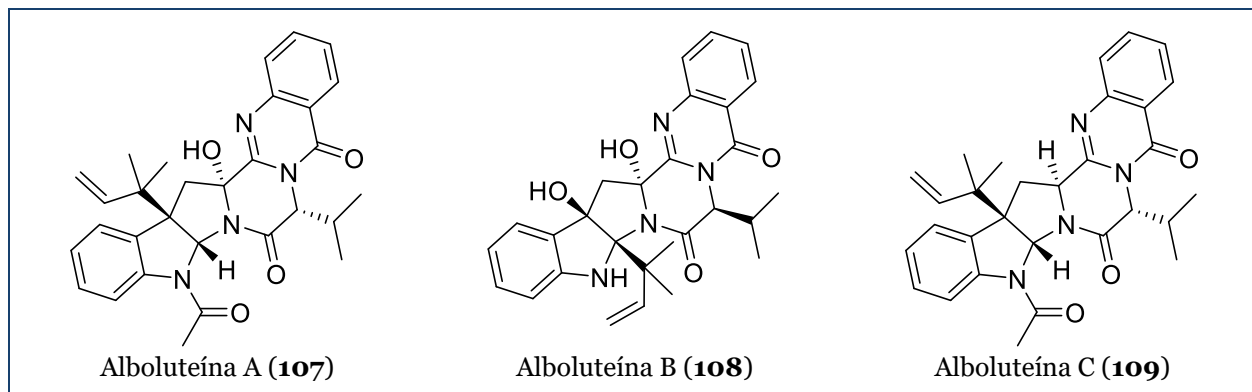
Adicionalmente se aislaron dos derivados de ácido antranílico (**105-106**) y nuevamente los alcaloides malbranqueamida (**74**) y amauromina (**56**), metabolitos también presentes en *Malbranchea aurantica* y *M. flocciformis*, respectivamente.

Cuadro 18. Derivados de ácido antranílico y alcaloides aislados de *M. circinata*.

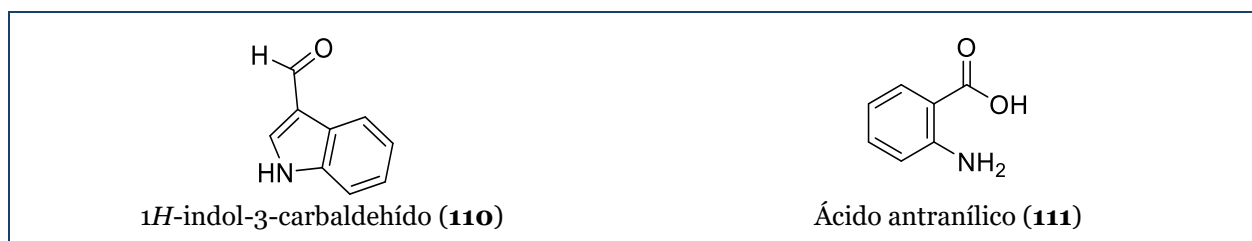
De este grupo de compuestos, los metabolitos **105**, **106**, **96**, **56** y **74** presentaron una actividad moderada frente a las enzimas α -glucosidasas de levadura. Por otro lado, los compuestos **102-104** presentaron mejor actividad como inhibidores de la PTP-1B, sin embargo, el resto de los compuestos presentaron una actividad moderada frente a esta enzima (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020).

Malbranchea albolutea

Malbranchea albolutea demostró poseer metabolitos tipo ardeeminas, las llamadas alboluteínas A-C (**107-109**), metabolitos novedosos que resultaron poseer actividad frente a la enzima PTP-1B, siendo la alboluteína B el metabolito más potente como inhibidor (Díaz-Rojas *et al.*, 2021).

Cuadro 19. Metabolitos tipo ardeeminas aisladas de *M. albolutea*.

Además de las alboluteínas, se aislaron metabolitos muy sencillos como el 1*H*-indol-3-carbaldehído (**110**) y el ácido antranílico (**111**) de los cuales no se presentó actividad biológica.

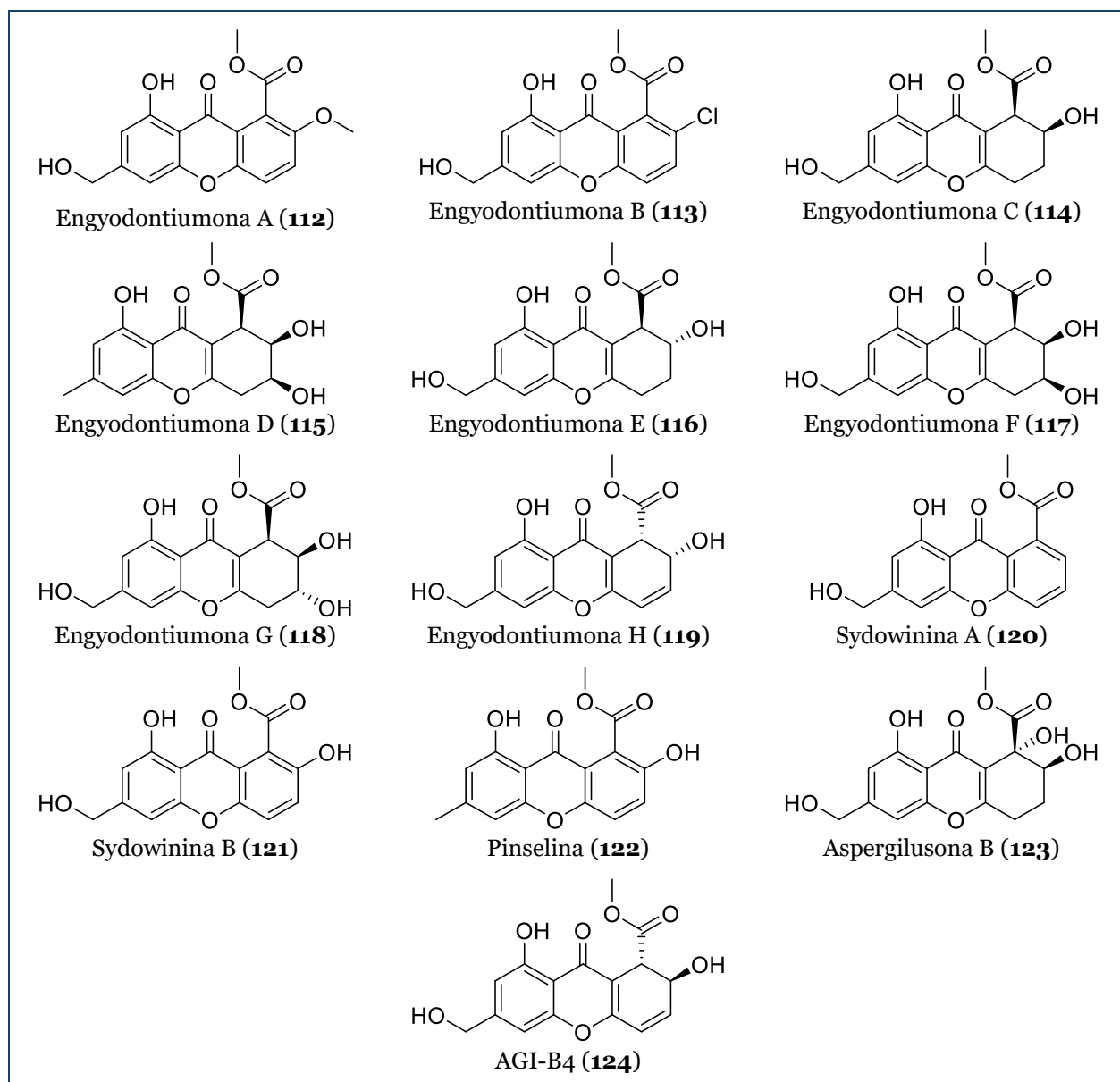
Cuadro 20. Otros metabolitos de *M. albolutea*.

6. Antecedentes de la especie *Parengyodontium album*

Parengyodontium album ha tenido diversos nombres y ha cambiado de género en varias ocasiones, lo cual es muy común al momento de realizar la taxonomía a nivel molecular de los hongos. En primer lugar, este hongo fue identificado en 1940 como *Tritirachium album*, especie única en el género recién creado *Tritirachium*. Posteriormente fue cambiado al género *Beauveria* y renombrado como *Beauveria alba*. Luego, en 1978, se creó un nuevo género denominado *Engyodontium*, y *B. alba* cambió su nombre a *Engyodontium album*. Finalmente en 2016, Tsang y colaboradores realizaron un estudio donde se encontró que por características filogenéticas y quimiotaxonómicas, la especie *E. album*, era muy diferente a las demás especies de *Engyodontium*, por lo que se creó un nuevo género: *Parengyodontium*, donde actualmente se clasifica la especie *Parengyodontium album* (Leplat *et al.*, 2020; Tsang *et al.*, 2016).

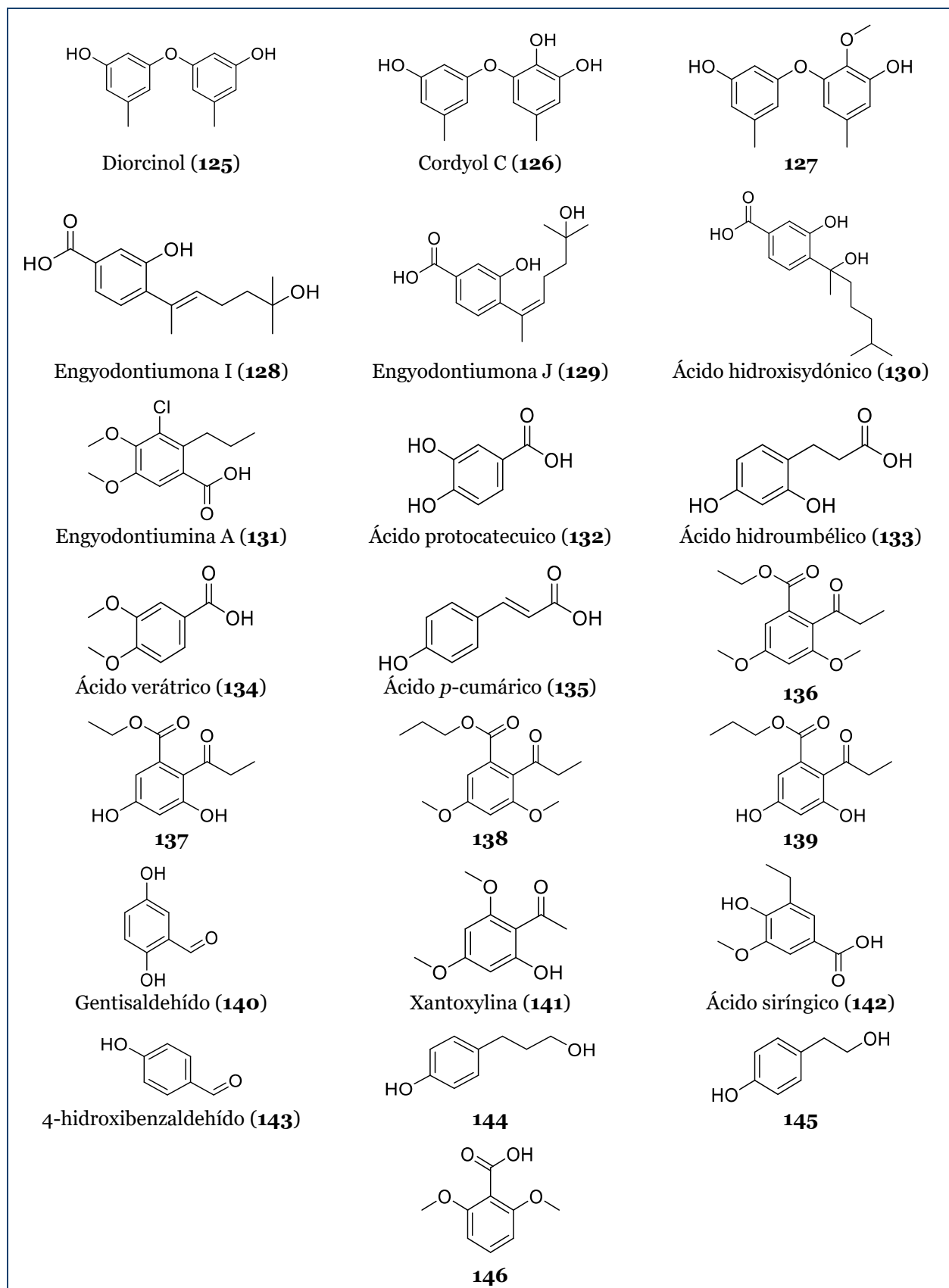
Este hongo ha sido poco estudiado químicamente, y contiene xantonas (**112-124**), derivados fenólicos (**125-146**), antraquinonas (**147-151**) y dímeros xantona-antraquinona (**152-159**).

De *P. album* se aislaron 8 xantonas nuevas las cuales fueron nombradas como engyodontiumonas A-H (**112-119**), junto con otras cinco previamente descritas (**120-124**). De estos compuestos, únicamente **119** y **124** presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares U937 (linfoma histiocítico humano), además de actividad antibacterial contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Por otro lado los compuestos **123** y **124** inhibieron el crecimiento de la larva *Balanus amphitrite* (Yao *et al.*, 2014).



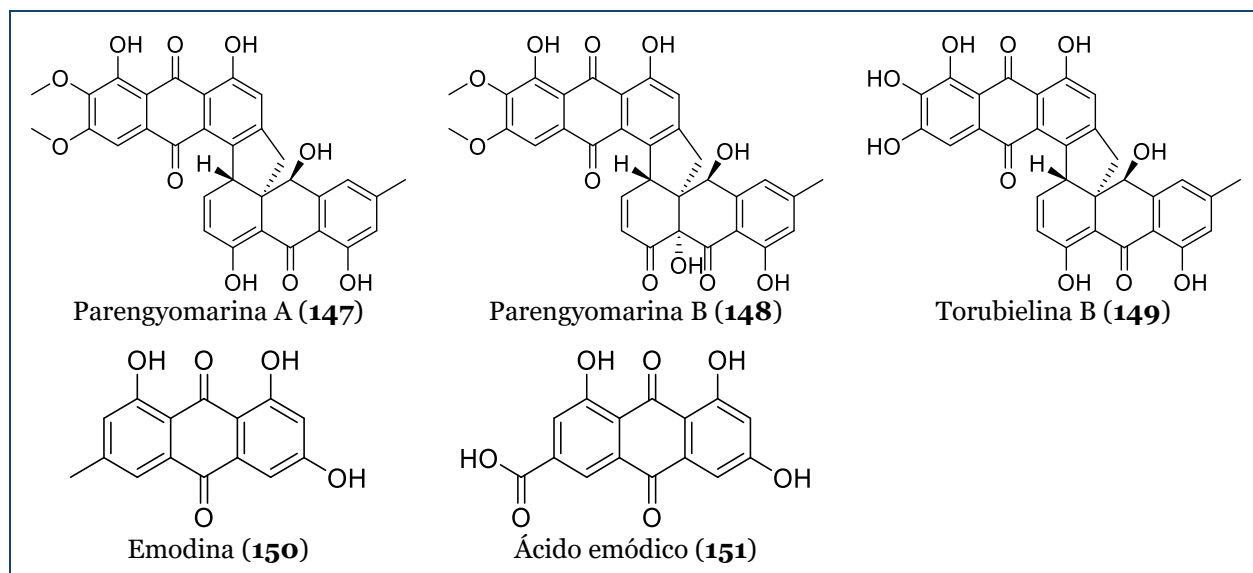
Cuadro 21. Xantonas aisladas de *P. album*.

Además de las xantonas descritas, en ese mismo estudio se aislaron los derivados fenólicos (**125-130**); particularmente el compuesto **126** presentó actividad frente a *Balanus amphitrite* (Yao *et al.*, 2014).

Cuadro 22. Derivados fenólicos obtenidos de *P. album*.

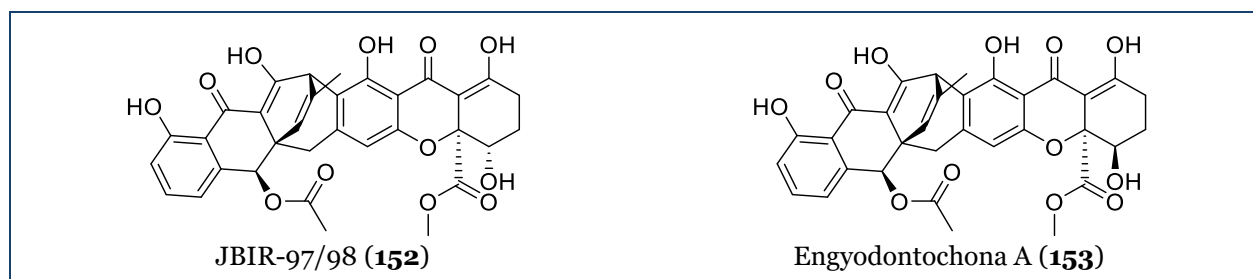
Otros derivados de ácidos fenólicos (**131-146**) han sido aislados de *P. album*, particularmente se han encontrado algunos compuestos con actividad antimicrobiana, por ejemplo, la engyodontiumina A (**131**) presentó actividad a moderada frente *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Vibrio vulnificus*, *Vibrio rotiferianus* y *Vibrio campbellii* (Wang *et al.*, 2017b); el compuesto **138** presentó actividad moderada en MRSA y el compuesto **139** en *Vibrio rotiferianus* (Wang *et al.*, 2017a).

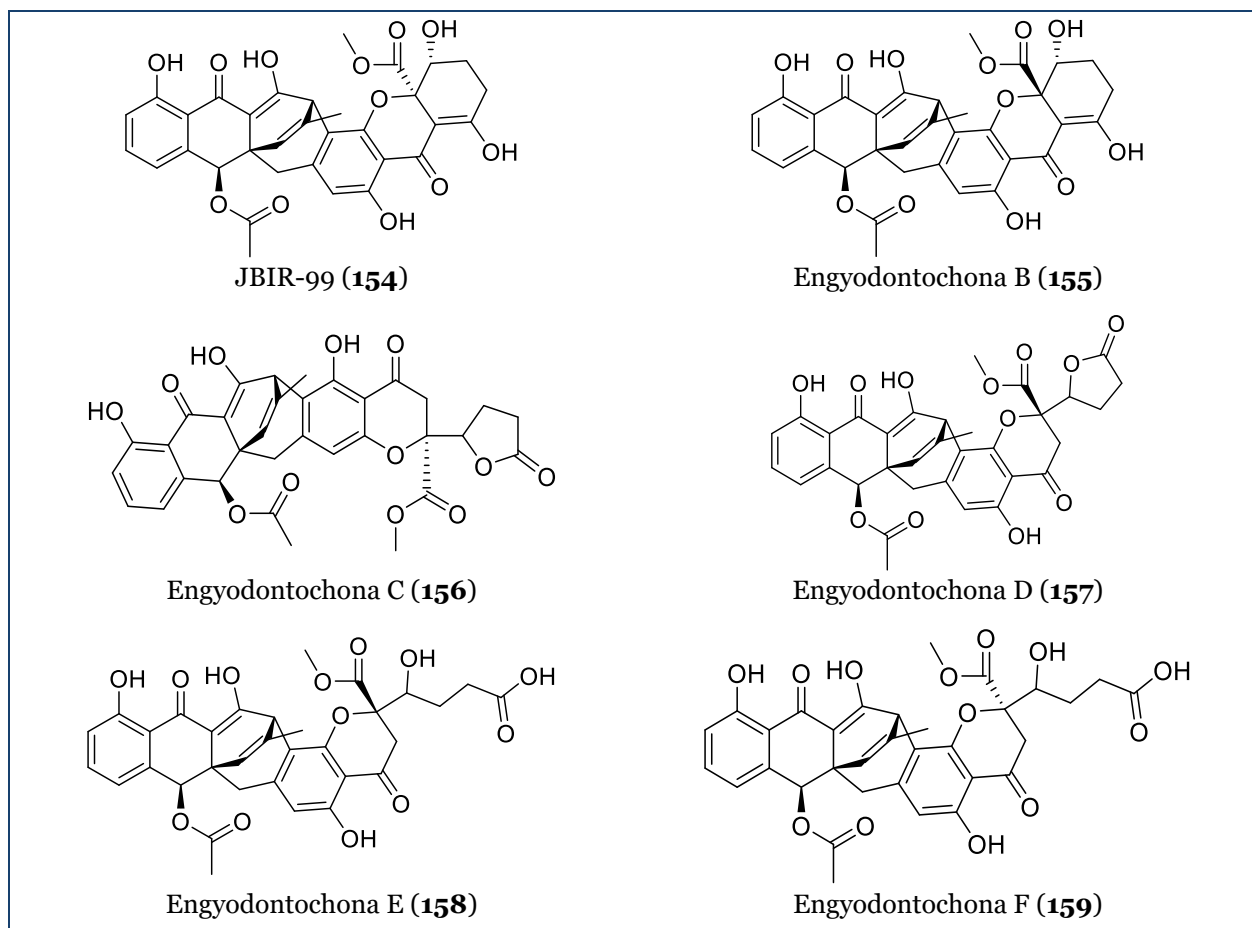
Otro grupo importante de metabolitos aislados de esta especie son antraquinonas, como la torubielina (**147-148**) y la torubielina B (**149**), dímeros modificados, además de las antraquinonas emodina (**150**) y el ácido emódico (**151**). Los tres compuestos tipo torubielina presentaron buena actividad antibacteriana frente a MRSA (Liu *et al.*, 2021).



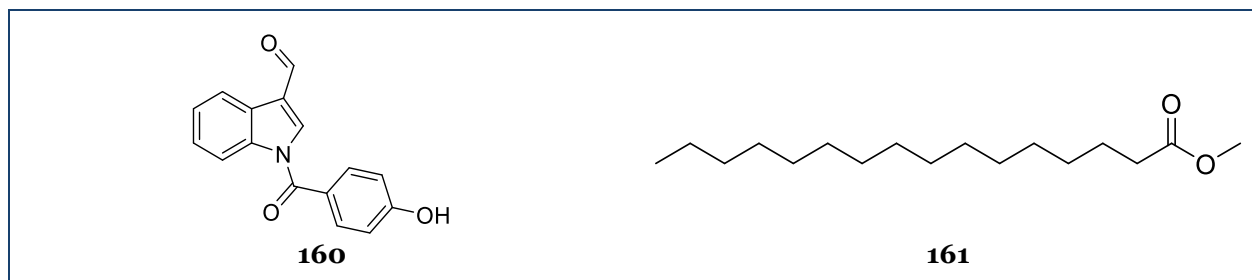
Cuadro 23. Antraquinonas aisladas de *P. album*.

Parengyodontium album también biosintetiza dímeros de xantonas-antraquinonas unidos mediante un puente [3,2,2]-biciclonoano, las engyodontoconas A-E (**153**, **155-159**), además de los compuestos **152** y **154**, que presentan el mismo núcleo y se aislaron previamente de *Tritirachium* sp. SpBo81112MEf2 (Ueda *et al.*, 2010). Los metabolitos **152-155** presentaron buena actividad como antibacterianos frente a MRSA (Wu *et al.*, 2016).



Cuadro 24. Dímeros xantona-antraquinona obtenidos de *P. album*.

Finalmente, otros compuestos aislados de esta especie son un alcaloide indólico llamado 1-(4-hidroxibenzoil) indol-3-carbaldehído (**160**) (Meng *et al.*, 2016) y el metil palmitato (**161**) (Wang *et al.*, 2017a).

Cuadro 25. Otros metabolitos producidos por *P. album*.

II. Justificación

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, existen 537 millones de personas con esta enfermedad a nivel mundial. Además, la diabetes fue responsable de la muerte de 6.7 millones de personas en el 2021. La diabetes tipo 2 (DT2) es la causante del 95% de estos casos y además de ser un problema de salud serio tiene un alto impacto económico, a nivel mundial el gasto sanitario empleado en diabetes fue de 966 mil millones de dólares (IDF, 2021).

México no está exento de esta situación ya que ocupa el séptimo lugar en países con mayor prevalencia de DT2, al contar con 14.1 millones de personas enfermas y de acuerdo con los datos estadísticos más recientes, es la tercera causa de muerte con 99 mil personas fallecidas en el 2020 (INEGI, 2021a; IDF, 2021)

El tratamiento de la DT2 tiene como propósito controlar la hiperglicemia crónica, mantener el control metabólico, y prevenir las complicaciones agudas y crónicas (NOM-015-SSA2-2010). Lo más común es seguir una dieta baja en carbohidratos, hacer ejercicio regularmente y complementar con fármacos orales que controlen la hiperglucemia. Los más utilizados son las sulfonilureas y la metformina. Otros fármacos incluyen a las tiazolidinedionas, la insulina, los análogos del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y los inhibidores de las enzimas dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), y del cotransportador de glucosa y sodio de tipo 2 (SGLT-2). Lo más conveniente para el tratamiento de la enfermedad es la combinación de dos o más de estas terapias (Umpierrez *et al.*, 2018).

Los inhibidores de α -glucosidasas inhiben la hiperglucemia posprandial y muchas complicaciones de la diabetes. En los algoritmos actuales para el tratamiento de la DT2 los inhibidores de α -glucosidasas no tienen una posición clara *per se* debido al costo-beneficio. Sin embargo, estos productos en combinación con los hipoglucemiantes orales antes mencionados o la insulina, sobre todo en aquellas regiones donde la ingesta de carbohidratos es muy alta, como es el caso de México (Joshi *et al.*, 2015; Umpierrez *et al.*, 2018) han resultado muy exitosos. Varios estudios clínicos han demostrado que la combinación de estos productos con otros agentes como la metformina y las glitazonas, disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares en pacientes diabéticos (Derosa & Maffioli, 2012; Chan *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2020; Garber *et al.*, 2020), y el uso a largo plazo de estos inhibidores reduce el 0.7-0.8% de la hemoglobina glucosilada (HbA1c), en particular el miglitol (Upadhyay *et al.*, 2018; Ghani, 2015). Recientemente BTI-320 (PAZ320) se desarrolló como un nuevo producto inhibidor de las α -glucosidasas, lo cual revela el interés por la continua búsqueda de este tipo de fármacos (Dahlén *et al.*, 2022).

Por otro lado, la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) es una enzima que actúa como regulador negativo del receptor de insulina, la sobreexpresión de PTP-1B promueve resistencia a la insulina en hígado, músculo, tejido adiposo, páncreas y cerebro. Es considerada como uno de los blancos terapéuticos más prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos. Por ello es necesario intensificar la búsqueda de agentes que regulen negativamente a esta proteína, para mejorar la sensibilización de los tejidos a la insulina y normalizar los niveles de glucosa en sangre (Kerru *et al.*, 2018; Genovese *et al.*, 2021).

Entonces, la alta incidencia de diabetes a nivel global, así como el costo y los efectos adversos de los de los inhibidores de uso actual justifican la búsqueda de nuevos fármacos antidiabéticos con estos blancos de acción. En este contexto nace el presente proyecto de investigación, el cual está enfocado en la búsqueda de prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y PTP-1B a partir de cuatro especies de Ascomicetos: *M. dendritica*, *M. flocciformis*, *M. arcuata* y ACA-14.

El género *Malbranchea* biosintetiza una gran diversidad de metabolitos secundarios biodinámicos, por ejemplo, *M. flavorosea* produce policétidos y péptidos con propiedades inhibitorias de α -glucosidasas evaluadas *in vivo* e *in vitro* (Verastegui-Omaña *et al.*, 2017; Rebollar-Ramos *et al.*, 2018). *M. circinata* produce péptidos, antraquinonas glucosiladas y tetralonas con actividad inhibitoria frente a las enzimas α -glucosidasas y PTP-1B (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020). Finalmente, *M. albolutea* biosintetiza derivados de ardeeminas con efectos inhibitorios frente a la enzima PTP-1B (Díaz-Rojas *et al.*, 2021).

III. Hipótesis

El criterio de preselección quimiotaxonómico en conjunto con una serie de evaluaciones enzimáticas preliminares sugieren la presencia de inhibidores de α -glucosidasas y PTP-1B en ACA-14, *M. dendritica*, *M. flocciformis* y *M. arcuata*.

IV. Objetivos

Objetivo General

Descubrir nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y PTP-1B de utilidad potencial para el desarrollo de fármacos antidiabéticos a partir de al menos dos especies de *Malbranchea* y ACA-14 obtenidas de diferentes sustratos.

Objetivos Particulares

- Obtener los microorganismos a partir de diferentes sustratos. Parte de esta actividad estuvo a cargo de la Dra. María del Carmen González del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cultivar en pequeña escala los microorganismos fúngicos utilizando diferentes condiciones de cultivo (medios, temperatura, co-cultivos, etc.) seleccionados de la literatura especializada, con la finalidad de elegir las especies y condiciones más adecuadas para la obtención de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y PTP-1B. Para ello se considerará la mejor actividad observada mediante ensayos enzimáticos utilizando α -glucosidasas provenientes de raspado intestinal de rata y *Saccharomyces cerevisiae*, así como de un enzima recombinante PTP-1B.
- Cultivar en mediana escala las especies seleccionadas con la finalidad de obtener los productos naturales bioactivos mediante la aplicación de procedimientos convencionales.
- Elucidar la estructura química de los compuestos activos aplicando diversas técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Es altamente probable que el cumplimiento de este objetivo conduzca a la obtención de esqueletos novedosos que pueden constituir un punto de partida valioso para el desarrollo de nuevos prototipos estructurales con actividad antidiabética.
- Evaluar la interacción de los principios activos puros con las α -glucosidasas y PTP-1B utilizando ensayos enzimáticos.
- Realizar estudios de acoplamiento y dinámica molecular para predecir el sitio de interacción de los principios activos y el comportamiento o evolución de la interacción con las enzimas a través del tiempo.

- Comprobar *in vivo* el efecto de inhibición de las α -glucosidasas mediante pruebas de tolerancia a la sacarosa.
- Realizar experimentos *in vivo* que apoyen la inhibición de compuestos selectos contra la PTP-1B.
- Predecir *in silico* la similitud a fármacos de los compuestos obtenidos utilizando programas de libre acceso como SwisADME y Osiris Property Explorer.

V. Metodología Experimental

1. Procedimientos cromatográficos generales

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítico o preparativo, se realizaron en placas de aluminio o vidrio (0.25 mm de grosor) de \times 20 cm recubiertas con gel de sílice 60 F254 (Merck).

La cromatografía en columna tipo “flash” se realizó en un cromatógrafo Teledyne ISCO CombiFlashRf+Lumen equipado con dos detectores, uno de arreglo de fotodiodos (PDA) y otro evaporativo de dispersión de luz (ELSD); como fase estacionaria se utilizó sílice RediSepRf high performance GOLD y como fase móvil diferentes mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad entre Hex-CHCl₃-MeOH.

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron utilizando como fases estacionarias gel de sílice 60 (Merck) [Hex-AcOEt-CHCl₃-MeOH-Acetona], Sephadex LH-20 [CH₂Cl₂-MeOH] o gel de sílice C-18 (fase reversa) [H₂O-MeCN].

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp.) equipado con una bomba 2535, un detector PDA 2998 y un recolector de fracciones automático, empleando una columna XBridge Shield RP C18 (tamaño de partícula: 5 μ m; 19.0 \times 250 mm) o Gemini C18 110Å (tamaño de partícula: 5 μ m; 10 \times 250 mm). La elución se realizó en un sistema gradiente con una mezcla binaria constituida por MeCN (A) y H₂O (B; 0.1% ácido fórmico) y diferentes gradientes de elución, y un flujo de 17.06 mL/min o 4.72 mL/min, respectivamente. También se utilizó un método con mezclas binarias constituidas por MeOH (A) y H₂O (B; 0.1% ácido fórmico) y diferentes gradientes de elución, con un flujo de 3.78 mL/min. Las longitudes de onda (λ) utilizadas para la detección de los compuestos fueron 254 y 365 nm.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un equipo Agilent G3171A (Agilent Technology) equipado con un detector de masas (LECO-TOF). Todos los análisis se realizaron en una columna capilar 5% fenilmetilsilicona (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), utilizando un flujo de 0.5 mL/min He, la temperatura del inyector fue de 300 °C, la temperatura inicial del horno 70 °C (2 min, isoterma), rampa: 15°C/min, temperatura final del horno 300 °C, isoterma final 10 min.

2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros en el IR se obtuvieron por la técnica de reflectancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400. Los análisis por espectrometría de masas de baja resolución se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia Acquity UPLC-H Class® marca Waters equipado con un detector PDA acoplado a un detector de masas SQD2 utilizando la técnica de ionización por electrospray (UPLC-EM-ESI) en los modos positivo (ESI⁺) y negativo (ESI⁻). Las muestras se analizaron por inyección directa o mediante el sistema cromatográfico utilizando una columna Acquity® BEH C18 (1.7 μm ; 2.1 \times 100 mm), y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN (**A**) y H₂O (**B**; 0.1% ácido fórmico) en un gradiente de elución lineal: 0 min 15% **A**; 8 min 100% **A**; 10 min 100% **A**; 10.5 min 15% **A**; flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 mL. Las condiciones de análisis del detector SQD2 fueron las siguientes: voltaje capilar: 2.5 kV positivo (ESI⁺) y 2.0 kV negativo (ESI⁻); voltaje cono: 30 V; temperatura de solvatación: 400°C; gas de solvatación: nitrógeno (N₂) 650 L/h; gas cono: 10 L/h; PDA: 200-400 nm con una resolución de 4 nm. El control del equipo, adquisición y procesamiento de los datos se realizaron utilizando el programa MassLynx 3.0 (Waters Corp.).

Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Anton-Paar o Perkin Elmer 343 a 20°C en MeOH y a la longitud de onda de la línea D-sodio ($\lambda=589$ nm). Los espectros de dicroísmo circular electrónico se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-810 en MeOH. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Esperanza Carcache de Blanco, Colegio de Farmacia, de la Universidad Estatal de Ohio en Columbus, o en el Instituto de Química, UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono se registraron en distintos equipos con diferentes resoluciones, se utilizaron los equipos Bruker AVANCE III HD (700 MHz), JEOL ECZ600R (600 MHz), Bruker AVANCE III (400 MHz) y Varian VNMRS (400 MHz) con CD₃OD, CDCl₃ o DMSO-*d*₆ como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

Los análisis de difracción de rayos X se realizó a 296 K en un equipo Bruker, modelo Smart Apex o D8 Venture, equipado con radiación de Mo ($\lambda=0.71073$ Å) o de Cu K α ($\lambda=1.54,178$ Å) a 296K.

3. Obtención del material fúngico

3.1 ACA-14

El cultivo axénico del hongo designado con la clave interna ACA-14 fue obtenido a partir de una muestra de arena recolectada en la Playa Tlacopanocha, en la bahía de Acapulco, Guerrero, México (N16°50'42" y W99°54'26") por la Dra. María del Carmen González del Instituto de Biología de la UNAM. Un cultivo de referencia fue depositado en la colección de hongos del Herbario Nacional de México (MEXU), Instituto de Biología, UNAM, identificado con el número MEXU 30054. *A priori* sin evidencias moleculares se indicó que este hongo era del género *Malbranchea* (Figura 12), por lo cual fue incluido en el presente estudio.

3.2 *Malbranchea dendritica*, *M. flocciformis* y *M. arcuata*

Las especies fúngicas, *M. dendritica*, *M. flocciformis* y *M. arcuata* (Figura 12) fueron adquiridas en la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés) con los números de catálogo 34527, 34530 y 34523, respectivamente.

Cada microorganismo fue activado individualmente siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Brevemente, las esporas liofilizadas se activaron adicionando 1 mL de agua estéril desionizada y una posterior incubación a temperatura ambiente durante una noche. Enseguida, la suspensión homogénea fue sembrada en cajas Petri con medio agar papa-dextrosa (APD) para su conservación y resiembra posteriores.

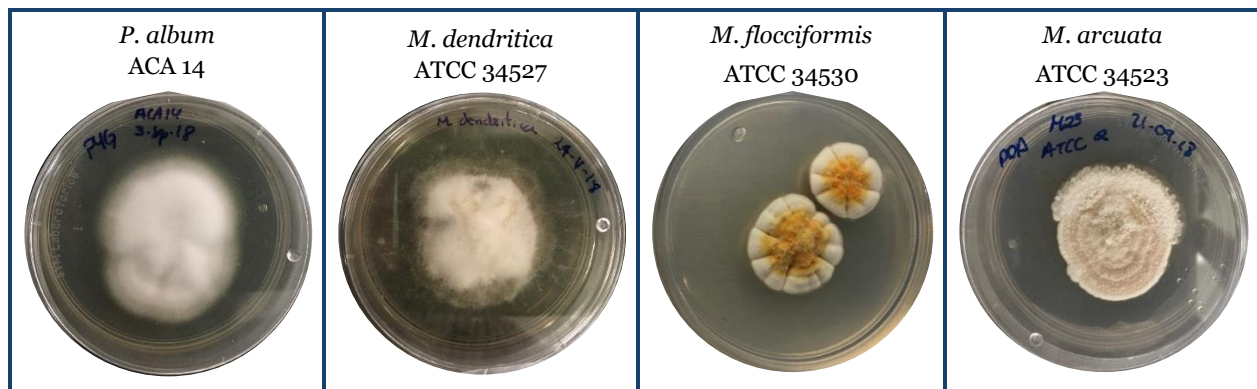


Figura 12. Especies fúngicas objeto de estudio. A) ACA 14; B) *M. dendritica* (ATCC 34527), C) *M. flocciformis* (ATCC 34530), y D) *M. arcuata* (ATCC 34523).

3.3 Identificación taxonómica de los hongos objeto de estudio

Los estudios de identificación molecular de los hongos se realizaron en colaboración con el Dr. Huzefa A. Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE. UU. Para realizar esta identificación se secuenció el espaciador transcrito interno (ITS, por

sus siglas en inglés), que es la región espaciadora de los genes que codifican las dos subunidades ribosomales de los hongos.

En primer lugar, se realizó la amplificación del ADN y su secuenciación utilizando el método descrito por Sanger. Posteriormente se realizó un análisis comparativo BLAST de las secuencias obtenidas con aquellas descritas en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y se realizó un análisis de máxima verosimilitud (maximum likelihood) con un IQ-Tree para la construcción del árbol filogenético de los hongos estudiados (Raja *et al.*, 2017).

Los datos de la secuenciación de las especies fúngicas fueron depositados en la base de datos GenBank del NCBI, con los números de acceso MZ486089 para *M. dendritica* y OP256775 y OP256776, para la especie *M. flocciformis*.

Finalmente, la identidad taxonómica del hongo ACA-14, se estableció como la especie *P. album*. Esta especie anteriormente descrita como perteneciente al género *Engyodontium*, ha sido clasificada recientemente dentro del género *Parengyodontium*, con base en diferentes estudios filogenéticos y quimiotaxonómicos descritos en la literatura (Tsang *et al.*, 2016).

4. Condiciones de cultivo de los hongos, obtención y fraccionamiento de los extractos orgánicos

4.1 *Parengyodontium album*

El hongo ACA-14, *P. album*, fue cultivado en medio semisólido de arroz (400 g × 800 mL de agua) durante 30 días.

4.1.1 Preparación del extracto orgánico ACA-14

Al término de la incubación, se preparó el extracto orgánico mediante la técnica de maceración utilizando 1.0 L de una mezcla de disolventes de CHCl₃-MeOH (8:2). La mezcla anterior se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. Al cabo del proceso de extracción, el extracto resultante se filtró y concentró a sequedad. El extracto orgánico resultante (EOPA, 800 mg) fue resuspendido con 50 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y sometido a un proceso de reparto con hexano (3 × 50 mL).

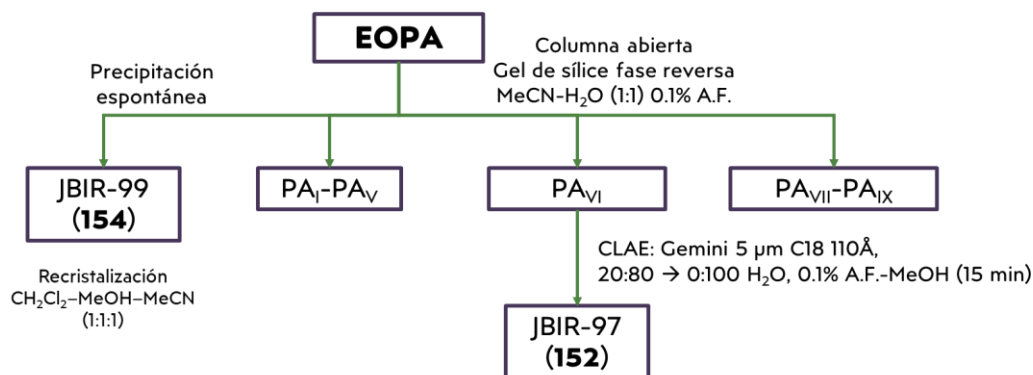
4.1.2 Fraccionamiento del extracto orgánico EOPA

4.1.2.1 Aislamiento del compuesto JBIR-99 (154)

A partir del extracto orgánico desgrasado precipitaron de manera espontánea 400 mg del compuesto JBIR-99 (**154**) como un sólido amarillo (p.f. 227-229°C).

4.1.2.2 Aislamiento del compuesto JBIR-97 (152)

El remanente del extracto orgánico desgrasado (300 mg) se fraccionó mediante una columna abierta de gel sílice C18 [20g; H₂O-MeCN]. Este proceso cromatográfico (Esquema 3) generó un conjunto de nueve fracciones primarias (PA_I-PA_{IX}).



Esquema 3. Resumen del fraccionamiento del extracto orgánico de *P. album*.

La resolución cromatográfica por CLAE de la fracción PVI (Esquema 3), permitió el aislamiento y la purificación del compuesto JBIR-97 (**152**) (2 mg; $t_R = 7.8$ min). [Columna: Gemini C18 110 Å (5μm; 10 × 250 mm); Fase móvil: gradiente de 80:20 MeOH (A)-H₂O (B; 0.1% A.F.) a 100% MeOH (A) en 15 minutos; Flujo: 3.78 mL/min.

4.2 *Malbranchea dendritica*

La especie fúngica fue cultivada en dos medios diferentes: caldo papa-dextrosa (CPD) y medio semisólido de cebada. Así, en primer lugar, se realizaron los cultivos axénicos del microorganismo, resembrando en cajas de Petri con medio APD que se dejaron en crecimiento durante dos semanas. Posteriormente, se realizó la preparación de los inóculos primarios en medio líquido CPD (100 mL) que se mantuvieron en agitación durante siete días. Finalmente, estos preinóculos fueron utilizados para la realización de la preparación de los cultivos en medio escala en los medios CPD (6 litros) y de cebada (100 g/200 mL de H₂O).

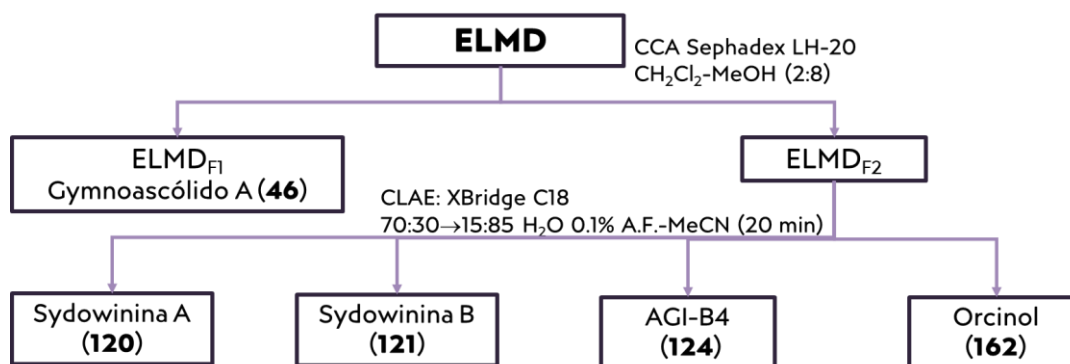
4.2.1 Preparación del extracto orgánico ELMD

El cultivo en medio CPD se realizó en condiciones estáticas durante 4 semanas. Al término de este tiempo, el medio fue inactivado adicionando 600 mL de MeOH y posteriormente sometido a un proceso de reparto con CHCl₃-MeOH (8:2; 3 × 600 mL). Las fases orgánicas obtenidas fueron reunidas, secadas sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida. Posteriormente, el extracto resultante fue resuspendido en 100 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y sometido a un proceso de partición con hexano (6 x 100 mL) con la finalidad de

remover las grasas provenientes del medio de cultivo. La fracción de MeCN-MeOH (1:1) resultante fue concentrada *in vacuo*, obteniéndose 200 mg de un residuo café oscuro y se identificó como el extracto desgrasado del medio líquido de *M. dendritica* (ELMD).

4.2.2 Fraccionamiento del extracto orgánico ELMD

El extracto ELMD se fraccionó mediante una CCA de Sephadex LH-20 [CH_2Cl_2 -MeOH (2:8)], del cual se obtuvieron dos fracciones principales ELMD_{F1} y ELMD_{F2} (Esquema 4).



Esquema 4. Fraccionamiento del extracto ELMD.

4.2.2.1 Aislamiento del compuesto gymnoascólido A (46)

De la fracción primaria F1, precipitaron de forma espontánea 60 mg del compuesto gymnoascólido A (46) como un sólido blanco.

4.2.2.2 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en la fracción ELMD_{F2}

Con la finalidad de obtener los principios mayoritarios presentes en la fracción primaria ELMD_{F2} (60 mg), se realizó una separación mediante CLAE. El cromatograma resultante se ilustra en la Figura 13, y como se puede observar, la fracción contenía cuatro picos principales, identificados como AGI-B4 (124, 2.0 mg, $t_{\text{R}} = 5.5$ min), sydowinina (121, 4 mg, $t_{\text{R}} = 8.5$ min), sydowinina A (120, 1 mg, $t_{\text{R}} = 11.0$ min) y orcinol (162, 2 mg, $t_{\text{R}} = 13.5$ min).

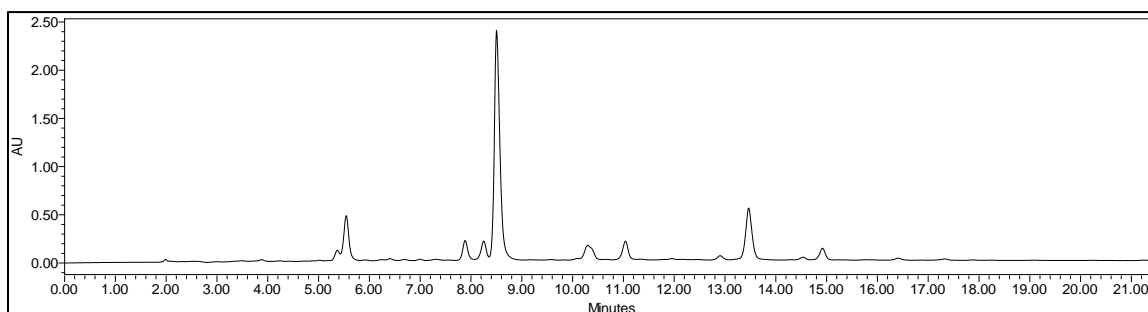


Figura 13. Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción ELMD_{F2} . Condiciones de análisis: Columna XBridge Shield RP C18; Fase móvil: gradiente de elución MeCN (A)-H₂O (B; 0.1% ácido fórmico) 30:70 a 85% A en 20 minutos; Flujo: 17.06 mL/min; Detector UV/visible, $\lambda = 254$ y 365 nm.

4.2.3 Preparación del extracto orgánico ESMD

El medio de cultivo sólido de cebada se dejó fermentar durante 28 días, posteriormente se preparó el extracto orgánico a partir del medio de cultivo mediante la técnica de maceración utilizando AcOEt como disolvente.

4.2.4 Fraccionamiento del extracto orgánico ESMD

El extracto soluble de AcOEt se concentró *in vacuo*, obteniéndose 1.4 g de extracto. Enseguida, el extracto resultante fue desgrasado siguiendo la misma estrategia indicada en el inciso 4.2.1 de esta sección experimental, obteniéndose 900 mg del extracto desgrasado ESMD (Esquema 5).

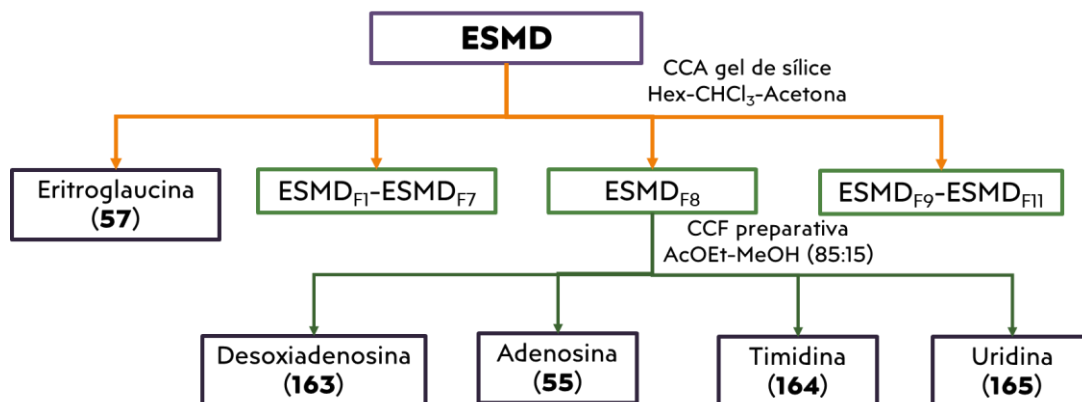
4.2.4.1 Aislamiento del compuesto eritroglaucina (57)

Durante el proceso de reparto con hexano, del extracto orgánico ESMD precipitaron de forma espontánea 11 mg del producto eritroglaucina (57) como un sólido rojo.

4.2.4.2 Aislamiento y purificación de los compuestos desoxiadenosina (163), adenosina (55), timidina (164) y uridina (165)

El extracto ESMD (900 mg, Esquema 5) fue fraccionado mediante una CCA utilizando gel de sílice desactivada al 10% con un gradiente en orden creciente de polaridad entre mezclas de hexano-CHCl₃-acetona. Este proceso cromatográfico permitió la obtención de un conjunto de 11 fracciones primarias (ESMD_{F1}-ESMD_{F11}).

El aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la fracción ESMD_{F8} se realizó mediante una CCF [30 mg, AcOEt-MeOH (85:15)]. Este proceso permitió la obtención de 2 mg de desoxiadenosina (163), 1.5 mg de adenosina (55), 3 mg de timidina (164, 3 mg) y 1.5 mg de uridina (165).



Esquema 5. Fraccionamiento del extracto ESMD.

4.3 *Malbranchea flocciformis*

El hongo *M. flocciformis* fue cultivado en medio líquido CPD (6 L) enriquecido con nicotinamida (NA, 50 μ M). La NA es un inhibidor de las desacetilasas de histonas dependientes de NAD⁺, por lo que su uso induce modificaciones epigenéticas que activan genes que en condiciones normales se encuentran silenciados (Asai *et al.*, 2016).

4.3.1 Preparación del extracto orgánico de *M. flocciformis*

Los medios de cultivo de CPD (dos matraces de 6 L) se dejaron en agitación constante (100 rpm) durante 2 semanas. Al término de este tiempo fueron extraídos exhaustivamente mediante un proceso de reparto utilizando AcOEt como disolvente. El extracto de AcOEt obtenido (2.0 g) fue desgrasado siguiendo la misma metodología que en el inciso 4.2.1 y posteriormente concentrado *in vacuo*, obteniéndose 850 mg de extracto desgrasado (EOMF).

4.3.2 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto de AcOEt se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna tipo flash (Figura 14) utilizando gel de sílice como fase estacionaria (24 g) y un gradiente creciente de polaridad entre Hex-CHCl₃-MeOH. Este proceso cromatográfico permitió la obtención de un conjunto de 10 fracciones primarias y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Gradiente de polaridad utilizado en el fraccionamiento primario del extracto de *M. flocciformis*.

Duración (CV)	% Disolvente B	Disolvente A	Disolvente B	Fracciones/Rendimiento
0.0	100.0	CHCl ₃	Hexano	MF _{F1} [1-27] 40 mg
6.0	0.0	CHCl ₃	Hexano	MF _{F2} [28-40] 200 mg
3.0	0.0	CHCl ₃	Hexano	MF _{F3} [41-57] 30 mg
3.0	0.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F4} [58-61] 50 mg
4.0	2.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F5} [62-65] 40 mg
4.0	4.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F6} [66-69] 40 mg
8.0	10.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F7} [70-76] 30 mg
8.0	20.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F8} [77-88] 120 mg
2.0	100.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F9} [89-112] 300 mg
2.0	100.0	CHCl ₃	MeOH	MF _{F10} [113-117] 60 mg

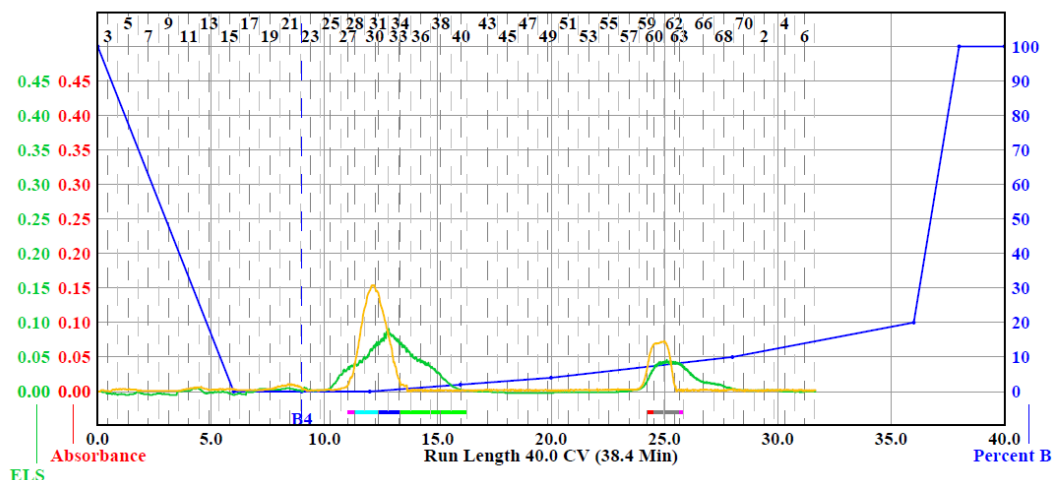


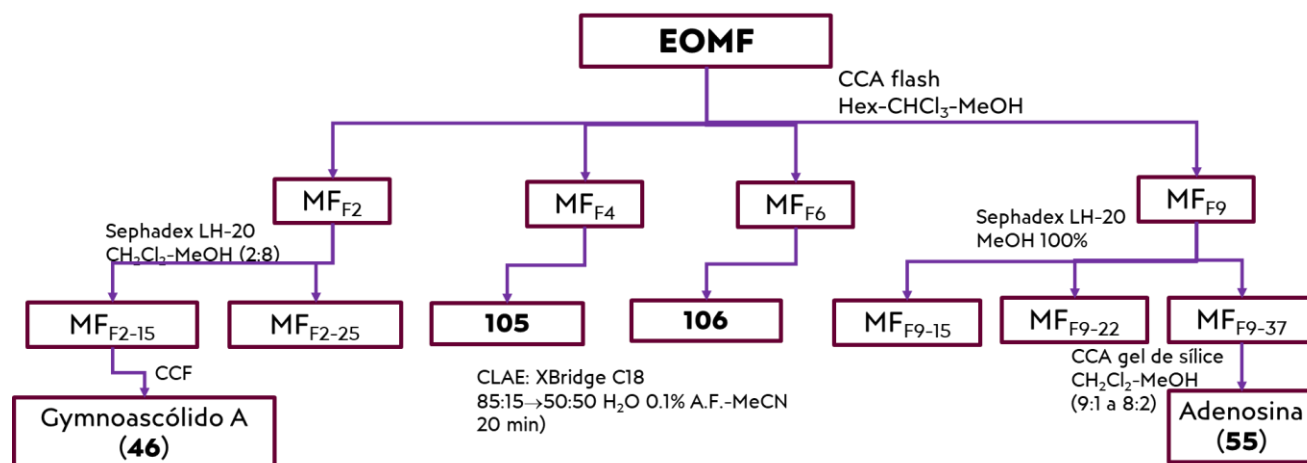
Figura 14. Cromatograma obtenido del fraccionamiento en columna flash del extracto orgánico desgrasado de *M. flocciformis*.

4.3.2.1 Aislamiento y purificación de los compuestos gymnoascólido A (**46**), trímero de ácido antranílico (**105**), el trímero de ácido antranílico hidroxilado (**106**) y adenosina (**55**)

La resolución cromatográfica de la fracción MF_{F2} (200 mg) mediante una columna de Sephadex LH-20 [50 mL; CH₂Cl₂-MeOH (2:8)], permitió la obtención de dos conjuntos de fracciones de interés, la MF_{F2-25} (8 mg) y MF_{F2-15} (80 mg). El análisis por CCF de la fracción MF_{F2-15} permitió identificar al compuesto mayoritario presente en esta muestra como gymnoascólido A (**46**) aislado previamente *M. dendritica*.

Por otra parte, el análisis por CLAE de las fracciones primarias MF_{F4} (50 mg) y MF_{F6} (40 mg) [XBridge C18; Fase móvil: gradiente de elución MeCN (A)- H₂O (B); 0.1% ácido fórmico) (85:15) a 50% A en 20 minutos; Flujo: 17.06 mL/min], condujo al aislamiento de 5 mg de un trímero de ácido antranílico (**105**) ($t_R = 12.09$ min) y 1 mg de un derivado hidroxilado del trímero de ácido antranílico (**106**) ($t_R = 15.37$ min), respectivamente.

Finalmente, 14 mg de adenosina (**55**) fueron aislados a partir de sucesivos fraccionamientos cromatográficos por columna de Sephadex LH-20 [MeOH; MF_{F9-15}, MF_{F9-22} y MF_{F9-37}] y de gel de sílice [40 mg; MF_{F9-37}, CH₂Cl₂-MeOH (9:1 a 8:2)] a partir de la fracción primaria MF_{F9} (300 mg) (Esquema 6).



Esquema 6. Fraccionamiento del extracto EOMF.

4.4 *Malbranchea arcuata*

El hongo *M. arcuata* fue cultivado en medio semisólido de arroz (15 g de arroz/ 30 mL de agua × matraz); la incubación se realizó temperatura ambiente durante 60 días. Este proceso se repitió en varias ocasiones hasta completar los 100 matraces.

4.4.1 Preparación del extracto orgánico de *M. arcuata*

Los medios de cultivo de arroz fermentados durante 60 días fueron extraídos exhaustivamente mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). Enseguida, el extracto orgánico obtenido fue desgrasado siguiendo la misma metodología que en el inciso 4.2.1 y posteriormente concentrado *in vacuo* obteniéndose 2 g de extracto (EOMA).

4.4.2 Fraccionamiento del extracto orgánico EOMA

El extracto orgánico de *M. arcuata* (EOMA, 2 g) fue fraccionado mediante una columna de gel de sílice (80 g) tipo flash (Figura 15), utilizando gel de sílice como fase estacionaria (80 g) y un gradiente creciente de polaridad entre Hex- CHCl_3 -MeOH. Este proceso cromatográfico permitió la obtención de un conjunto de 11 fracciones primarias y se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de polaridad empleado para el fraccionamiento primario del extracto de *M. arcuata*.

Duración (CV)	% Disolvente B	Disolvente A	Disolvente B	Fracciones/Rendimiento
0.0	100.0	CHCl_3	Hexano	MA_{F1} (1-30) 25 mg
2.0	50.0	CHCl_3	Hexano	MA_{F2} (31-42) 300 mg
2.0	30.0	CHCl_3	Hexano	MA_{F3} (43-50) 10 mg
2.0	15.0	CHCl_3	Hexano	MA_{F4} (51-102) 60 mg
2.0	0.0	CHCl_3	Hexano	MA_{F5} (103-106) 100 mg
4.0	0.0	CHCl_3	MeOH	MA_{F6} (107-118) 250 mg

5.0	5.0	CHCl ₃	MeOH	MA _{F7} (119-132) 130 mg
9.0	10.0	CHCl ₃	MeOH	MA _{F8} (133-146) 100 mg
9.0	20.0	CHCl ₃	MeOH	MA _{F9} (147-159) 80 mg
3.0	100.0	CHCl ₃	MeOH	MA _{F10} (160-164) 80 mg
2.0	100.0	CHCl ₃	MeOH	MA _{F11} (165-172) 350 mg

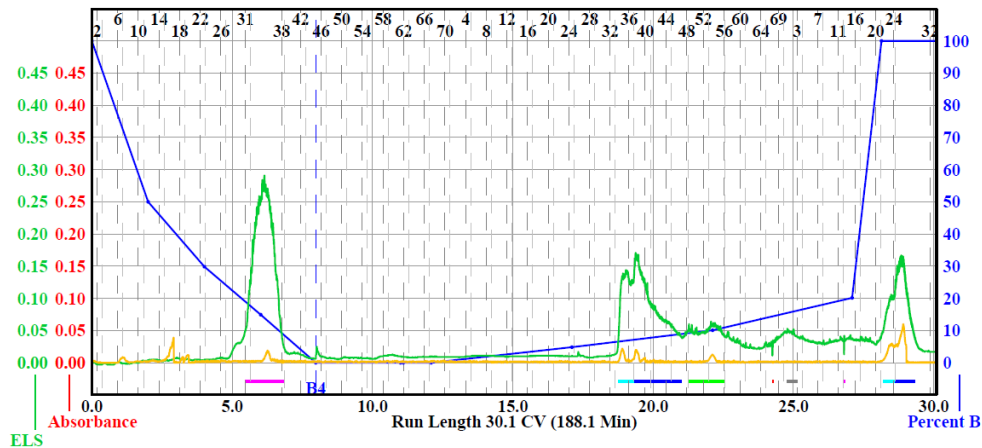
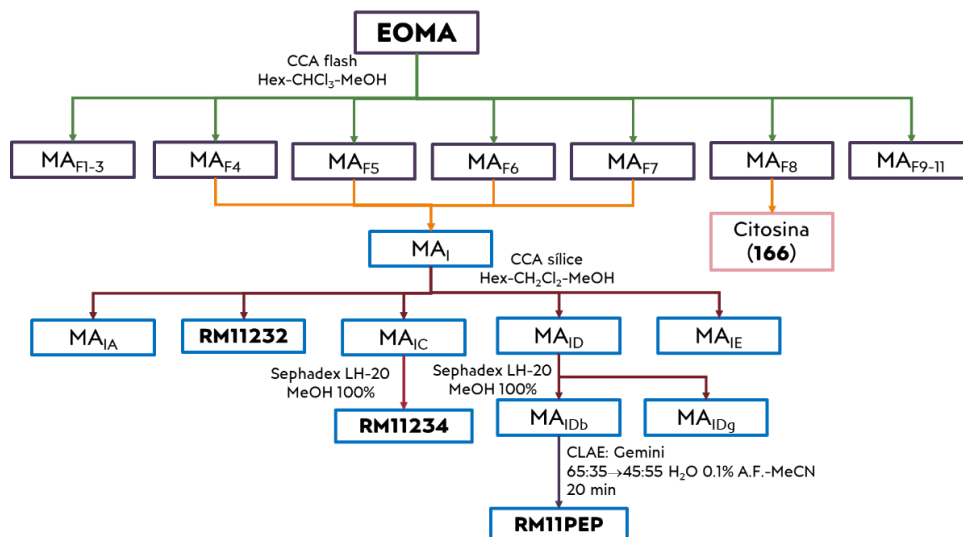


Figura 15. Cromatograma obtenido del fraccionamiento en columna flash del extracto orgánico desgrasado de *M. arcuata*.

4.4.2.1 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en *M. arcuata*

De acuerdo con la similitud cromatográfica presentada en las fracciones primarias MA_{F4} a MA_{F7}, estas fueron reunidas y designadas con la clave interna MA_I.

La fracción MA_I (500 mg) fue sometida a una CCA sobre gel de sílice desactivado al 10% (500 g) utilizando como fase móvil mezclas entre Hex-CH₂Cl₂-MeOH, este fraccionamiento generó un conjunto de 10 fracciones secundarias (Esquema 7).



Esquema 7. Fraccionamiento del extracto EOMA.

De este fraccionamiento se obtuvieron 15 fracciones, de las cuales la fracción secundaria MA_{IB} permitió el aislamiento de un compuesto (**RM11232**), sin embargo, este se descompone a temperatura ambiente y en exposición a la luz, por lo que no pudo ser caracterizado.

La fracción secundaria MA_{IC} fue fraccionada mediante una columna de Sephadex con una fase móvil 100% MeOH, de aquí se obtuvieron 4 fracciones, una de las cuales se identificó como el compuesto **RM11234**.

Finalmente, la fracción secundaria MA_{ID} fue fraccionada mediante una columna de Sephadex en 100% MeOH, de este fraccionamiento se obtuvieron cuatro fracciones, una de ellas designada como MA_{IDb} fue separada mediante CLAE utilizando una columna Gemini C18 semipreparativa, una fase móvil de 65:35 H₂O 0.1% A.F.-MeCN en gradiente a 45:55 H₂O 0.1% A.F.-MeCN en 20 minutos, con un flujo de 4.72 mL/min. De este fraccionamiento se obtuvo un compuesto **RM11PEP** (1.5 mg, t_R= 12.46 min).

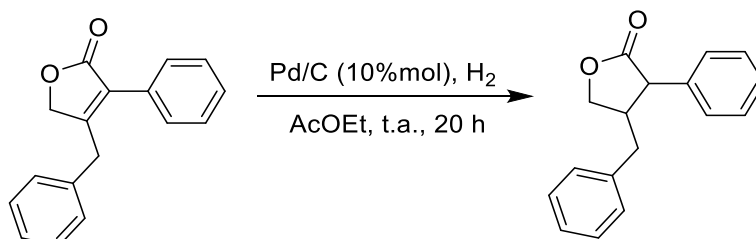
4.4.2.2 Aislamiento de la citosina (166)

A partir de la fracción primaria MA_{F8} precipitaron de forma espontánea 30 mg del producto identificado como la citosina (**166**) purificada mediante sucesivos lavados con MeOH, como un sólido blanco.

5. Síntesis de los compuestos

5.1 Reducción del compuesto gymnoascólido A (46)

La reducción del compuesto **46** se realizó siguiendo la metodología descrita por Deangelis y colaboradores (2012). Brevemente, en un matraz bola de 10 mL se adicionaron 0.17 mmol del compuesto **46**, 1 mL de AcOEt y Pd/C (10 % mol) en atmósfera de hidrógeno. Esta mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 20 horas (Esquema 8). Al término de este tiempo, la atmósfera de hidrógeno fue evacuada y se colocó argón para el transporte del matraz de reacción, posteriormente la mezcla de reacción fue filtrada y lavada exhaustivamente con acetato de etilo para la desadsorción del carbono utilizado (Pd/C).

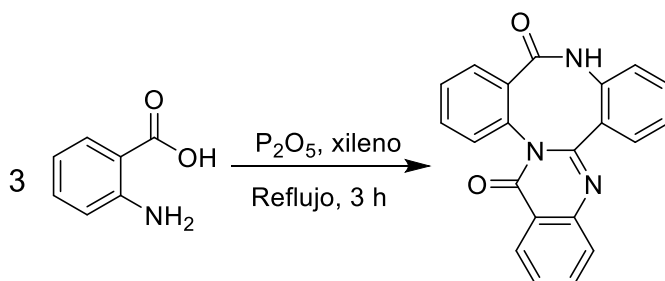


Esquema 8. Síntesis del compuesto **167**.

El producto de la reacción libre de carbono fue concentrado *in vacuo*, obteniéndose 34 mg. El compuesto reducido del gymnoascólido A (**167**) fue purificado mediante una columna de gel de sílice desactivada al 5%, utilizando como fase móvil Hex-CH₂Cl₂ (1:9), este proceso permitió la purificación de 29 mg del compuesto puro.

5.2 Síntesis del compuesto 105

La síntesis total del trímero de ácido antranílico (**105**) se realizó empleando la metodología descrita por Chatterjee y Ganguly (1968) (Esquema 9). Para ello, en un matraz bola de 10 mL se colocaron 500 mg de ácido antranílico (**111**) y 1.5 g de P₂O₅ en xileno. La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 3 horas.

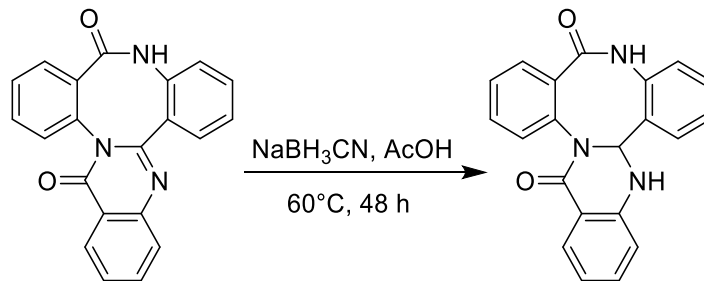


Esquema 9. Síntesis del compuesto **105**.

Al término de la reacción se adicionó hielo a la mezcla de reacción y se realizó un reparto con benceno (100 mL). Enseguida, la fase orgánica de benceno fue sometida a un proceso de reparto con HCl 6N (3 × 40 mL). La fase ácida fue neutralizada con NH₄OH y posteriormente se realizó un segundo proceso de reparto con CHCl₃. (3 × 100 mL). Las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas *in vacuo*. De esta fracción orgánica precipitó un sólido blanco, el cual fue lavado exhaustivamente con CHCl₃, obteniéndose 200 mg de un compuesto idéntico en todas sus propiedades físicas y cromatográficas con aquellas descritas para el producto **105**.

5.3 Reducción del trímero de ácido antranílico (105)

La obtención del producto de reducción del compuesto **105** se realizó siguiendo la metodología descrita por Eguchi *et al.* (1992) que involucra la reducción de los grupos imina presentes en un tetrámero de ácido antranílico. Para ello, en un matraz bola de 50 mL, se colocaron 0.15 mmol de la materia prima (**105**) y 10 mL de ácido acético glacial, posteriormente se adicionaron 1.5 mmol NaBH₃CN en frío. La mezcla de reacción se dejó en agitación en atmósfera de N₂ a 60°C durante 48 horas. La reacción efectuada se muestra en el Esquema 10.



Esquema 10. Reducción de la imina del compuesto **105**.

Al término de este tiempo, la reacción fue detenida con hielo y se adicionó NaOH acuoso hasta neutralizar la mezcla. Posteriormente, la solución neutralizada fue sometida a un reparto con AcOEt (3×100 mL) y las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas *in vacuo*. La mezcla de reacción así obtenida fue purificada en una CCA sobre gel de sílice utilizando un gradiente de elución de CH_2Cl_2 a 97:3 CH_2Cl_2 -MeOH. Este proceso permitió la purificación de 20 mg del compuesto puro reducido del trímero de ácido antranílico (**168**).

6. Evaluaciones *in vitro* de los compuestos y/o extractos

6.1 Evaluación enzimática de las α -glucosidasas

Los extractos y compuestos fueron evaluados mediante un ensayo espectrofotométrico para establecer su actividad inhibitoria contra la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020). Esta evaluación se realizó en una placa de 96 pozos y las lecturas se tomaron con un lector de placas iMark (BioRad) a una longitud de onda de 415 nm.

Para la evaluación, se prepararon diferentes soluciones de los extractos, el control positivo (acarbose) y los compuestos a ensayar en buffer de fosfatos (100 mM, pH=7) o MeOH, a las concentraciones de 10,000 ppm, 10 mM y 10 ó 30 mM, respectivamente. Para el ensayo, en cada pozo se colocaron alícuotas crecientes de 0-10 μL del analito de prueba (inhibidor) y 20 μL de la enzima α -glucosidasa (1 U/mL). La placa se incubó durante 10 minutos a 37°C y posteriormente se adicionaron 10 μL de sustrato [α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG, por sus siglas en inglés)] a una concentración de 10 mM. Se tomó la lectura al tiempo cero e inmediatamente después la placa con la mezcla de reacción se incubó 20 minutos a 37°C. Al término de este tiempo se registró la lectura final.

Los valores de absorbancia se obtuvieron mediante el programa Microplate Manager 6, y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \frac{A_{fp} - A_{ip}}{A_{fc} - A_{ic}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A_{ip} (pozo de prueba) corresponde al valor de absorbancia final (30 minutos), A_{ip} al valor de absorbancia al tiempo cero de cada muestra y A_{fc} y A_{ic} a las absorbancias finales e iniciales correspondientes al pozo sin inhibidor (control).

Los datos obtenidos de fueron procesados con GraphPad Prism 6 para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) mediante una regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill-Langmuir:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{1}{1 + \frac{CI_{50}}{I}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde I es la concentración de inhibidor y CI_{50} es la concentración inhibitoria media (Copeland, 2000).

6.1.1 Estudios de cinética enzimática

Los ensayos de cinética enzimática se realizaron con curvas de saturación por sustrato con concentraciones de *p*-NPG en el rango de 0.4-2 mM y diferentes concentraciones de los inhibidores [0.4, 0.5 y 0.6 mM de gymnoascólido A (**46**) y 0.33, 0.35 y 0.38 mM del dihidroderivado del gymnoascólido A (**167**)].

En este experimento se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m , K_i y V_{max} al realizar el análisis no lineal de las curvas de saturación por sustrato, empleando el programa GraphPad Prism 6 y se determinó gráficamente el tipo de inhibición a través del análisis de los gráficos de dobles recíprocos de las curvas de saturación.

6.2 Evaluación enzimática sobre la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP-1B)

Los extractos y compuestos fueron evaluados mediante un ensayo espectrofotométrico en la enzima recombinante humana de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) (Díaz-Rojas *et al.*, 2021). El ensayo se realizó de forma análoga a la descrita para las enzimas α -glucosidasas, ya que se conserva el principio de la detección a 415 nm del ion *p*-nitrofenolato a partir de la hidrólisis del sustrato, que en este caso es *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP, por sus siglas en inglés) a una concentración de 3 mM.

La preparación de las soluciones de prueba se realizó utilizando buffer de Tris (100 mM, pH=6.8) o DMSO a las mismas concentraciones descritas previamente. El control positivo (ácido ursólico) se preparó a 1 mM y la enzima se preparó a 1.56 mg/mL, ambos en el buffer de trabajo.

El procedimiento experimental fue el mismo con la excepción del tiempo y temperatura de incubación ya que estos cambiaron a 20 minutos y a temperatura ambiente, respectivamente.

Las lecturas de absorbancia fueron obtenidas a través del programa Microplate Manager 6, el cálculo del porcentaje de inhibición y de la CI_{50} se realizó con las Ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

6.2.1 Estudios de cinética enzimática

Los ensayos de cinética enzimática se realizaron con curvas de saturación por sustrato con concentraciones crecientes de *p*-NPP (0.3-3 mM) y diferentes concentraciones del inhibidor (0.03, 0.07 y 0.1 mM del compuesto **121**).

Se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m , K_i y V_{max} con el programa GraphPad Prism 6 y se determinó gráficamente el tipo de inhibición a través del análisis de los gráficos de dobles recíprocos de las curvas de saturación.

6.3 Ensayo en células INS-1E

La evaluación *in vitro* de las células se realizó con la línea celular INS-1E (insulinoma de rata), las cuales fueron donadas por los Profesores C. B. Wollhein y Pierre Maechler de la Universidad de Ginebra (Suiza). EL cultivo de las células se realizó en medio de RPMI 1640, con suero fetal bovino (10%), piruvato de sodio (1 mM), 2-mercaptoetanol (50 μ M), glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 μ g/mL) en condiciones estándar de incubación (37°C, 95% O₂, 5%CO₂). Las células con una confluencia de 70-90% fueron utilizadas para los experimentos.

6.3.1 Secreción de insulina en células INS-1E

El experimento se realizó en placas de 24 pozos, donde se sembraron las células INS-1E, 48 horas después de la siembra se adicionaron los compuestos **105** y **167** a una concentración final de 5 y 10 μ M durante 2 h. Posteriormente las células fueron lavadas con solución de Krebs-Ringer (KRBB) y se formaron dos grupos, el grupo I fue tratado con medio KRBB enriquecido con glucosa 2.5 mM, mientras que el grupo II con medio KRBB enriquecido con glucosa 8.3 mM. Ambos grupos se incubaron durante 90 minutos y al término de este tiempo, el medio se separó y se determinó la concentración de insulina empleando un kit de ELISA para rata/ratón de 96 pozos (EDM, Millipore)

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Claudia Tovar (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y *Nutrición* Salvador Zubirán, INCMNSZ).

7. Evaluaciones *in vivo*

Los sujetos de experimentación, ratones macho de la cepa CD-1 de 25-45 g de peso, se adquirieron a través de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco o con el proveedor Círculo ADN (Círculo A.D.N. S.A. de C.V.). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (25°C), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y acceso *ad libitum* a agua y alimento.

Todos los estudios se realizaron siguiendo los principios y recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Y los protocolos experimentales fueron aprobados por los Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Química de la UNAM (FQ/CICUAL/429/21) y de la Universidad Autónoma Metropolitana (Protocolo UAM 182).

La toma de las muestras sanguíneas se realizó mediante una pequeña incisión en la parte final de la cola del ratón, obteniéndose sangre de la vena caudal. La determinación cuantitativa de los niveles de glucosa en sangre se realizó con un glucómetro comercial One Touch Ultra 2 (Johnson & Johnson).

7.1 Protocolo de inducción de hiperglucemia en los sujetos de experimentación

La inducción del estado hiperglucémico en los animales se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Ventura-Sobrevilla y colaboradores (2011) realizando la administración por vía intraperitoneal (*i.p.*) de tres dosis consecutivas de 40 mg/kg de estreptozotocina en solución amortiguadora de citratos 100 mM (pH 4.5) a los animales de experimentación. Después de veintidós días de la inducción, se cuantificaron los niveles de glucosa en sangre y se determinó la ventana de uso de animales hiperglucémicos de 21 a 28 días posteriores a la primera administración.

7.2 Prueba de tolerancia a la sacarosa oral (PTSO)

Los animales de experimentación se dividieron en cinco grupos (n= 8). Después de 4 horas de ayuno, se midieron los niveles de glucosa basales y se administraron los diferentes tratamientos por vía intragástrica (*i.g.*). Al grupo 1 se le administró vehículo (solución salina al 0.9%), al grupo 2, el fármaco de referencia y control positivo acarbossa (ACA, 5 mg/kg) y los grupos 3-5 fueron administrados con las dosis de 3.16, 5.62 y 10 mg/kg del compuesto gymnoascólido A (46). Treinta minutos después de los tratamientos, los animales fueron administrados con una carga de sacarosa (1.5 g/kg) por vía *i.g.*

Los niveles de glucosa en sangre fueron determinados a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración del carbohidrato. Se calculó el porcentaje de variación de la glucemia de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Variación de glucemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde, G_i es el valor de la glucemia inicial y G_t es el valor de la glucemia al tiempo de determinación (minutos) posterior a la administración del tratamiento.

Finalmente, se realizaron las gráficas de curso temporal de variación de la glucemia y el cálculo de área bajo la curva (ABC) del curso temporal.

7.3 Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)

Este experimento se realizó de manera análoga a la PTSO, utilizando como fármaco de referencia y control positivo a la metformina (MET, 200 mg/kg) y el carbohidrato administrado cambia a glucosa (dosis de 1 g/kg).

De nueva cuenta los animales de experimentación fueron divididos en cinco grupos. Los tratamientos fueron administrados vía i.g., al grupo 1 se administró el vehículo, al grupo 2 se le administró el control positivo (MET 200 mg/kg) y los grupos 3 a 5 se les administraron las dosis de 3.16, 5.62 y 10 mg/kg en el caso del compuesto **46** y de 5.62, 10 y 31.2 mg/kg para el compuesto **105**, respectivamente.

Los niveles de glucosa en sangre fueron determinados a los mismos tiempos que en el ensayo de TSO, y el cálculo del porcentaje de variación de glucemia también se realizó con la Ecuación 3. Se elaboraron las gráficas de los cursos temporales y las ABC de los cursos temporales totales y/o del pico posprandial.

7.4 Prueba de efecto hipoglucemiante

Para esta prueba los animales se mantuvieron en un ayuno de cuatro horas previo a la administración de los tratamientos, los cuales se realizaron vía i.g. Para esta evaluación, los sujetos de experimentación fueron divididos en cinco grupos, al grupo 1 se le administró el vehículo (solución salina al 0.9%), al grupo 2 el fármaco control positivo glibenclamida (GLI, 15 mg/kg) y a los grupos 3-5 las dosis de 5.62, 10 y 31.2 mg/kg del compuesto **105**. Se midieron los niveles de glucosa a los 45, 90, 180 y 300 minutos posteriores a la administración de los tratamientos. El cálculo de porcentaje de variación se realizó con la Ecuación 3 y se realizó el curso temporal del experimento, así como el gráfico de ABC de este.

7.5 Análisis estadístico

Los resultados son mostrados como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM). Se realizó el análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una o dos vías, seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett para el establecimiento de diferencia significativa entre los tratamientos respecto al vehículo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.

8. Estudios *in silico*

8.1 Cálculos de dicroísmo circular electrónico

Los estudios de dicroísmo circular electrónico (DCE) del compuesto **167** se realizaron para determinar la configuración absoluta de los dos centros estereogénicos presentes en la molécula. De acuerdo con las características del compuesto **167** se establecieron como únicas posibles configuraciones a los enantiómeros *3S*, *4S* (**167a**) y *3R*, *4R* (**167b**) del compuesto reducido del gymnoascólido A, esto debido a la naturaleza de la reacción empleada para su síntesis.

Los enantiómeros fueron dibujados en el programa Spartan'08 (Wavefunction Inc.), se realizó la minimización de energía y la búsqueda conformacional mediante cálculos de mecánica molecular MMFF (Merck Mechanics Force Field). Los conformeros con una energía relativa menor a 5 kcal/mol fueron seleccionados.

Posteriormente, cada conformero fue optimizado con el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc.) con el método de teoría de funcionales de la densidad B3LYP (DFT, por sus siglas en inglés) con la base DGTZVP. Se obtuvieron los conformeros optimizados y estos fueron utilizados para el cálculo del DCE. Este cálculo se realizó empleando un método dependiente del tiempo DFT B3LYP (TD-SCF, Time Dependent Self Consistent Field) con la base DGTZVP, MeOH como disolvente y con 15 estados excitados.

Para la construcción de la gráfica de DCE se utilizó el programa SpecDis 1.71 (JIMDO, Berlín, Alemania) (Bruhn *et al.*, 2013) que emplea la fracción mol de cada conformero para obtener el espectro final combinado.

8.2 Herramientas bioinformáticas para la determinación de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química farmacéutica y toxicológicas de los compuestos bioactivos.

Debido a la buena actividad observada en los estudios *in vivo* e *in vitro* de los compuestos bioactivos, se realizaron estudios de “*drug-likeness*” con ayuda de los softwares SwissADME

(Swiss Institute of Bioinformatics, <http://www.swissadme.ch/> (Daina *et al.*, 2017) y Osiris Property Explorer (Organic Chemistry Portal, <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

El software SwissADME se utilizó para la predicción de propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica.

Así, en primer lugar, se calcularon las propiedades fisicoquímicas, las cuales incluyen lipofilicidad (LIPO): $-0.7 < XLOGP3 < 5.0$; tamaño (SIZE): $150 \text{ g/mol} < \text{masa molar} < 500 \text{ g/mol}$; polaridad (POLAR): $20 \text{ \AA}^2 < \text{área de superficie polar (TPSA)} < 130 \text{ \AA}^2$; insolubilidad (INSOLU): $0 < \log S \text{ (solubilidad estimada)} < 6$; insaturaciones (INSATU): $0.25 < \text{proporción de carbonos } sp^3 < 1$; y flexibilidad (FLEX): $0 < \text{número de enlaces rotables} < 9$. Estas propiedades están resumidas en un radar de biodisponibilidad. En este gráfico, el área en color rosa representa el rango óptimo de cada propiedad para tener un buen desempeño como fármaco, mientras que la línea roja representa los valores de las seis propiedades calculadas del fármaco.

Posteriormente se calcularon las propiedades farmacocinéticas que incluyen la permeabilidad gastrointestinal y de la barrera hematoencefálica, así como la susceptibilidad del compuesto en la glicoproteína p (gp-P). El resumen de estas propiedades se muestra en un gráfico de “huevo hervido” (BOILED-Egg). En este mismo apartado se realizó la predicción de la interacción de los compuestos bioactivos con las isoformas principales del citocromo P450.

Las propiedades de química farmacéutica incluyeron la estimación de los compuestos como PAINS (pan-assay interference structural fragments, compuestos que dan falsos positivos como moléculas bioactivas), alertas Brenk, violaciones “*lead-likeness*” y cinco reglas clásicas (Lipinski, Egan, Veber, Muegee y Ghose) que determinan la factibilidad de un producto de convertirse en fármaco.

Finalmente, el riesgo de toxicidad se estimó con el programa Osiris el riesgo de mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación y efectos reproductivos.

8.3 Estudios de acoplamiento molecular

Para el estudio de acoplamiento molecular se utilizaron los programas AutoDock4 y AutoGrid 4. Las estructuras de las proteínas cristalizadas se obtuvieron del “Protein Data Bank” (PDB) y los ligandos fueron construidos en el programa Spartan’08.

Los ligandos y proteínas fueron preparados con el programa AutoDockTools 1.5.6, la proteína fue tratada eliminando las moléculas de agua, los cofactores y ligandos que pudieran estar presentes en el archivo obtenido del PDB. Se adicionaron hidrógenos polares, cargas de Kollman y los átomos fueron asignados tipo AD4. Los ligandos se prepararon adicionando cargas de

Gasteiger y se eliminaron los hidrógenos no polares. Primero se realizó un acoplamiento ciego y se estableció el espacio de búsqueda inicial en una caja de dimensiones x-y-z de $126 \times 126 \times 126$ Å y un espaciado de 0.5 Å. El análisis se realizó con un algoritmo genético Lamarckiano, con 100 corridas.

Se refinó la caja de búsqueda a $60 \times 60 \times 60$ Å y un espaciado de 0.375 Å, centrada en la conformación de menor energía obtenida del estudio ciego y se siguió el mismo algoritmo realizando el mismo número de corridas. De los resultados obtenidos, se seleccionó el complejo ligando-proteína de menor energía y se visualizó en el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

El establecimiento de las interacciones entre el ligando y la proteína de los complejos de menor energía se realizó con la herramienta bioinformática Protein Ligand Interaction Profiler (PLIP) desarrollada por la Universidad de Dresde (Salentin *et al.*, 2015; Adasme *et al.*, 2021).

8.4 Estudios de dinámica molecular

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular, los complejos ligando-proteína fueron validados con el script pdb4amber. Posteriormente, estos complejos se prepararon para la generación de topologías adecuadas para el módulo LEaP de AMBER 19 (Case *et al.*, 2012; 2005).

En cada caso, a los complejos se les adicionaron hidrógenos y K^+ como contraiones para la generación de un sistema neutro. Los complejos fueron solvatados en una caja octaédrica con moléculas de agua tipo TIP3P y los límites de esta caja se establecieron a 12 Å de la superficie de la proteína.

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) fueron llevadas a cabo a 1 atm y 315 K, estas condiciones se mantuvieron con el uso del baróstato y termostato Berendsen y se utilizaron los parámetros de campo de fuerza leaprc.protein.ff19SB para todos los residuos.

El protocolo consistió en la minimización de energía inicial de la estructura, seguida de 500 ps de estabilización de las condiciones de temperatura y presión. La DM se registró durante 50 ns para cada complejo y se tomaron imágenes (cuadros) de la trayectoria cada 10 ps. El análisis de estos cuadros se realizó con CPPTRAJ (Roe & Cheatham, 2013) parte de las utilidades de AMBER 19 y OriginPro 9.1.

Los cálculos de la desviación media cuadrática (RMSD) se realizaron considerando los átomos C, CA y N. Los gráficos se construyeron con OriginPro 2018 SR1 y las líneas de tendencia

se ajustaron con la función de suavizado de línea. Los programas VMD y PyMOL se utilizaron para la visualización de las imágenes obtenidas de la dinámica molecular.

Los estudios de dinámica molecular se realizaron en colaboración con el Dr. Martín González Andrade de la Facultad de Medicina de la UNAM.

VI. Resultados y Discusión

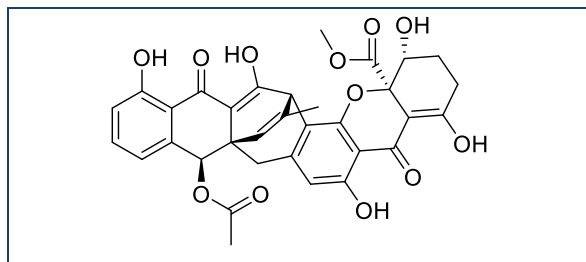
Parengyodontium album

Estudio químico del hongo

El fraccionamiento del extracto orgánico obtenido del medio sólido de arroz llevó al aislamiento de dos compuestos, JBIR-99 (**154**) y JBIR-97 (**152**). A continuación, se realiza la descripción de la caracterización de los metabolitos obtenidos de *P. album*.

JBIR-99 (154)

El compuesto JBIR-99 (**154**) fue aislado como un sólido amarillo. Los espectros de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN mostraron la presencia de 33 carbonos y 28 protones (Tabla 6), con señales características de un núcleo xantona-antraquinona (Wu *et al.*, 2016). La recristalización del compuesto en una mezcla de MeCN-MeOH- CH_2Cl_2 permitió la obtención de cristales apropiados para el análisis por difracción de rayos X, experimento que permitió confirmar inequívocamente la estructura del compuesto **154** (Cuadro 26).



Cuadro 26. Estructura química del compuesto JBIR-99 (**154**).

Cabe mencionar que este metabolito ya ha sido aislado de *Tritirachium* sp. SpBo81112MEf2 (Ueda *et al.*, 2010) donde se le adjudicó el nombre de JBIR-99 y posteriormente se aisló del hongo *Engyodontium album* LF069 (Wu *et al.*, 2016), donde se determinó su configuración absoluta como (9*R*, 10*S*, 12*S*, 24*R*, 25*S*), esta configuración absoluta fue confirmada mediante el parámetro de Flack [0.04(12)], que indicó que la estructura es idéntica a la representación ORTEP (Figura 16) del compuesto **154**.

Los datos cristalográficos del cristal fueron depositados en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC, por sus siglas en inglés, http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif) con el número de acceso: CCDC 1910121.

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN para los compuestos **154** y **152** en CDCl₃ (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz).

Posición	154		152	
	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)
1	161.5		161.7	
2	119.4	6.99 dd (8.1, 0.9)	119.4	6.99 dd (0.8, 8.5)
3	135.9	7.45 dd (8.4, 7.5)	135.9	7.45 dd (7.6, 8.2)
4	121.9	7.07 dd (7.3, 0.8)	122.1	7.07 d (7.4)
5	136.7		136.9	
6	114.9		115.1	
7	185.6		185.8	
8	106.4		105.9	
9	41.2		41.3	
10	73.1	5.97 s	73.2	5.95 s
11	186.5		187.1	
12	43.3	4.57 d (1.5)	42.6	4.57 d (1.4)
13	141.8		141.7	
14	125.2	5.65 m	125.4	5.66 t (1.4)
15	35.7	2.75 d (17.8) 2.67 d (17.8)	35.8	2.77 d (17.7) 2.59 d (17.7)
16	147.8		148.1	
17	114.7		117.0	
18	154.9		159.0	
19	105.2		104.9	
20	160.2		157.0	
21	114.2	6.12 s	111.1	6.08 s
22	186.8		186.6	
23	101.3		101.2	
24	85.1		84.5	
25	72.0	4.40 dd (12.2, 5.1)	71.9	4.24 dd (4.8, 12.4)
26	24.1	2.22 m	23.9	2.15 m 2.07 m
27	27.7	2.67 dd (14.4, 9.5)	27.7	2.65 m
28	178.5		178.3	
29	20.8	1.90 d (1.4)	21.1	1.91 d (1.3)
30	170.2		170.1	
31	53.3	3.71 s	53.4	3.72 s
32	170.4		170.6	
33	21.2	2.00 s	21.3	2.00 s

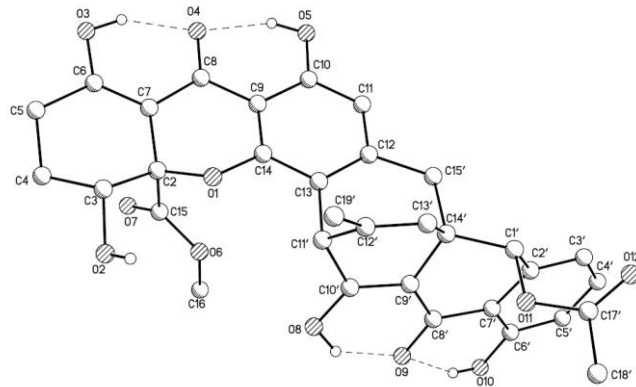
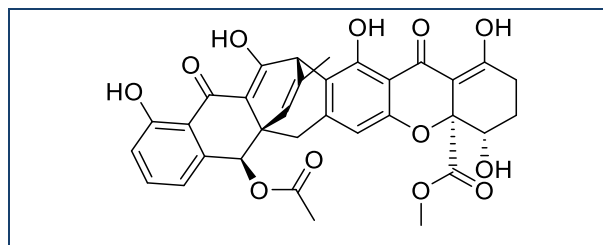


Figura 16. Estructura ORTEP generada por el análisis de difracción de rayos X del compuesto **154**.

JBIR-97 (**152**)



Cuadro 27. Estructura química del compuesto JBIR-97 (**152**).

El compuesto **152** se obtuvo como un polvo amarillo amorfo, el análisis de RMN reveló nuevamente la presencia de 33 carbonos y 28 protones (Tabla 6), y permitió establecer la identidad del compuesto **152** como JBIR-97 (Cuadro 27), un análogo del metabolito JBIR-99 (**154**); la diferencia entre los dos compuestos radica en la fusión de los precursores, en el caso del compuesto **154**, la fusión de la xantona con la antraquinona se realiza utilizando los carbonos para y meta (al hidroxilo en C-20), mientras que en el compuesto **152**, se realiza con los carbonos orto y meta (al hidroxilo en C-18) (Figura 17).

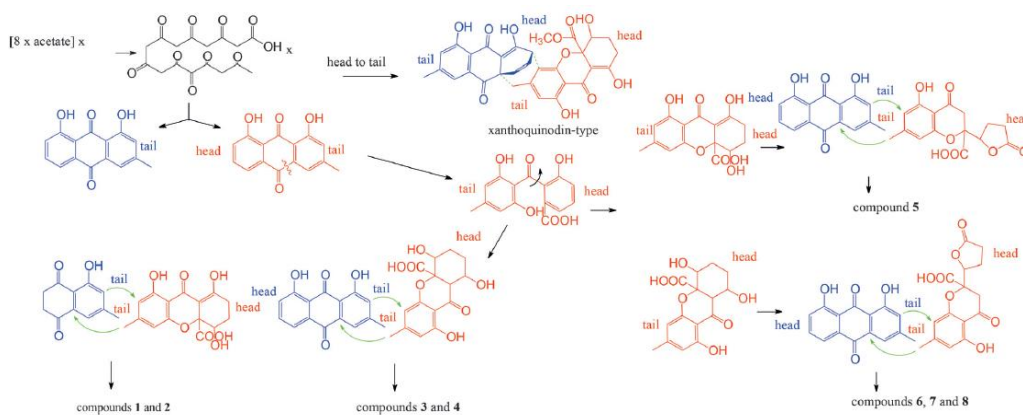


Figura 17. Ruta biosintética propuesta para la síntesis de los compuestos JBIR-99 (**154**) y JBIR-97 (**152**). Tomado de Wu *et al.*, 2016.

Identidad taxonómica del hongo

El hongo denominado con la clave interna ACA-14, resultó que no era *Malbranchea* como se asumió al inicio del proyecto, sino *Parengyodontium album*. En la Figura 18 se muestra el árbol filogenético obtenido. Es importante mencionar que la región ITS secuenciada demostró un 100% de identidad con la cepa *E. album* LF069 descrita en 2016 por Wu y colaboradores.

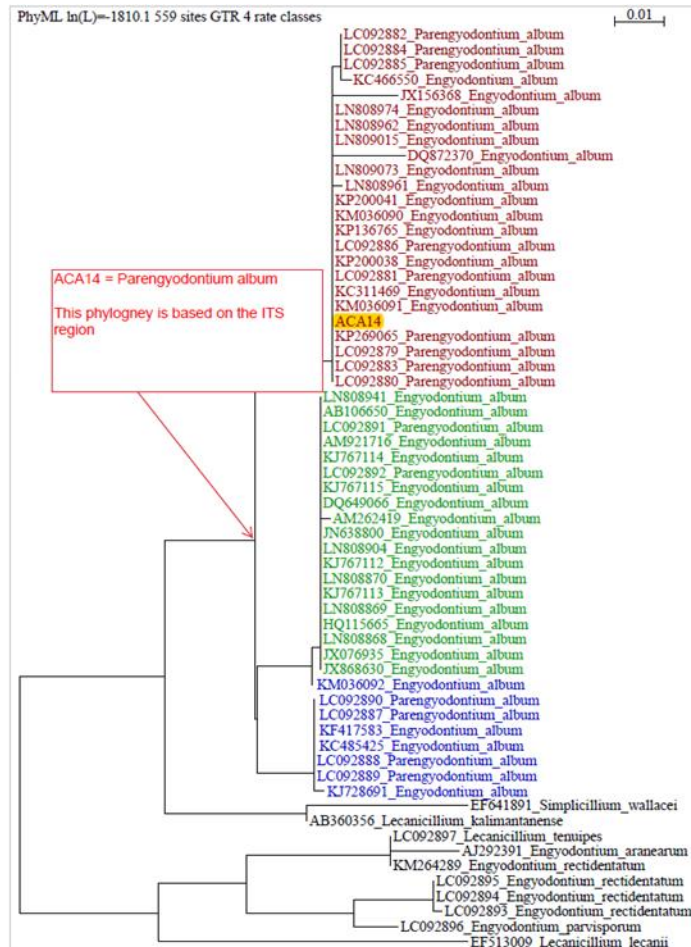


Figura 18. Árbol filogenético obtenido donde se muestra la identidad de ACA-14 como *Parengyodontium album*.

Con base en la información molecular obtenida se descartó este microorganismo como objeto de estudio, ya que, a pesar de presentar actividad preliminar inhibitoria frente a las enzimas blanco, no sigue el criterio quimiotaxonómico establecido en los antecedentes del proyecto. Sin embargo, el compuesto mayoritario **154**, fue evaluado como agente antitumoral en células de cáncer de próstata, mostrando resultados favorables y derivando en una publicación de colaboración con la Dra. Esperanza Carcache, de la Universidad Estatal de Ohio, Estados Unidos de América.

Malbranchea dendritica

El hongo *M. dendritica*, obtenido de la ATCC (34527) se cultivó en dos diferentes medios, el primero de ellos fue caldo papa-dextrosa (CPD, 6 L) en condiciones estáticas, y el segundo, medio sólido de cebada.

La evaluación preliminar de la actividad de los extractos del hongo frente a las enzimas α -glucosidasas (AG) y PTP-1B (Tabla 7) indicó que el extracto del medio de cultivo CPD tenía metabolitos con buena y moderada actividad frente a las enzimas blanco, mientras que el extracto obtenido de medio de cebada contenía metabolitos inactivos.

Tabla 7. Actividad del extracto CPD frente a las enzimas α -glucosidasa y PTP-1B.

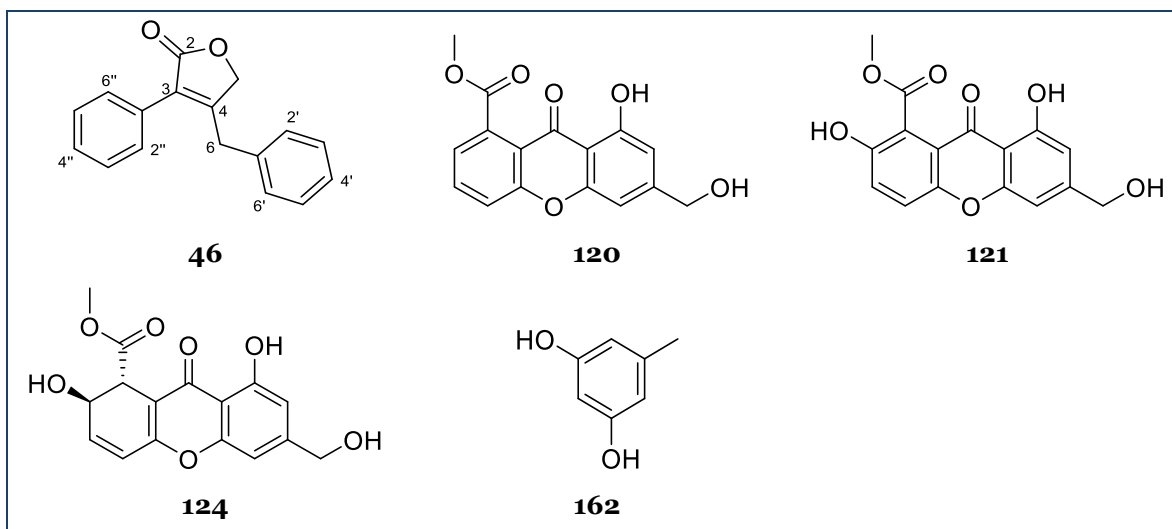
Medio CPD [1000 ppm]	α -glucosidasas	PTP-1B
% Inhibición	76.65	29.60
Desv. Estándar	2.23	4.17

Primero se realizará la descripción de los metabolitos aislados y posteriormente se indicarán los resultados de la actividad biológica de los mismos.

Estudio químico del hongo

Medio de cultivo CPD

Del medio de cultivo líquido se obtuvieron cinco metabolitos secundarios, cuyas estructuras se indican en el Cuadro 28, los metabolitos obtenidos se identificaron como gymnoascólido A (**46**), sydowinina A (**120**), sydowinina B (**121**), AGI-B4 (**124**) y orcinol (**162**).



Cuadro 28. Metabolitos secundarios obtenidos del extracto líquido de *M. dendritica*.

Gymnoascólido A (46)

El compuesto **46** se aisló como un sólido vítreo transparente. Los espectros de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN (Tabla 8) mostraron la presencia de dos anillos aromáticos, un carbonilo de lactona, un metileno base de oxígeno, dos carbonos de doble ligadura y un metileno bencílico.

La elucidación del compuesto **46** fue relativamente sencilla, permitiendo su identificación como el gymnoascólido A (Cuadro 28), metabolito aislado previamente de *M. filamentosa* (Wakana *et al.*, 2008a; Hosoe *et al.*, 2005) y de *Gymnoascus reessii* (Clark *et al.*, 2005) y cuyas características espectroscópicas fueron idénticas.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN para el compuesto **46** en CDCl_3 (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	173.3	
3	127.6	
4	159.8	
5	71.1	4.71 s
6	34.0	3.98 s
1'	136.1	
2'	128.5	7.17 d (7.3)
3'	129.2	7.36 t (7.5)
4'	127.4	7.31 t (7.4)
1''	129.7	
2''	128.9	7.55 d (7.2)
3''	128.7	7.49 t (7.6)
4''	128.8	7.43 t (7.4)

Sydowinina A (120)

El compuesto sydowinina A (**120**) fue aislado como un sólido vítreo amarillo, su caracterización estructural se realizó mediante el análisis de sus espectros de RMN (Tabla 9) los cuales indicaron que el producto se trataba de una xantona (Hamasaki *et al.*, 1975a; 1975b). El compuesto **120** fue aislado por primera vez del hongo *Aspergillus sydowii* (Hamasaki *et al.*, 1975a; 1975b) sin embargo, se han encontrado reportes de esta xantona en otras especies de *Aspergillus* (Trisuwan *et al.*, 2011), *Penicillium* (Pang *et al.*, 2019) y de hongos provenientes de suelo marino como *E. album* (Yao *et al.*, 2014), *Neosartorya fischeri* (Tan *et al.*, 2012), y *Arthrinium* (Bao *et al.*, 2018), entre otros.

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **120** en CDCl₃ (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)
1	162.0	
2	108.4	6.79 s
3	151.9	
4	104.4	7.00 s
4a	156.2	
5	119.7	7.56 dd (1.0, 8.5)
6	135.1	7.77 dd (7.3, 8.5)
7	122.8	7.33 dd (1.0, 7.3)
8	133.5	
8a	117.1	
9	180.8	
9a	108.2	
10a	156.2	
11	64.6	4.79 s
12	169.8	
13	53.3	4.02 s
OH-1		12.21 s
OH-11		5.30 s

Sydowinina B (121)

El compuesto **121** fue aislado como un sólido vítreo amarillo; a diferencia del producto **120**, **121** no es soluble en CHCl₃. La elucidación estructural del metabolito **121** fue sencilla, ya que al analizar comparativamente los desplazamientos de RMN (Tabla 10) de **120** y **121**, se observó una diferencia en la posición 7 del anillo de la xantona, al compararla con el compuesto **120**. La señal en C-7 del anillo de la xantona. La señal en C-7 (δ_C 122.8) se desplazó paramagnéticamente a δ_C 151.0 en el espectro de ¹³C-RMN. Además, en el espectro de ¹H-RMN se observó una señal en δ_H 10.65 consistente con un protón de un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Ambas evidencias indican la presencia de un grupo hidroxilo en C-7, por lo que el compuesto se identificó como sydowinina B (Cuadro 28). Este compuesto ha sido aislado solo o junto a su análogo sydowinina A de las mismas fuentes naturales (Bao *et al.*, 2018; Trisuwan *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2014).

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **121** en DMSO- δ_6 (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	160.5	
2	107.1	6.74 s
3	154.1	
4	103.9	7.00 s
4a	155.5	
5	120.3	7.63 d (9.1)
6	125.4	7.49 d (9.1)
7	151.0	
8	117.0	
8a	117.2	
9	180.3	
9a	106.6	
10a	148.8	
11	62.3	4.59 s
12	166.8	
13	52.2	3.85 s
OH-1		12.21 s
OH-7		10.65 s s.a.
OH-11		5.62 s

AGI-B4 (124)

El compuesto **124** fue aislado como un sólido vítreo color amarillo pálido, la identificación de este compuesto fue relativamente sencilla ya que también presentaba el núcleo xantona, al igual que **120** y **121**. Se determinó que el compuesto **124** es un derivado dihidrogenado de la sydowina B (**121**), ya que en los espectros de RMN (Tabla 11) los desplazamientos químicos de los carbonos C-7 y C-8 cambiaron de δ_{C} 151.0 a δ_{C} 65.2, y de δ_{C} 117.0 a δ_{C} 44.9, respectivamente, lo que indica la eliminación de la doble ligadura; sin embargo, los sustituyentes en los carbonos afectados permanecieron igual. De tal manera, las señales para H-7 y H-8, se observaron en δ_{H} 4.87 y δ_{H} 4.31 en el espectro de ^1H -RMN, y el hidroxilo en C-7 en δ_{H} 5.44. De acuerdo con las constantes de acoplamiento observadas ($J= 3.0$ Hz) entre H-7 y H-8 se determinó la disposición *trans* de los sustituyentes en esas posiciones al igual que en el producto AG1-B4 (Kim *et al.* 2002) cuya estructura se determinó por rayos X.

Cabe mencionar que este metabolito se aisló por primera vez de la especie de *Aspergillus* sp. Y80118 y en esa ocasión se identificó a este metabolito como un inhibidor de la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (línea celular HUVEC) inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Kim *et al.*, 2002).

Este metabolito se ha aislado solo y en conjunto con las sydowininas, de otras especies de *Aspergillus* (Trisuwan *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2015) y otros ascomicetos marinos.

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **124** en CDCl₃ (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)
1	160.7	
2	109.1	6.74 s
3	149.9	
4	104.6	6.91 d (4.9)
4a	155.9	
5	122.9	6.46 d (9.9)
6	138.5	6.65 dd (4.9, 9.9)
7	65.2	4.87 m
8	44.9	4.31 t (3.0)
8a	110.4	
9	181.3	
9a	109.9	
10a	158.9	
11	64.7	4.74 s
12	170.9	
13	53.0	3.72 s
OH-1		12.3 s
OH-7		5.44 s
OH-11		5.30 s

Orcinol (162)

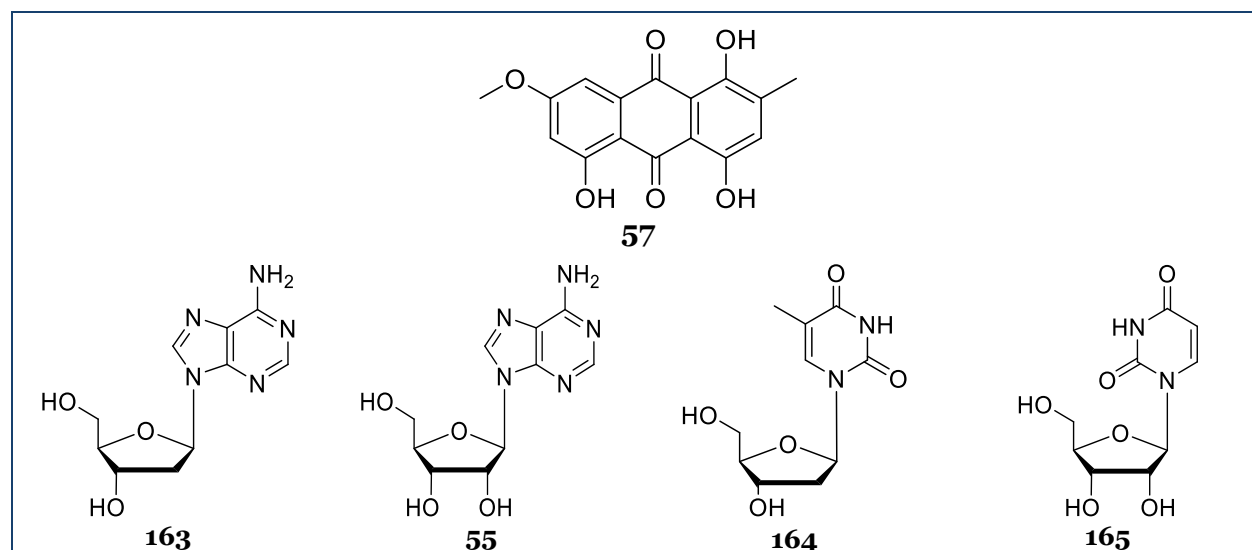
El compuesto **162** fue identificado como el policétido orcinol de acuerdo con los desplazamientos obtenidos por la técnica de RMN (Tabla 12), este compuesto está ampliamente distribuido en la naturaleza, y se ha aislado de plantas como *Rhododendron dauricum* (Iwata *et al.*, 2004), hongos, particularmente del género *Aspergillus* (Mohamed *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2020) y líquenes como *Parmotrema mesotropum* (Mallavadhani *et al.*, 2019), entre otros.

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **162** en CDCl₃ (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)
1	158.3	
2	103.6	6.30 s
3	156.6	
4	112.4	6.41 d (5.3)
5	141.1	
6	111.3	6.41 d (5.3)
7	21.6	2.26 s
OH-1		3.49 s
OH-3		3.49 s

Medio de cebada

Del medio de cultivo de cebada, que no presentó actividad frente a las enzimas objeto de estudio, se aislaron cinco metabolitos (Cuadro 29), de los cuales uno pertenece al grupo de las antraquinonas, mientras que los cuatro restantes son nucleósidos.

Cuadro 29. Metabolitos secundarios obtenidos del extracto sólido de *M. dendritica*.

Eritroglauca (57)

Del medio sólido de cebada se aisló un sólido rojo identificado como la antraquinona eritroglauca (**57**), mediante la comparación de los desplazamientos de las señales de RMN (Tabla 13) con los de la literatura científica. Es importante mencionar que este metabolito se ha aislado de diversas especies del género *Aspergillus* (*A. glaucus*, *A. cristatus* y *A. repens*), *Eurotium* (anamorfo de *Aspergillus*), *Dreschlera*, *Curvularia lunata*, entre otras (Fouillaud *et al.*, 2016; Caro *et al.*, 2012).

También es importante mencionar que este metabolito, ha sido aislado previamente de otra especie de *Malbranchea*, *M. filamentosa* (Wakana *et al.*, 2008a).

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **57** en CDCl_3 (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	158.1	
2	140.9	
3	129.5	7.14 s
4	157.4	
4a	110.7	
5	165.4	
5a	110.8	
6	107.1	6.71 d (2.5)
7	166.6	
8	107.6	7.43 d (2.5)
8a	135.3	
9	186.7	
9a	112.0	
10	189.1	
11	16.7	2.36 d (0.9)
12	56.2	3.95 s
OH-1		13.38 s
OH-4		12.38 s
OH-5		12.47 s

Desoxiadenosina (163)

El nucleósido desoxiadenosina (**163**) se obtuvo como un polvo blanco; su caracterización estructural se realizó comparando los desplazamientos obtenidos mediante RMN (Tabla 14) con los previamente descritos en varias publicaciones (Ciuffreda *et al.*, 2007). La identificación del núcleo purina se determinó mediante la presencia de las señales en δ_{H} 8.21 y δ_{H} 8.35, en los espectros de ^1H -RMN correspondientes a los protones de las iminas del núcleo. Por otro lado, el carbohidrato se identificó como desoxirribosa, al comparar los desplazamientos en la posición C-2'/H-2' (δ_{C} 41.6 / δ_{H} 2.44) y las demás señales con las descritas previamente (Pretsch *et al.*, 2020).

Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **163** en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)
2	153.5	8.21 s
4	150.0	
5	120.9	
6	157.5	
8	141.6	8.35 s
1'	87.2	6.43 dd (6.1, 7.9)
2'	41.6	2.44 ddd (2.7, 6.1, 13.5)
		2.84 ddd (5.8, 8.0, 13.6)
3'	73.1	4.61 dt (2.6, 5.5)
4'	89.9	4.10 q (3)
5'	64.7	3.78 dt (3.3, 12.2)
		3.88 dd (3.0, 12.3)

Adenosina (**55**) y Uridina (**165**)

Los compuestos **55** y **165** fueron obtenidos en mezcla como polvos blancos. Mediante la técnica de RMN se observó la presencia de dos sistemas de señales, uno de la adenosina (**55**) y el otro de la uridina (**165**).

La adenosina se identificó por comparación de los espectros de RMN (Tabla 15) con el de la desoxiadenosina (**163**), donde se observó el mismo núcleo de purina; en este caso el residuo de azúcar se identificó como el de la ribosa ya que presentaba los desplazamientos para C-2' y H-2' se observaron δ_C 75.5 y δ_H 4.77, respectivamente en los espectros de RMN.

Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **55** en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)
2	153.5	8.22 s
4	150.0	
5	121.1	
6	157.6	
8	142.0	8.34 s
1'	91.3	6.00 d (6.4)
2'	75.5	4.77 dd (5.2, 6.3)
3'	72.7	4.36 dd (2.6, 5.1)
4'	88.2	4.20 t (3.9)
5'	63.5	3.77 m
		3.92 dd (2.5, 12.5)

La elucidación estructural de la uridina (**165**) fue sencilla; el espectro de ^{13}C -RMN mostró señales para nueve carbonos que revelaron la presencia de una doble ligadura (Tabla 16) con desplazamientos en δ_{C} 142.7 y δ_{C} 102.6, un grupo carbamida en δ_{C} 152.5 y las señales típicas de la ribosa (Moriyama *et al.*, 2009; Pretsch *et al.* 2020).

Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **165** en CD_3OD (^1H a 700 MHz y ^{13}C a 175 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	152.5	
4	142.7	8.04 d (8.1)
5	102.6	5.73 d (8.1)
6	166.2	
1'	90.7	5.93 d (4.8)
2'	75.7	4.22 m
3'	71.3	4.18 t (5.0)
4'	86.4	4.04 dt (2.9, 4.7)
5'	62.3	3.77 m
		3.87 dd (2.8, 12.2)

Timidina (164)

Finalmente, la timidina (**164**) fue aislada como un cristal blanco el cual fue sometido a un análisis de difracción de rayos X, por lo tanto, identificado inequívocamente. La representación ORTEP de la estructura obtenida se muestra en la Figura 19.

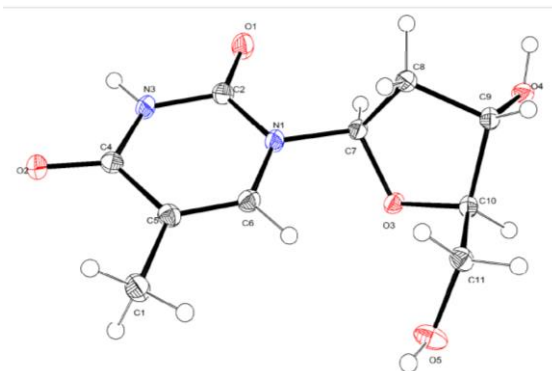


Figura 19. Representación ORTEP obtenida por difracción de rayos X del compuesto **164**.

Es importante mencionar que tres de los metabolitos obtenidos de este hongo: gymnoascólido A (**46**), eritroglaucina (**57**) y adenosina (**55**), también se han aislado del hongo *M. filamentosa*, esta consideración es importante ya que esto nos indica la cercanía quimiotaxonómica entre las especies de *Malbranchea*, particularmente de *M. dendritica* y *M. filamentosa*.

Evaluación de metabolitos aislados en la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae*

Los extractos desgrasados y compuestos puros fueron evaluados frente a las enzimas α -glucosidasas de *S. cerevisiae* mediante un ensayo espectrofotométrico descrito en la metodología experimental. El principio de este ensayo enzimático se basa en la detección del producto de hidrólisis (*p*-nitrofenolato) a una longitud de onda de 415 nm liberado por la acción de la enzima. La disminución de la concentración de este producto indica la inhibición de la enzima (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020).

Debido al ensayo preliminar de los extractos, indicados en la Tabla 7, los metabolitos aislados del medio líquido CPD (**46**, **120**, **121**, **124** y **162**) fueron evaluados frente a la enzima α -glucosidasa de levadura. Únicamente el compuesto **46** presentó actividad inhibitoria con una CI_{50} de 0.556 ± 0.009 mM (Figura 20) la cual fue comparable con el control positivo acarbosa [$CI_{50} = 0.403 \pm 0.010$ mM].

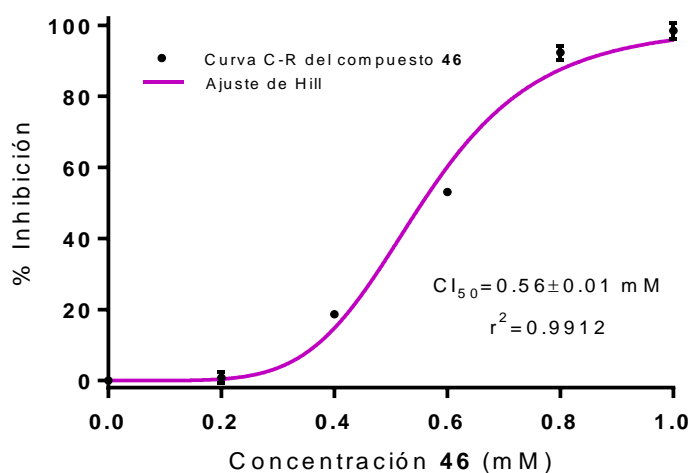


Figura 20. Curva C-R del compuesto **46** sobre las enzimas α -glucosidasas de *S. cerevisiae*.

De acuerdo con los resultados, se procedió a determinar el tipo de inhibición que ejerce este compuesto sobre la enzima, y para ello se realizaron estudios de cinética enzimática, que experimentalmente consisten en realizar curvas de saturación por sustrato de la enzima con diferentes concentraciones de inhibidor; en este caso se utilizaron las concentraciones de 0.4, 0.5 y 0.6 mM de compuesto **46**.

Las curvas de saturación por sustrato fueron analizadas mediante la ecuación no-lineal de Michaelis-Menten (Figura 21, panel A), donde se determinó que el tipo de inhibición que ejercía el compuesto **46** sobre la enzima era mixto ($r^2=0.9546$). También se realizó el gráfico de dobles

recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 21, panel B), para la determinación gráfica del tipo de inhibición y para la obtención de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

La ecuación que describe el gráfico de Lineweaver-Burk es el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten, la cual se indica a continuación:

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde V es la velocidad de la reacción enzimática, $[S]$ es la concentración de sustrato, V_{max} es la velocidad máxima y K_m es la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima. La pendiente de esta ecuación es $\frac{K_m}{V_{max}}$, por lo tanto, la intersección de la recta en el eje de las y nos indica el valor numérico de $\frac{1}{V_{max}}$, mientras que la intersección de la recta en el eje de las x , nos indica $-\frac{1}{K_m}$, de esta forma se pueden obtener los parámetros cinéticos de forma más sencilla (Engelking 2015).

Los cambios en la pendiente y la intersección de las rectas (curvas de saturación por sustrato) en los ejes dependen de cada tipo de inhibidor, en este caso se observó que la intersección no se realizó en ninguno de los ejes, por lo que el producto **46** es un inhibidor mixto, esto significa que tanto K_m como V_{max} son alterados, y que el inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, en un lugar distinto al sitio catalítico. Los parámetros V_{max} , K_m y K_i fueron 1.720 mM/min, 0.6426 mM y 0.7433 mM, respectivamente.

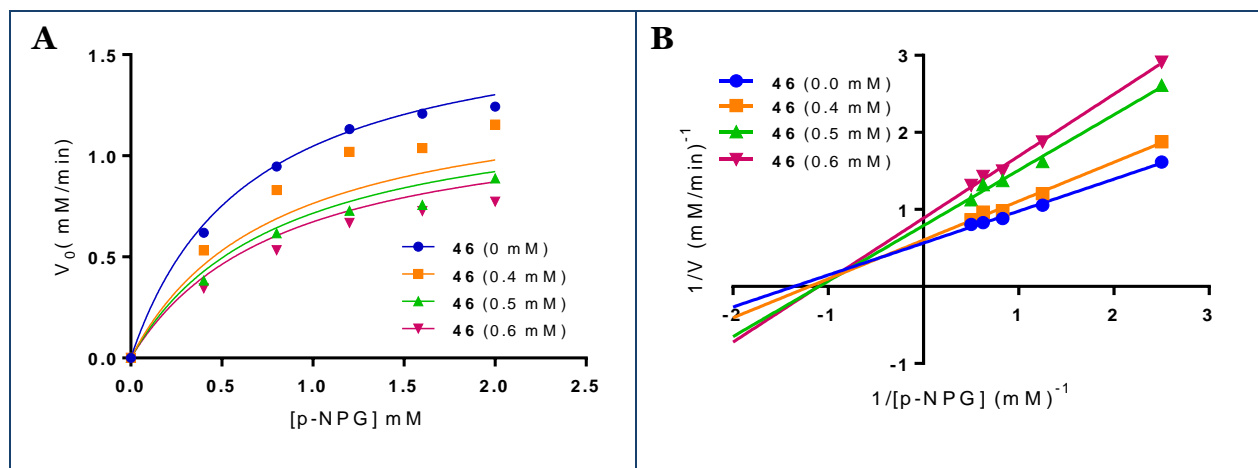


Figura 21. Gráficos de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de las curvas de saturación por sustrato de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas a diferentes concentraciones del inhibidor **46**.

Evaluación *in vivo* del compuesto 46

Con la finalidad de comprobar *in vivo*, el potencial antidiabético del compuesto **46**, se realizó una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones macho de la cepa CD-1 obtenidos de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

El experimento consistió en administrar el tratamiento (diferentes dosis del compuesto **46**), posteriormente se administró una carga de sacarosa, y se realizaron mediciones de los niveles de glucosa a diferentes tiempos del estudio. Si el compuesto tiene propiedades antihiper glucémicas, se observará una disminución en el pico posprandial en las gráficas del curso temporal.

De acuerdo con los resultados de esta prueba, mostrados en la Figura 22, se puede observar que el compuesto **46** disminuye significativamente el pico posprandial a las dosis de 5.6 y 10 mg/kg. Lo que indica que el compuesto **46** actúa como inhibidor de las enzimas α -glucosidasas, ya que, al inhibir la acción hidrolítica de las enzimas, se evita que se libere glucosa y que ésta pueda absorberse para incrementar los niveles posprandiales del carbohidrato.

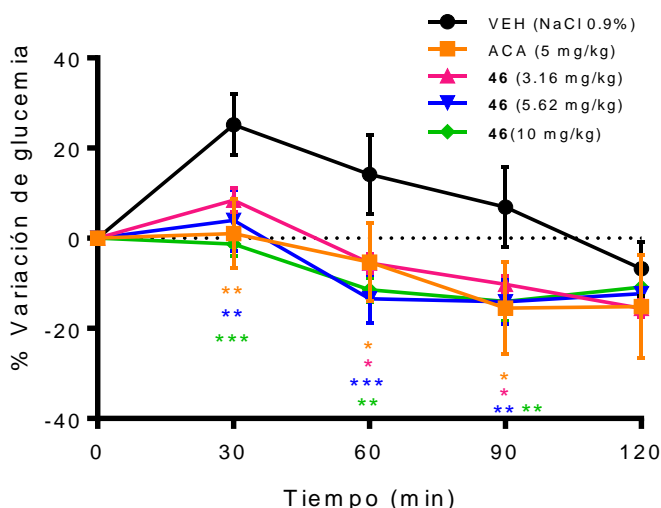


Figura 22. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones. VEH: vehículo; ACA: acarbose. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01 y *** p < 0.001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.

Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química-medicinal y toxicológicas de los compuestos 46, 167a y 167b

Debido a la buena actividad del compuesto **46** en los estudios *in vivo* e *in vitro* se investigaron sus propiedades de “*drug-likeness*” utilizando los softwares SwissADME (Daina *et al.*, 2017) y Osiris Property Explorer (Sander, 2001).

Primero se predijeron las actividades fisicoquímicas, las cuales están resumidas en un radar de biodisponibilidad. En este gráfico, el área en color rosa representa el rango óptimo de cada propiedad para tener un buen desempeño como fármaco, mientras que la línea roja representa los valores de las seis propiedades calculadas del fármaco. Como se puede observar en la Figura 23, el compuesto **46** está en el rango óptimo para cinco de las seis propiedades (lipofilicidad, tamaño, polaridad, solubilidad y flexibilidad), sin embargo, el número insaturaciones de la molécula resultó alto ya que se encuentra fuera del área rosa.

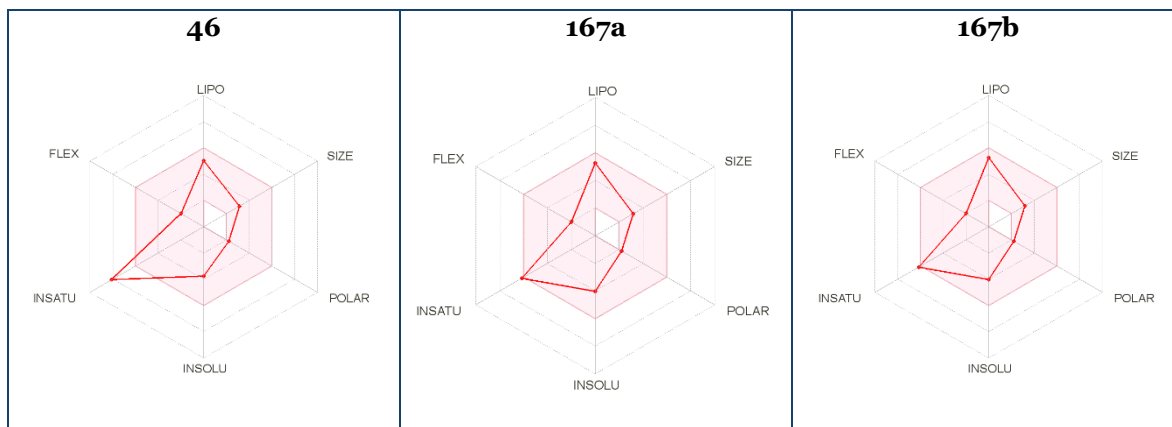


Figura 23. Radar de biodisponibilidad de los compuestos **46**, **167a** y **167b** obtenidos con el programa SwissADME.

Las propiedades farmacocinéticas mostradas en una gráfica tipo BOILED-EGG (Figura 24) mostraron una buena permeabilidad gastrointestinal y de la barrera hematoencefálica; también se observó que el compuesto **46** no es sustrato de la glicoproteína P, lo cual es bueno ya que esta es una proteína de eflujo relacionada con la resistencia a fármacos. Otros resultados en esta área mostraron que el compuesto **46** tiene la capacidad de inhibir las isoformas CYP1A2, CYP2C19 y CYP2D6 del citocromo P450, lo cual indica una alerta para la posible interacción farmacológica con otros fármacos.

SwissADME predice algunas características farmacocinéticas y no considera la biotransformación de las moléculas como otros programas más especializados. Sin embargo, de acuerdo con la literatura, los ésteres, cíclicos (lactonas) o no, generalmente sufren una hidrólisis enzimática que genera la apertura del anillo en el caso de las lactonas, y así comprometer sus propiedades farmacológicas (Yi *et al.*, 2005). Por otro lado, en el caso de las estatinas la apertura de la lactona es fundamental para el efecto hipocolesterolemizante; este mismo podría ser el caso del gymnoascólido A (**46**). Los estudios *in vitro* indicarían *a priori* que el compuesto actúa directamente en el intestino como inhibidor de las enzimas antes de absorberse y sufrir

biotransformación alguna; sin embargo, no se puede descartar aún que el producto sufra una biotransformación, y luego su efecto.

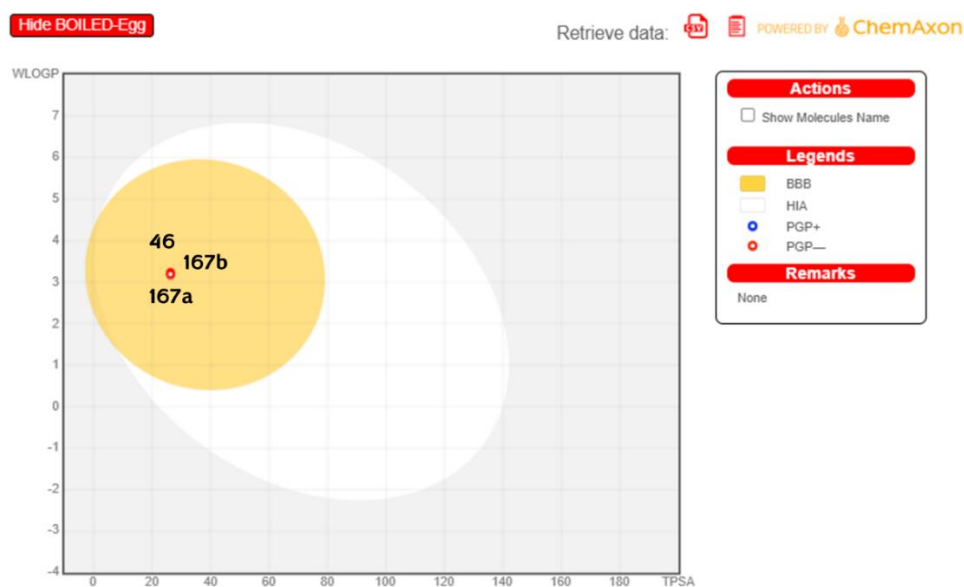


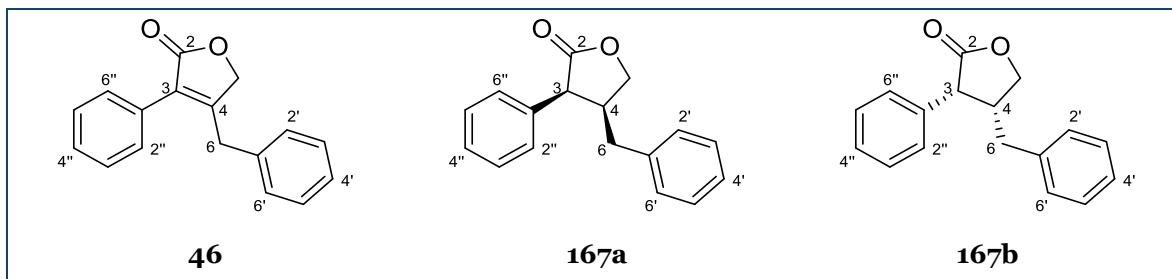
Figura 24. Gráfico tipo BOILED-EGG de los compuestos **46**, **167a** y **167b**, donde se muestra la permeabilidad en barrera hematoencefálica (BBB) indicada en color amarillo, la permeabilidad intestinal (HIA) indicada en color blanco y si el compuesto es sustrato a la glicoproteína P (PGP+/PGP-).

Por otro lado, las características de química farmacéutica mostraron que el compuesto **46** es un buen candidato a fármaco ya que no mostró alertas de Brenk, PAINS, ni violaciones “*lead-likeness*”. Además, este producto sigue cinco reglas clásicas (Lipinski, Egan, Veber, Muegee y Ghose) que determinan la factibilidad de un producto de convertirse en fármaco.

Finalmente, el riesgo de toxicidad se estimó con el programa Osiris y los resultados no mostraron alertas de mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación ni efectos reproductivos. Además, en los estudios *in vivo* no se mostraron cambios conductuales ni irritantes en los ratones.

Derivado dihidrogenado del gymnoascólido A (167)

Con el objetivo de mejorar las propiedades fisicoquímicas, que impactan en la biodisponibilidad del fármaco, se decidió reducir la insaturación de la lactona presente en el gymnoascólido A(**46**). Para llevar a cabo esa reacción se realizó la hidrogenación catalítica con Pd/C del compuesto **46**, reacción que se muestra en la parte experimental. De acuerdo con el mecanismo de esta reacción, la adición de hidrógeno es tipo *syn*, por lo que se pueden producir únicamente dos productos: **167a** y **167b**, mostrados en el Cuadro 30.

Cuadro 30. Compuesto **46** y sus derivados dihidrogenados **167a** y **167b**.

Ambos productos **167a** y **167b**, fueron analizados con las herramientas computacionales y mostraron prácticamente las mismas características que el compuesto **46**, sin embargo, en el radar de biodisponibilidad ya no se mostró la línea roja fuera del área óptima color rosa (Figura 23), lo que indica que los compuestos **167a** y/o **167b** tienen mejores características de biodisponibilidad que el compuesto **46**.

De manera adicional, es importante mencionar que la eliminación del doble enlace en el compuesto **46** evita la posibilidad de formar enlaces covalentes con moléculas endógenas (ADN o proteínas) ya que las lactonas α,β -insaturadas son aceptores de Michael (Schwöbel *et al.*, 2011), por lo que los derivados **167a/167b** podrían ser mejores candidatos a fármaco al tener un menor riesgo de toxicidad.

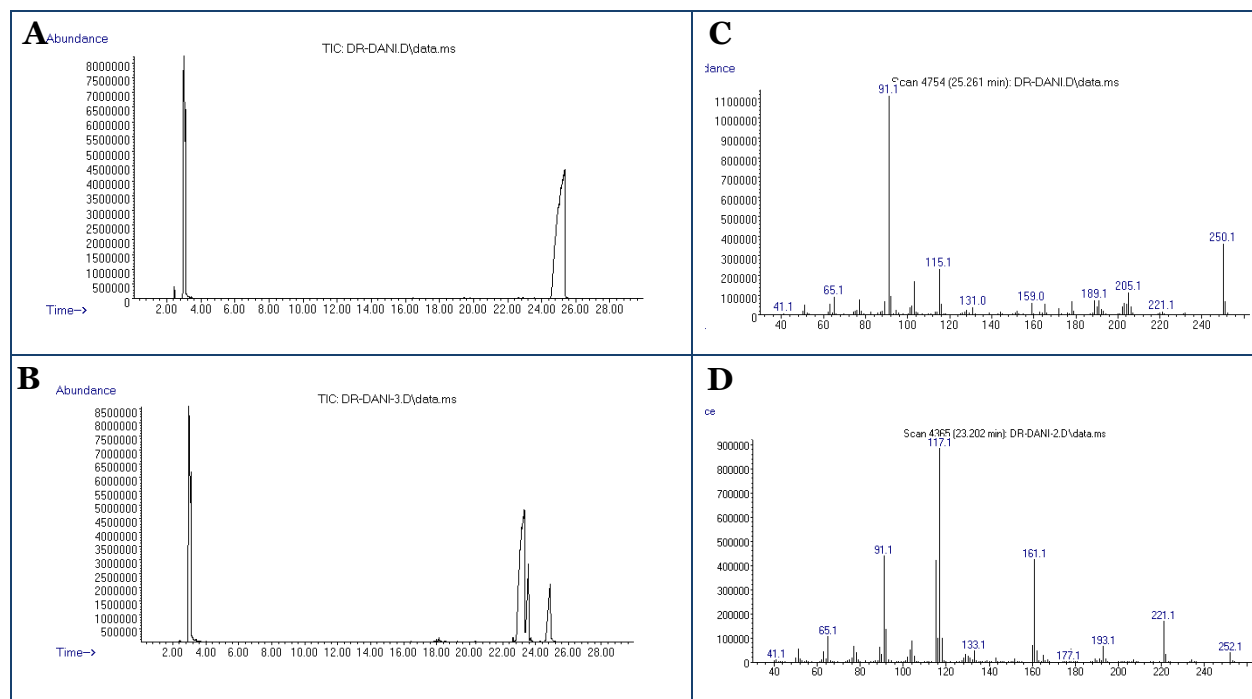


Figura 25. A) Cromatograma que muestra el pico correspondiente al sustrato de la reacción (**46**) con un $t_R = 25$ min. B) Cromatograma donde se muestran los picos correspondientes al producto reducido ($t_R = 23.2$ min) y al sustrato de la reacción ($t_R = 25$ min). C) Espectro de masas del compuesto **46** con un ión molecular en m/z 250. D) Espectro de masas del producto reducido (**167**), donde se puede ver el ión molecular en m/z 252, indicando la adición de dos unidades de masa al peso molecular del sustrato.

El compuesto **167** se obtuvo como un sólido vítreo color blanco, este producto que en CCF mostraba solo la presencia de una mancha fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), donde se reveló la presencia de una mezcla enantiomérica 8:2 de los compuestos **167a** y **167b** y se comprobó la adición de los dos hidrógenos en la doble ligadura (Figura 25).

La caracterización del compuesto **167a/167b** se realizó mediante RMN, donde claramente se pudo observar en los espectros la eliminación del doble enlace ya que las señales δ_C 159.8 (C-4) y 127.6 (C-3) en **46** fueron sustituidas por dos metinos en δ_H/δ_C 4.06/50.3 (C-3) y δ_H/δ_C 3.08/34.7, respectivamente (Tabla 17). También el carbonilo (δ_C 177.2) tuvo un desplazamiento paramagnético debido a la eliminación del doble enlace conjugado al carbonilo.

Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **167a/167b** en $CDCl_3$ (1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz).

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)
2	177.2	
3	50.3	4.06 d (8.2)
4	34.7	3.08 m
5	70.3	4.14 d (5.3, 9.3)
		4.26 d (6.4, 9.3)
6	42.7	2.45 dd (4.8, 14.1)
		2.20 dd (11.4, 14.1)
1'	138.6	
2', 6'	129.0	7.02 d (7.1) s.a.
3', 5'	128.8	7.26 m
4'	126.8	7.20 m
1''	133.5	
3'', 5''	128.8	7.26 m
4''	128.0	7.34 m
2'', 6''	129.4	7.39 m

El compuesto **167a/167b** presentó un valor de rotación óptica $[\alpha]_D^{20} = -4$ ($c = 1$, MeOH), donde se muestra un pequeño exceso de uno de los dos enantiómeros formados. Para determinar cuál de los dos enantiómeros era el predominante, se realizaron cálculos computacionales de dicroísmo circular de los enantiómeros *3S*, *4S* (**167a**) y *3R*, *4R* (**167b**) con ayuda de la herramienta Gaussian 09. Los espectros de dicroísmo teóricos obtenidos fueron comparados con el espectro

experimental (Figura 26) y se determinó que el signo y forma de los efectos Cotton corresponde con el enantiómero *3R,4R* (**167b**).

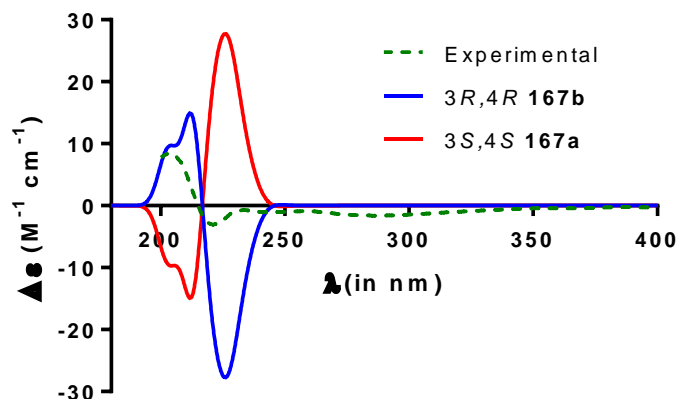


Figura 26. Espectros de dicroísmo circular electrónico experimental para la mezcla **167a/167b** (línea verde punteada) y calculados para los enantiómeros *3S,4S* (rojo) y *3R,4R* (azul) en metanol.

Evaluación de la mezcla enantiomérica **167a/167b** frente a la enzima α -glucosidasa de levadura

El producto **167a/167b** fue evaluado frente a la enzima α -glucosidasas de levadura y se obtuvo una $CI_{50} = 0.396 \pm 0.003$ mM, la cual es ligeramente menor a la obtenida con el compuesto **46** (Figura 27).

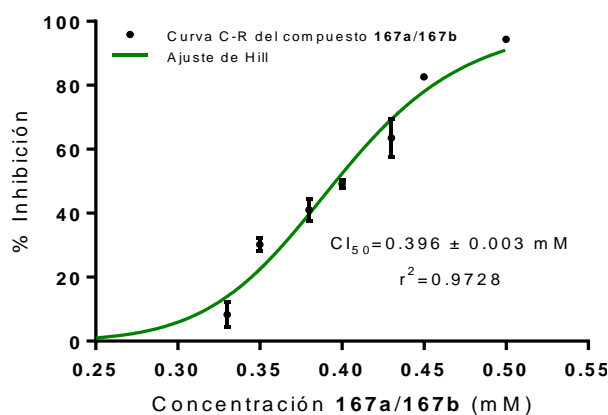


Figura 27. Curva C-R del compuesto **167a/167b** sobre las enzimas α -glucosidasas de *S. cerevisiae*.

La cinética enzimática (Figura 28) de este derivado también se realizó y se obtuvo el tipo de inhibición mixta ($r^2 = 0.9397$) al igual que el compuesto **46**. Los parámetros calculados V_{max} , K_m y K_i fueron 1.447 mM/min, 0.5361 mM y 0.6984 mM, respectivamente.

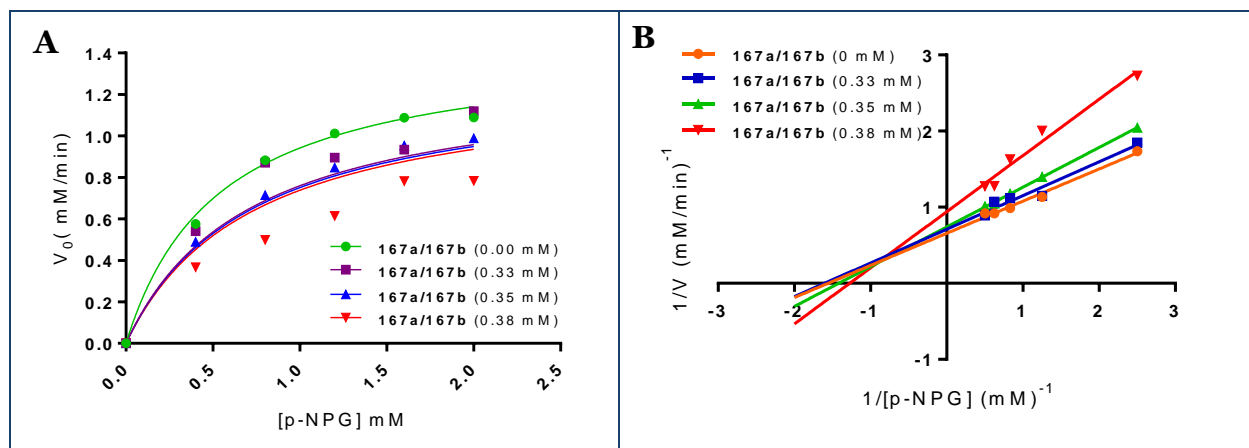


Figura 28. Gráficos de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de las curvas de saturación por sustrato de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas a diferentes concentraciones del inhibidor **167a/167b**.

Estudios de acoplamiento molecular de los compuestos bioactivos con las enzimas α -glucosidasas

Una vez determinado el tipo de inhibición de los compuestos **46** y **167a/167b** sobre la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae*, se realizaron estudios de acoplamiento molecular con la finalidad de complementar la información obtenida de estos inhibidores.

Se utilizaron como blancos moleculares la isomaltasa de *S. cerevisiae* (PDB: 3A4A) debido a los estudios de cinética enzimática, y la subunidad C-terminal de la maltasa glucoamilasa humana (CtMGAM) (PDB: 3TOP) considerando los estudios *in vivo* durante la PTSO.

La predicción de las posibles conformaciones de los complejos enzima-ligando se realizó con el programa AutoDock 4.2 mediante un algoritmo genético lamarckiano. El acoplamiento fue analizado con AutoDockTools y la visualización del mismo se realizó en los programas PyMOL y el programa PLIP (Adasme *et al.*, 2021; Salentin *et al.*, 2015).

Los resultados del acoplamiento con la enzima obtenida de *S. cerevisiae* se muestran en la Figura 29 y la Tabla 18, donde se pueden observar el tipo de interacciones, los aminoácidos, energías libres de unión y constantes de inhibición calculadas. Para el caso de la α -glucosidasa de levadura, los compuestos **46**, **167a** y **167b** se unen en sitios diferente al sitio catalítico con energías de unión muy similares (Tabla 8), esta información está en armonía con los ensayos de cinética enzimática, donde se indicó que el inhibidor no se unía al sitio catalítico de la enzima.

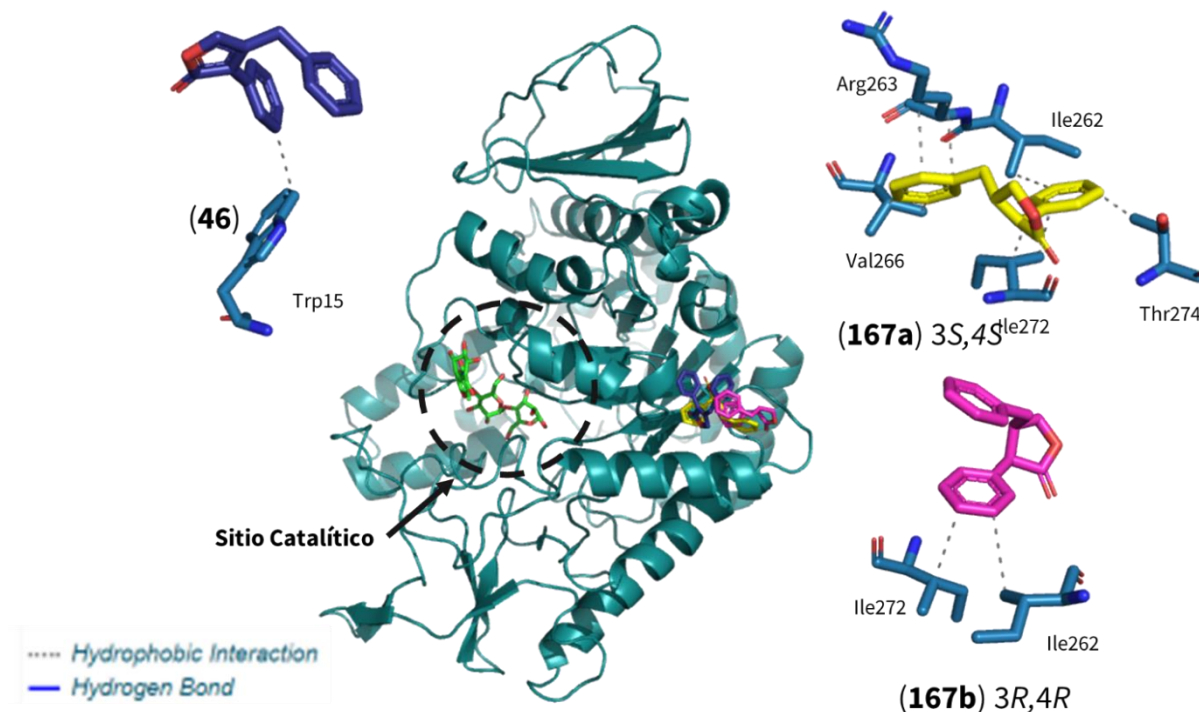


Figura 29. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (PDB:3A4A) representada en caricatura azul claro, con los compuestos **46** (azul rey), **167a**, 3*S*,4*S* (amarillo) y **167b**, 3*R*,4*R* (magenta). La acarbosa está representada en color verde en el sitio catalítico de la enzima. Las imágenes fueron generadas con PyMOL.

Tabla 18. Análisis de resultados de docking para los compuestos **46**, **167a** y **167b** en la enzima isomaltasa (PDB: 3A4A).

Compuesto	K_i (μM)	Energía libre de unión (kcal/mol)	Residuos que interactúan
46	32.53	-6.1	^a Trp15
167b (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)	38.54	-6.0	^a Ile262, ^a Ile272
167a (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)	9.94	-6.8	^a Ile262, ^a Arg263, ^a Val266, ^a Ile272, ^a Thr274
Acarbosa	0.78	-8.3	^b Tyr155, ^b Glu274, ^b Gln276, ^b His277, ^b Asp304, ^b Thr307, ^b Arg312, ^c Arg439

^a Interacción hidrofóbica; ^b puente de hidrógeno; ^c puente salino.

En el caso del estudio de acoplamiento del producto **46** con la subunidad C-terminal de la enzima humana maltasa-glucoamilasa se encontró que se une a un sitio diferente que los derivados deshidrogenados (Figura 30), pero ninguno de los tres compuestos se une al sitio catalítico, como la acarbosa; las energías de unión se muestran en la Tabla 19. Sin embargo, la energía de unión de del isómero **167a** (3*S*,4*S*) por la enzima fue mejor que la de la acarbosa (-7.1 *vs* -6.3 kcal/mol, respectivamente).

El tipo de interacciones para **46**, **167a** y **167b** fueron en su mayoría hidrofóbicas, sin embargo, para la enzima CtMGAM también se observaron interacciones tipo π -stacking y puentes salinos.

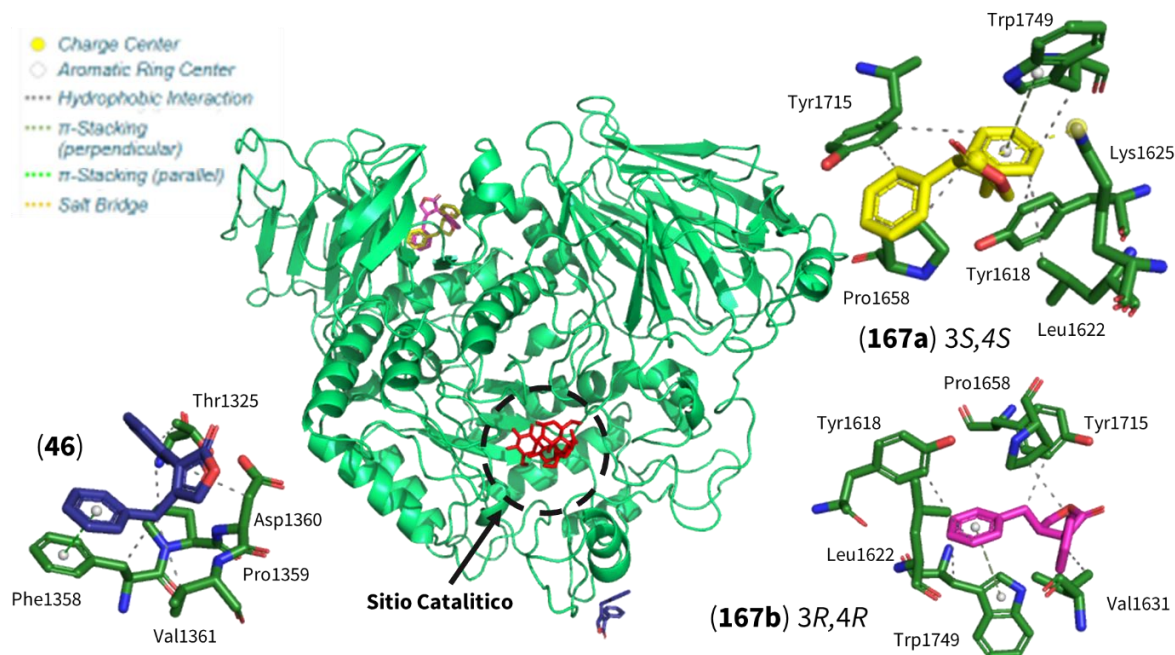


Figura 30. Modelo estructural de los sitios de unión de la subunidad C-terminal de la maltasa glucoamilasa de humano (PDB:3TOP) representada en caricatura verde claro, con los compuestos **46** (azul rey), **167a** (amarillo) y **167b** (magenta). La acarbosa está representada en color rojo en el sitio catalítico de la enzima. Las imágenes fueron generadas con PyMOL.

Tabla 19. Análisis de resultados de docking para los compuestos **46**, **167a** y **167b** en la enzima CtMGAM (PDB: 3TOP).

Compuesto	K_i (μM)	Energía libre de unión (kcal/mol)	Residuos que interactúan
46	54.08	-5.8	^a Thr1325, ^{a,b} Phe1358, ^a Pro1359, ^a Asp1360, ^a Val1361
167b (3R,4R)	16.52	-6.5	^a Tyr1618, ^a Leu1622, ^a Val1631, ^a Pro1658, ^a Tyr1715, ^{a,b} Trp1749
167a (3S,4S)	5.98	-7.1	^a Tyr1618, ^a Leu1622, ^c Lys1625, ^a Pro1658, ^a Tyr1715, ^{a,b} Trp1749
Acarbosa	23.18	-6.3	^a Trp1355, ^a Phe1559, ^d Asp1157, ^d Lys1460, ^d Arg1510, ^d Asp1526, ^d His1584, ^d Thr1528

^a Interacción hidrofóbica, ^b π -stacking, ^c puente salino, ^d puente de hidrógeno.

Evaluación enzimática de los metabolitos en la enzima PTP-1B

El extracto líquido generado del medio CPD fue evaluado sobre la enzima PTP-1B, y mostró una actividad inhibitoria moderada de la enzima (Tabla 7), por lo que sus metabolitos también fueron evaluados. De ellos, el compuesto **121** presentó buena actividad con una concentración inhibitoria media de $CI_{50} = 0.08 \pm 0.004$ mM (Figura 31), este valor indica que el compuesto es menos potente que el control positivo ácido ursólico (AU) ($CI_{50} = 0.006 \pm 0.002$ mM), sin embargo, el compuesto inhibe a la enzima cerca del 90%.

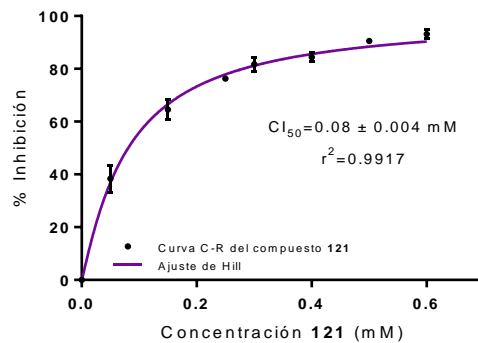


Figura 31. Curva C-R del compuesto **121** sobre la enzima PTP-1B.

Posteriormente se determinó el tipo de inhibición que ejerce este compuesto sobre la enzima, utilizando las concentraciones de 0.03, 0.07 y 0.1 mM, en una curva de saturación por sustrato. Se realizó el análisis estadístico de los resultados y se encontró que el tipo de inhibición es no competitiva ($r^2=0.9923$). Adicionalmente, en el gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 32) se observó la intersección de las líneas en el eje x, lo que confirma el tipo de inhibición. Este tipo de inhibición indica que el compuesto **121** se une a un sitio alostérico de la enzima.

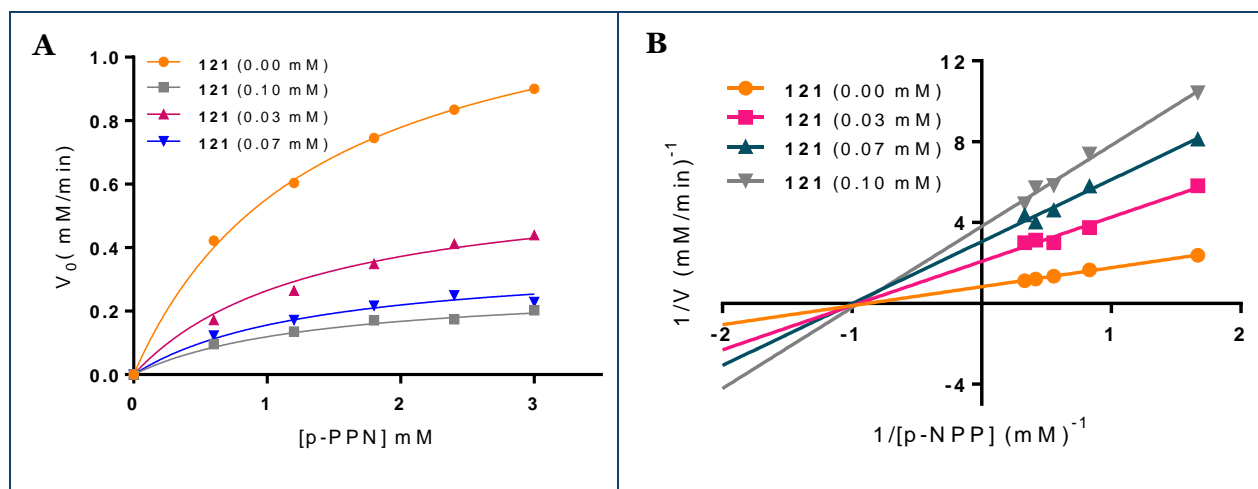


Figura 32. Gráficos de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de las curvas de saturación por sustrato de la inhibición de la enzima PTP-1B a diferentes concentraciones del inhibidor **121**.

Estudios de acoplamiento y dinámica molecular del compuesto **121** en PTP-1B

El análisis de acoplamiento molecular del compuesto **121** fue realizado con la enzima humana recombinante PTP-1B (PDB: 1T49). Como se muestra en la Figura 33, el compuesto **121** se une a un sitio alostérico bien conocido (Li *et al.*, 2014; Wiesmann *et al.*, 2004) lo cual es congruente con el tipo de inhibición obtenida en los estudios de cinética enzimática, y presenta interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y π -stacking (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de resultados de acoplamiento y dinámica molecular de los compuestos **121** y ácido ursólico en la enzima PTP-1B (PDB: 1T49).

Compuesto	K_i (μM)	Energía libre de unión (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	Residuos que interactúan
121	4.26	-7.3	-29.58 ± 3.71	^{a,b} Ala189, ^a Leu192, ^c Phe280, ^a Glu276
Ácido ursólico	27.47	-6.2	-24.99 ± 2.61	^a Phe196, ^a Phe280, ^a Ile281

^a Interacción hidrofóbica, ^b Puente de hidrógeno, ^c π -stacking.

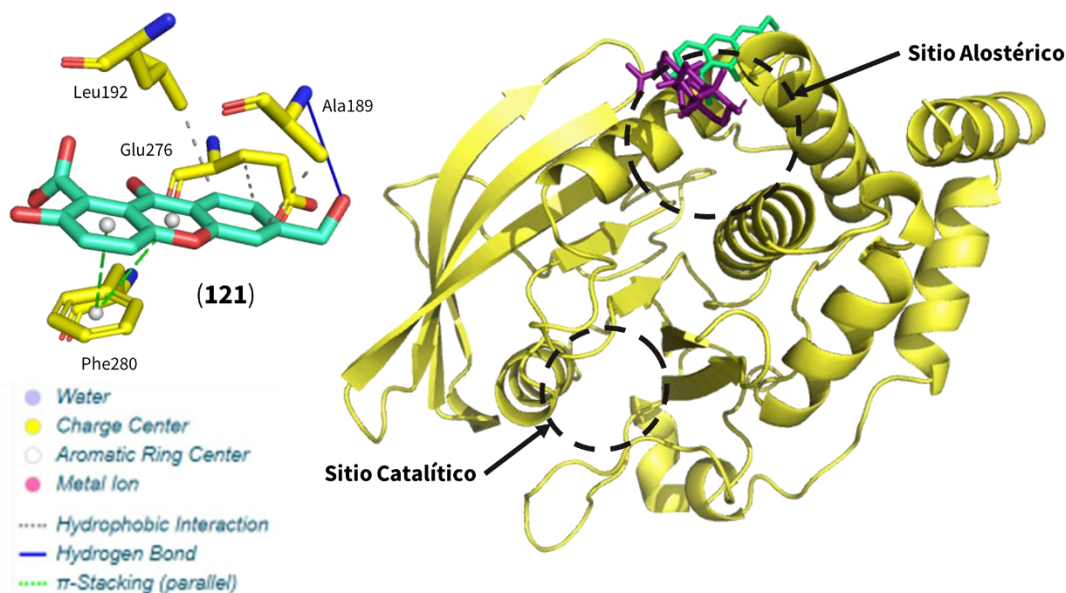


Figura 33. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima PTP-1B (PDB:1T49) representada en caricatura amarilla, con el compuesto **121** (verde agua). El ácido ursólico, control positivo, está representado en color morado en el sitio alostérico de la enzima. Las imágenes fueron generadas con PyMOL.

También se realizaron estudios de dinámica molecular (Tabla 20 y en la Figura 34); los resultados indicaron un valor de ΔG negativo y una interacción estable entre la enzima y el compuesto **121** a través del tiempo.

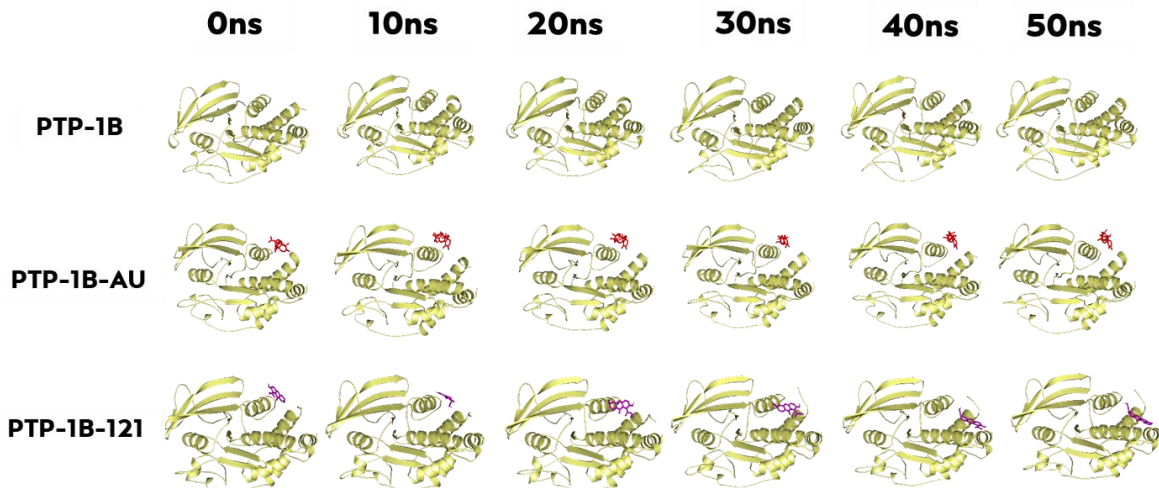


Figura 34. Modelos estructurales de la dinámica molecular en el sitio alostérico de la enzima PTP-1B con el compuesto **121** y el control positivo ácido ursólico (AU).

Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química-medicinal y toxicológicas del compuesto **121**.

El compuesto **121**, al poseer propiedades bioactivas frente a la PTP-1B también fue analizado con las herramientas computacionales SwissADME y Osiris.

Las propiedades fisicoquímicas, representadas en el radar de biodisponibilidad indicaron buenos resultados excepto en la parte de insaturaciones. Las propiedades farmacocinéticas también fueron favorables, ya que el compuesto **121** no es sustrato de la glicoproteína P, tiene buena permeabilidad gastrointestinal, no atraviesa la barrera hematoencefálica (Figura 35), ni inhibe ninguna isoforma del CYP450. Además, la xantona **121** es permeable a las membranas gastrointestinales, sigue todas las reglas de “*drug-likeness*” y no muestra PAINS ni violaciones de “*lead-likeness*”, sin embargo, se mostró una alerta debido a su núcleo policíclico.

Finalmente, con el programa Osiris se evaluó el riesgo de toxicidad del compuesto **121**, donde no se mostraron alertas de tumorigenicidad, pero si se indicó una alerta de mutagenicidad, de efectos irritantes y reproductivos, por lo que habría que completar esta información predictiva con estudios experimentales.

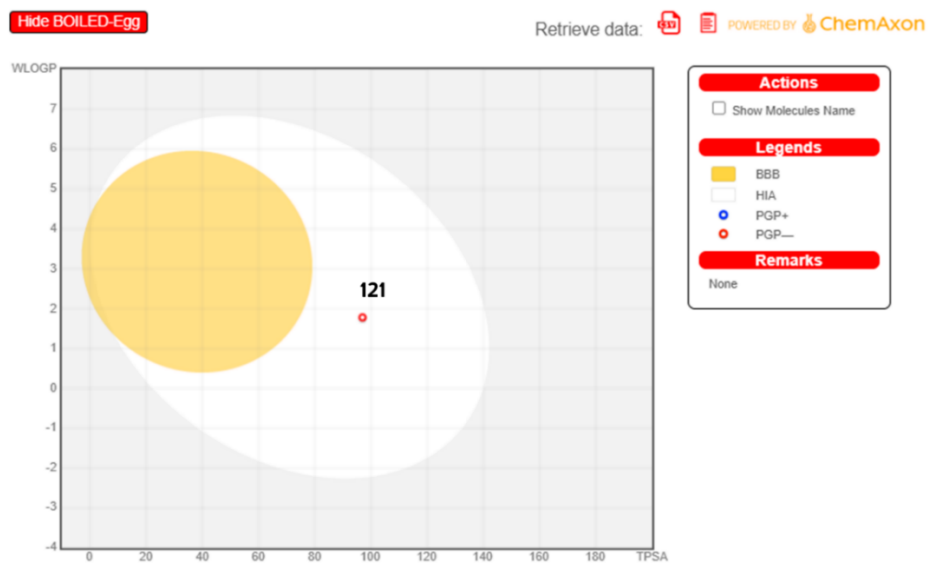


Figura 35. Gráfico tipo BOILED-EGG del compuesto **121**, donde se muestra la permeabilidad en barrera hematoencefálica (BBB) indicada en color amarillo, la permeabilidad intestinal (HIA) indicada en color blanco y si el compuesto es sustrato a la glicoproteína P (PGP+/PGP-).

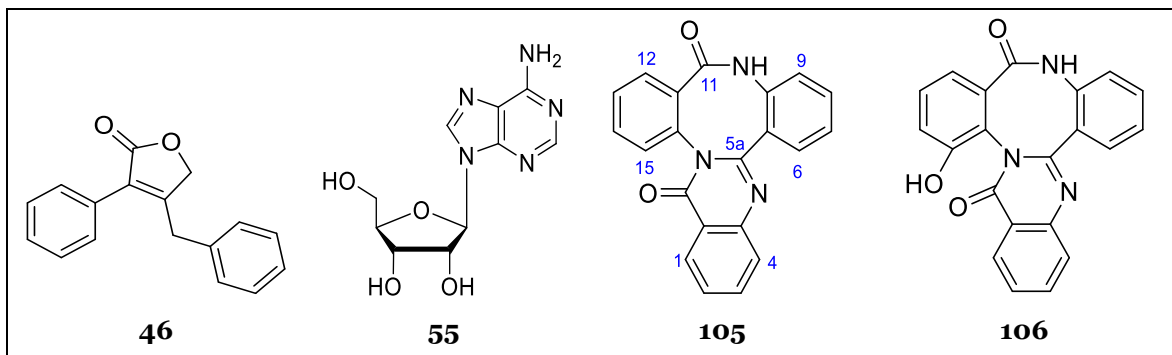
Malbranchea flocciformis

El hongo *M. flocciformis* fue obtenido de la ATCC (34530). Con base en las pruebas de extracción en pequeña escala, se realizó el cultivo a mediana escala utilizando dos fermentadores con 6 litros de caldo papa dextrosa enriquecido con nicotinamida (NA, 50 μ M), esto con la finalidad de estimular epigenéticamente la producción de metabolitos secundarios. La nicotinamida es un inhibidor de las desacetilasas de histonas dependiente de NAD⁺, por lo que al utilizarlo se llevan a cabo modificaciones epigenéticas que activan genes que en condiciones normales se encuentran silenciados (Asai *et al.*, 2016).

Para este hongo, también se hará primero la descripción de los metabolitos obtenidos y posteriormente los resultados de la evaluación biológica de los mismos.

Estudio químico del hongo

Como se mencionó en la parte experimental, se aislaron cuatro metabolitos del medio de cultivo líquido CPD en agitación con el aditivo NA. Estos metabolitos fueron los compuestos gymnoascólido A (**46**), la adenosina (**55**) y los trímeros de ácido antranílico **105** y **106**, cuyas estructuras se muestran en el Cuadro 31.



Cuadro 31. Metabolitos aislados del hongo *Malbranchea flocciformis*.

Gymnoascólido A (46)

De *M. flocciformis* también se aisló el compuesto gymnoascólido A (**46**), que como se desprende de este trabajo está presente en varias especies de *Malbranchea* (*Malbranchea filamentosa*, *M. dendritica* y *M. flocciformis*).

Adenosina (55)

El compuesto adenosina fue aislado como un sólido blanco, en esta ocasión fue obtenido de forma pura y su elucidación fue más sencilla, además de que se observaron los mismos patrones del núcleo purina que se describieron previamente.

Trímero de ácido antranílico (105)

El compuesto **105** se obtuvo como un polvo blanco, la identificación del compuesto se realizó mediante la información de RMN, que se encuentra indicada en la Tabla 21, particularmente el patrón de las señales en el espectro de ^1H -RMN. Este compuesto fue identificado como un trímero de ácido antranílico aislado previamente del hongo *M. circinata* (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020).

Tabla 21. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **105** en CD_3OD (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	128.0	8.28 d (1.3, 8.2)
2	129.1	7.56 dd (3.1, 6.3)
3	136.6	7.90 ddd (2.6, 6.3, 11.0)
4	128.4	7.77 d (7.7)
4a	148.5	
5a	155.2	
5b	135.1	
6	130.5	7.63 td (1.0, 7.0)
7	129.1	7.29 m
8	132.6	7.43 td (1.5, 7.8)
9	127.4	7.16 dd (0.9, 8.0)
9a	137.7	
11	171.9	
11a	134.7	
12	128.7	7.46-7.48 m
13	131.2	7.46-7.48 m
14	132.2	7.46-7.48 m
15	129.6	7.35 td (1.1, 7.6)
15a	135.5	
17	163.1	
17a	122.0	

Con la finalidad de obtener mayor cantidad de este compuesto, se realizó la síntesis *de novo* del mismo, como se indicó en la sección de metodología, y se pudo confirmar la estructura química del compuesto **105**. En las Figuras 36 y 37 se puede observar la comparación de los espectros de RMN del producto natural y del producto de síntesis. Las diferencias en los desplazamientos químicos que se aprecias se deben a que los espectros fueron adquiridos en disolventes diferentes.

Adicionalmente, la estructura química del compuesto **105** fue confirmada mediante análisis por difracción de rayos X, la estructura ORTEP generada se muestra en la Figura 38.

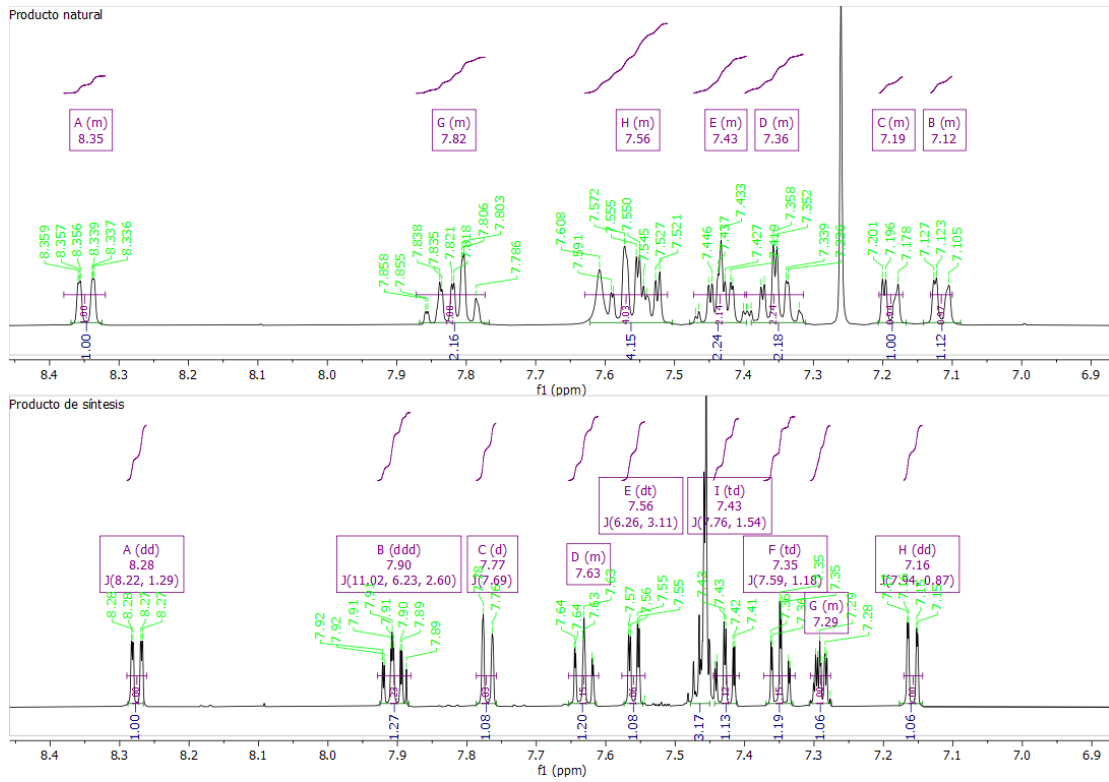


Figura 36. Comparación de los espectros de ^1H -RMN del producto natural adquirido en CDCl_3 y el producto de síntesis adquirido en CD_3OD .

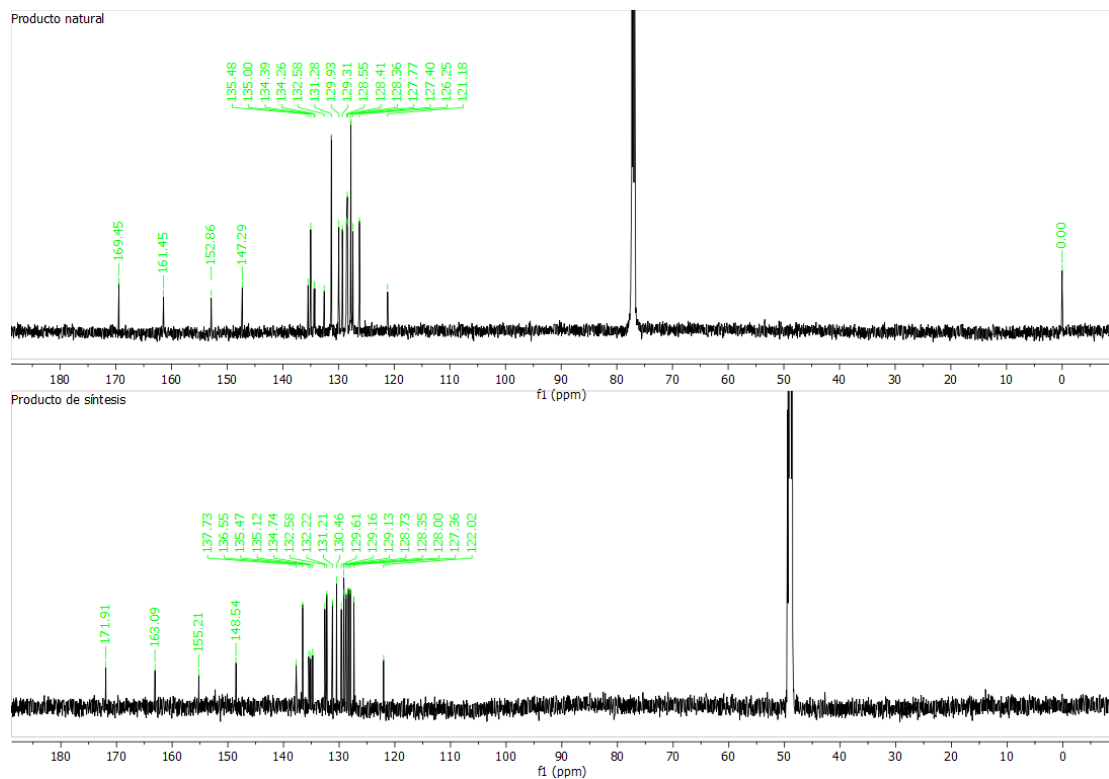


Figura 37. Comparación de los espectros de ^{13}C -RMN del producto natural adquirido en CDCl_3 y el producto de síntesis adquirido en CD_3OD .

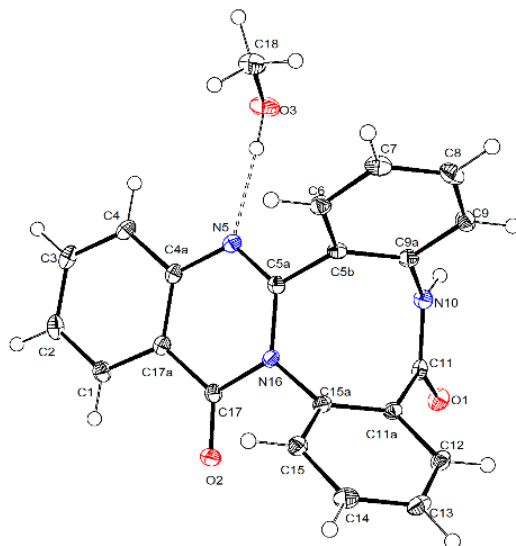


Figura 38. Estructura ORTEP generada por el análisis de difracción de rayos X del compuesto **105**.

Trímero de ácido antranílico hidroxilado (106)

El compuesto **106** fue obtenido como un polvo blanco, la elucidación estructural del metabolitos fue sencilla ya que los desplazamientos de ^1H y ^{13}C -RMN eran muy similares a los del compuesto **105**, sin embargo habían diferencias importantes (Tabla 22), como el cambio en los desplazamientos en H-12, H-13 y H-14 de δ_{H} 7.46-7.48 a δ_{H} 6.88, δ_{H} 7.25 y δ_{H} 6.88, respectivamente; así como la ausencia de la señal de hidrógeno en la posición C-15, que ahora se encuentra sustituido por un grupo hidroxilo, como lo sugiere su desplazamiento químico (δ_{C} 152.5) en el espectro de ^{13}C -RMN.

Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **106** en CD_3OD (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	127.9	8.27dd (1.1, 8.0)
2	129.0	7.61 m
3	136.4	7.90 td (0.8, 7.6)
4	128.3	7.76 d (7.8)
4a	148.7	
5a	155.9	
5b	135.3	
6	129.9	7.61 m
7	129.1	7.36 td (1.2, 7.6)
8	132.6	7.44 td (1.7, 7.7)
9	127.6	7.15 dd (1.0, 7.9)
9a	137.8	
11	172.2	
11a	135.7	
12	118.5	6.88 m

13	132.4	7.25 m
14	119.1	6.88 m
15	153.9	
15a	123.1	
17	162.4	
17a	121.9	

Evaluación biológica del compuesto 105

De acuerdo con los estudios previos realizados por Rangel-Grimaldo *et al.* (2020), **105** posee actividad como inhibidor de las enzimas α -glucosidasas y PTP-1B, con $CI_{50} = 144.5 \pm 4.9 \mu M$ y $106.2 \pm 1.6 \mu M$, respectivamente, por lo que se evaluó su potencial como agente antidiabético *in vivo* mediante una serie de evaluaciones en ratones macho de la cepa CD-1 obtenidos del proveedor Círculo ADN S.A. de C.V. Los experimentos se realizaron en ratones normo e hiperglucémicos.

Prueba de tolerancia a la sacarosa oral

Con la finalidad de comprobar *in vivo* el efecto inhibitorio sobre las α -glucosidasas, se realizó una prueba de tolerancia a la sacarosa oral. El experimento consistió en administrar el tratamiento (diferentes dosis del compuesto **105**) por vía i.g. y treinta minutos después se administró una carga de sacarosa (2 g/kg). Se realizaron mediciones de los niveles de glucosa a diferentes tiempos del estudio.

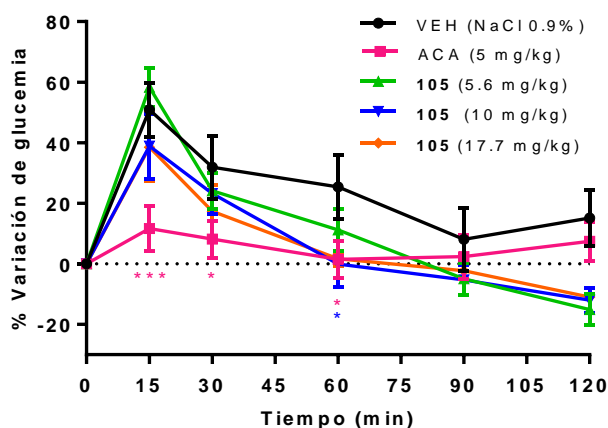


Figura 39. Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones del producto **105**. VEH: vehículo; ACA: acarbosa. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05 y *** p < 0.001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.

De acuerdo con los resultados de esta prueba, mostrados en la Figura 39, el compuesto **105** no disminuye el pico posprandial tras la administración de sacarosa. Este hallazgo apoya el pobre efecto inhibitorio del compuesto **105** contra las enzimas α -glucosidasas de mamífero; en una

prueba realizada *in vitro* se observó que el compuesto a 3 mM apenas inhibe en un 20 % la actividad de estas enzimas. Por lo que este compuesto se descartó como metabolito con potencial antidiabético en este mecanismo de acción.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* de la inhibición de la PTP-1B, se realizaron una serie de experimentos *in vivo* que podrían evidenciar el posible efecto de la inhibición de esta enzima, pero aplicada a modelos murinos. En primer lugar, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral.

Prueba de tolerancia a la glucosa oral

El experimento se realizó en ratones normo e hiperglucémicos. En general el estudio consistió en administrar el tratamiento (diferentes dosis del compuesto **105**) por vía intragástrica a los animales de experimentación, treinta minutos después se administró una carga de glucosa (1 g/kg) *i.g.*, y se realizaron mediciones de los niveles de glucosa a diferentes tiempos.

De acuerdo con los resultados de esta prueba, mostrados en la Figura 40, se puede observar que el compuesto **105** disminuye significativamente el pico posprandial a todas las dosis tanto en ratones normoglucémicos como en los hiperglucémicos, lo que indica que el compuesto tiene una acción como sensibilizador de la insulina. Es posible que mediante la inhibición de la PTP-1B, se mantiene por más tiempo la señalización de la insulina y en consecuencia el transportador GLUT-4 permanece en la membrana más tiempo, permitiendo la entrada de glucosa a los tejidos blanco y por ende se observa la disminución del pico posprandial.

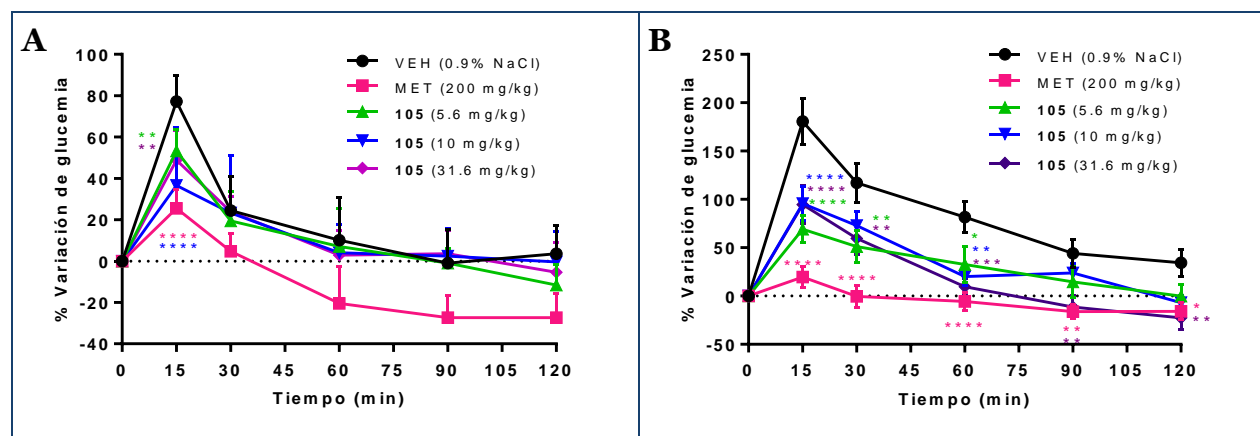


Figura 40. Curvas de tolerancia a la glucosa del producto **105** en A) ratones normoglucémicos y B) ratones hiperglucémicos. VEH: vehículo; MET: metformina. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p < 0.0001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.

Prueba de efecto hipoglucemiante

Otra prueba de rutina, involucrada en el establecimiento del posible efecto antidiabético de un compuesto es el experimento de efecto hipoglucemiante, el cual consiste en la administración de los tratamientos *per os* y la medición de los niveles de glucosa desde el inicio del experimento y hasta las cinco horas siguientes. Esto con el propósito de comprobar su efecto hipoglucemiante en condiciones de ayuno.

En este caso el compuesto **105** presentó efecto hipoglucemiante únicamente en ratones normoglucémicos (Figura 41A) no así en ratones hiperglucémicos (Figura 41B), lo que sugiere que el mecanismo de acción de este compuesto requiere un funcionamiento adecuado de las células β -pancreáticas para la producción normal de insulina, y aunque la dosis de STZ administrada fue la misma que en el caso anterior, no se descarta una variabilidad biológica de los animales utilizados en este experimento.

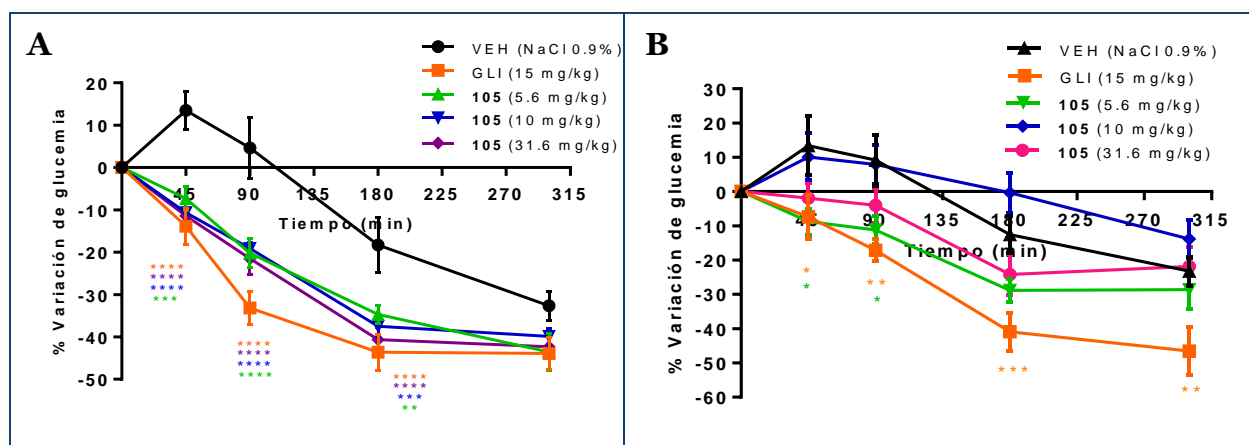


Figura 41. Curvas de efecto hipoglucemiante del producto **105** en A) ratones normoglucémicos y B) ratones hiperglucémicos. VEH: vehículo; GLI: glibenclamida. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p < 0.0001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.

Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, de química-medicinal y toxicológicas del compuesto 105.

Debido a la buena actividad observada en los estudios *in vivo* del compuesto **105**, nuevamente se realizaron estudios de “*drug-likeness*” de este compuesto utilizando los softwares SwissADME (Daina *et al.*, 2017) y Osiris Property Explorer.

Como ya se mencionó en los otros metabolitos con buena actividad, primero se predijeron las actividades fisicoquímicas, las cuales están resumidas en el radar de biodisponibilidad (Figura 42) donde se puede observar que el compuesto **105** está en el rango óptimo para cinco de las seis

propiedades, siendo nuevamente la propiedad de insaturaciones la que está fuera del rango óptimo.

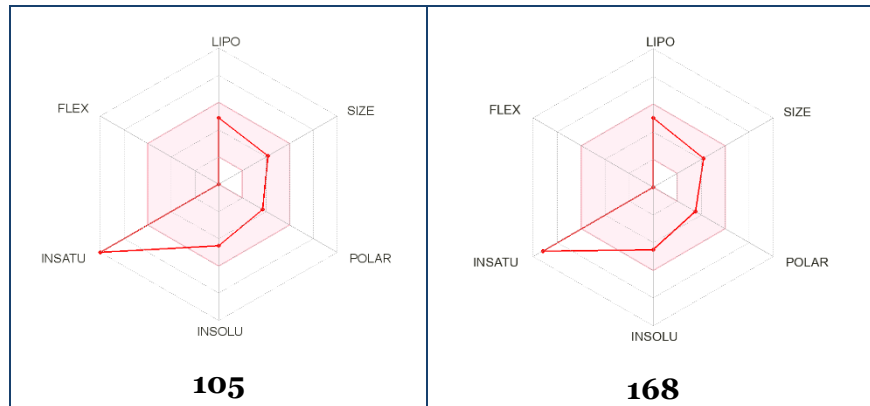


Figura 42. Radar de biodisponibilidad de los compuestos **105** y **168** obtenidos con el programa SwissADME.

Las propiedades farmacocinéticas mostraron una buena permeabilidad gastrointestinal y de la barrera hematoencefálica; también se observó que el compuesto **105** no es sustrato de la glicoproteína P (Figura 43). Otros resultados en esta área mostraron que el compuesto **105** tiene la capacidad de inhibir las isoformas CYP1A2 del citocromo P450, lo cual indica una alerta para la posible interacción farmacológica con otros fármacos.

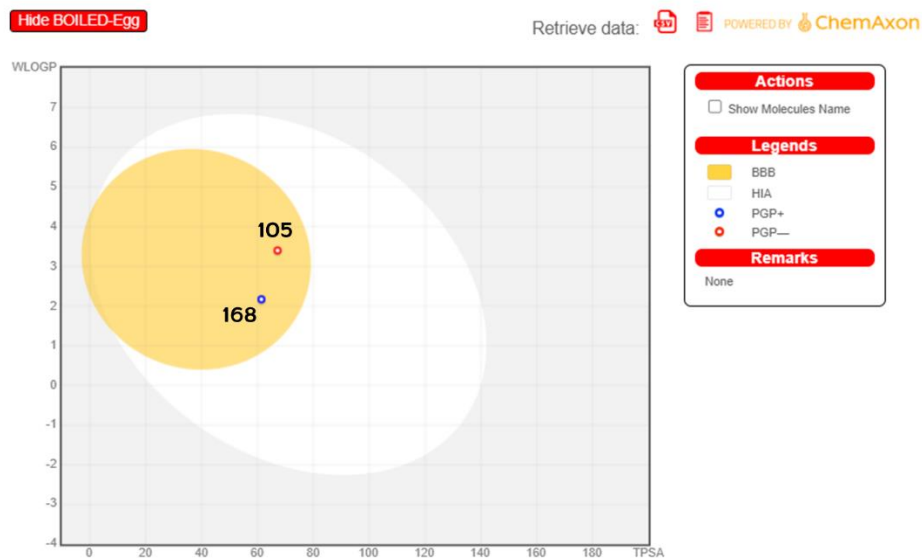


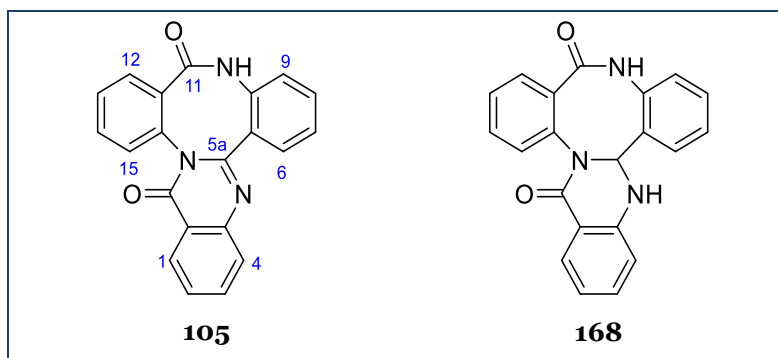
Figura 43. Gráfico tipo BOILED-EGG de los compuestos **105** y **168**, donde se muestra la permeabilidad en barrera hematoencefálica (BBB) indicada en color amarillo, la permeabilidad intestinal (HIA) indicada en color blanco y si el compuesto es sustrato a la glicoproteína P (PGP+/PGP-).

Por otro lado, las características de química farmacéutica mostraron que el compuesto **105** es un buen candidato a fármaco ya que no mostró alertas de Brenk, PAINS, ni violaciones “lead-

likeness". Además, este producto sigue cinco reglas clásicas (Lipinski, Egan, Veber, Muegee y Ghose) que determinan la factibilidad de un producto de convertirse en fármaco.

Finalmente, el riesgo de toxicidad se estimó con el programa Osiris y los resultados no mostraron alertas de mutagenicidad, tumorigenicidad ni irritación, sin embargo, se obtuvo una alerta moderada de efectos en la reproducción.

Nuevamente, con el objetivo de mejorar las propiedades fisicoquímicas, que impactan en la biodisponibilidad del fármaco, se decidió realizar la reducción de la imina presente en el compuesto **105**, lo que llevaría a la obtención del compuesto **168** mostrado en el Cuadro 32.



Cuadro 32. Compuesto **105** y su derivado reducido **168**.

El compuesto **168**, fue nuevamente analizado con las herramientas computacionales y se mostraron prácticamente las mismas características que el compuesto **105**, con excepción de la susceptibilidad del compuesto a la glicoproteína-P (Figura 43). En cuanto al radar de biodisponibilidad, la línea roja fuera del área óptima se vio un poco disminuida (Figura 42), lo que indica que el compuesto **168** podría presentar una mayor biodisponibilidad que el compuesto **105**.

Adicionalmente, el programa Osiris indicó que no existe riesgo de toxicidad alguna para para el caso del compuesto **168**, eliminándose incluso la alerta moderada de efectos irritantes del compuesto original **105**.

Trímero de ácido antranílico reducido (168)

El compuesto **168** fue preparado con la metodología descrita por Eguchi y colaboradores (1992) como se indicó en la parte experimental. El compuesto **168** fue aislado como un polvo blanco, el análisis de su espectro de masas ESI en modo positivo $[M+H]^+$ mostró una relación m/z de 342.124, en armonía con la adición de dos unidades de masa por la reducción del doble enlace de la imina. La rotación óptica específica obtenida fue $[\alpha]_D^{20} = +2.9$ ($c = 0.7$, MeOH), lo que indica que el compuesto se encuentra en forma de mezcla racémica, esto debido a la generación de un

centro asimétrico en la posición 5a. La caracterización estructural se realizó mediante RMN, donde se pudo observar la eliminación de la imina con el cambio en el desplazamiento en ^{13}C -RMN de δ_{C} 155.2 a δ_{C} 75.04, además de la identificación del protón adicionado en la imina con un δ_{H} de 6.18 (Figuras 44 y 45).

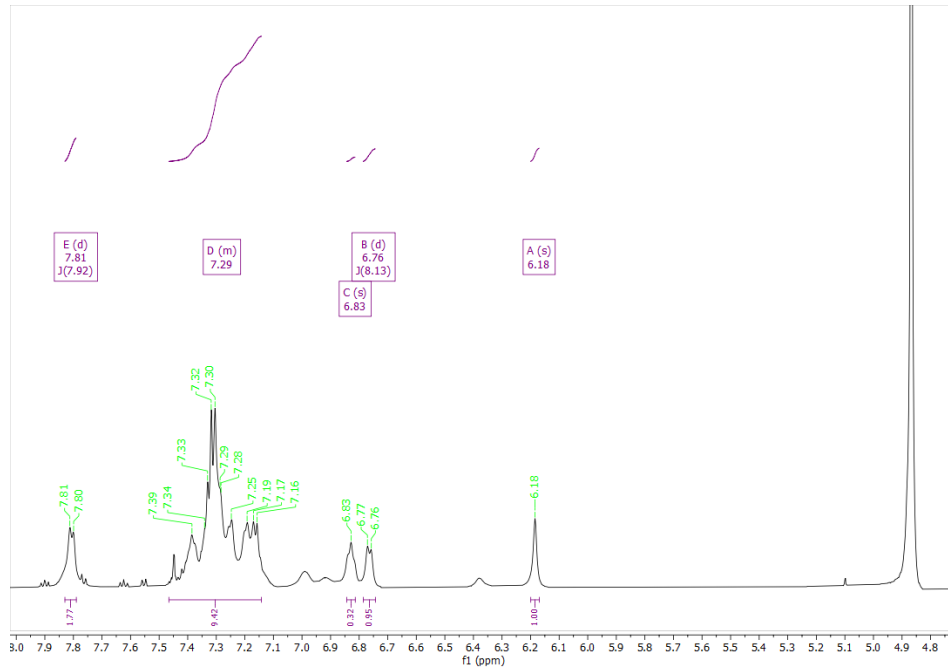


Figura 44. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **168** en CD_3OD a 400 MHz.

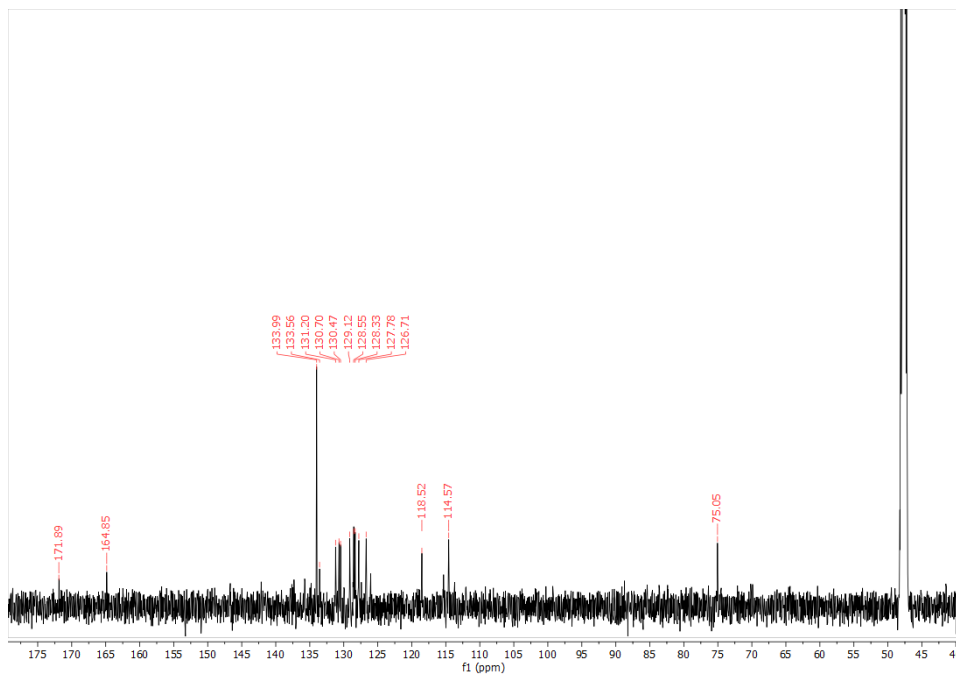


Figura 45. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **168** en CD_3OD a 100 MHz.

Evaluación biológica del compuesto 168.

Con la finalidad de comprobar la mejora en la actividad biológica del compuesto **168** respecto al compuesto **105**, se evaluaron ambos compuestos en la enzima PTP-1B *in vitro*, donde se observó que el derivado hidrogenado presentó una mejor actividad frente a la enzima, el compuesto **105** presentó actividad inhibitoria de 70% a una concentración de 0.5 mM, mientras que el compuesto **168** fue más potente, al obtenerse una $CI_{50} = 0.258 \pm 0.006$ mM, la curva concentración respuesta se muestra en la Figura 46.

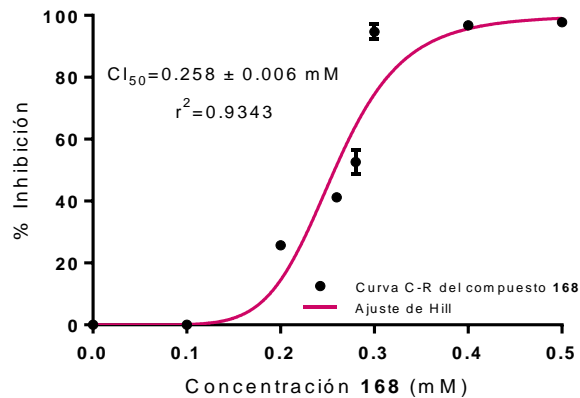


Figura 46. Curva C-R del compuesto **168** en la enzima PTP-1B.

Posteriormente, al igual que en el caso del producto **105**, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral con el compuesto **168** en ratones normo e hiperglucémicos, donde se observó el abatimiento del pico posprandial al igual que el compuesto original (Figura 47), en este caso también se observó un mejor efecto en los ratones hiperglucémicos, lo que muestra su potencial como agente antidiabético. Es probable que el efecto observado *in vitro* de la inhibición de la PTP-1B esté relacionado a los efectos mostrados *in vivo*.

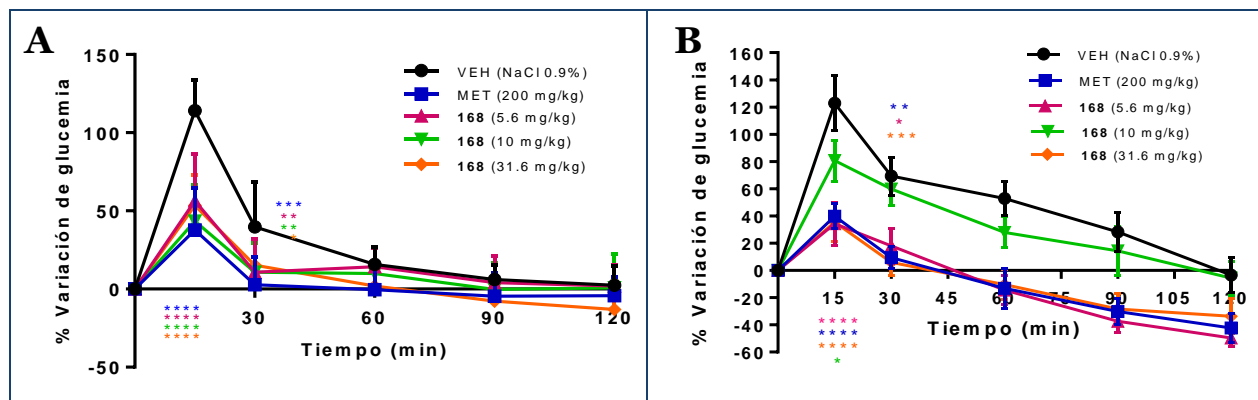


Figura 47. Curvas de tolerancia a la glucosa en A) ratones normoglucémicos y B) ratones hiperglucémicos para el compuesto **168**. VEH: vehículo; MET: metformina. Cada punto representa la media \pm EEM (n=8). *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p < 0.0001 representa diferencia significativa en una ANOVA de dos vías seguida de una prueba Dunnett para comparación múltiple respecto al vehículo.

Evaluación de los compuestos 105 y 168 sobre la secreción de insulina

Con la finalidad de continuar explorando el posible mecanismo de acción tanto del compuesto **105** como de su derivado reducido (**168**), se realizó un ensayo de evaluación de secreción de insulina a altas y bajas concentraciones de glucosa, tal como se indicó en la parte experimental.

Para el caso del compuesto **105** (Figura 48) a bajas concentraciones de glucosa no se favorece la secreción de insulina a ninguna de las concentraciones evaluadas; por otro lado, en el caso de altas concentraciones de glucosa, se pudo observar que si se aumenta de forma significativa la secreción de insulina a la concentración de 5 μM de compuesto **105**, esto es congruente con lo observado en los experimentos *in vivo*, donde se pudo observar un mejor desempeño del compuesto **105** en la PTGO que en el experimento de efecto hipoglucemiante.

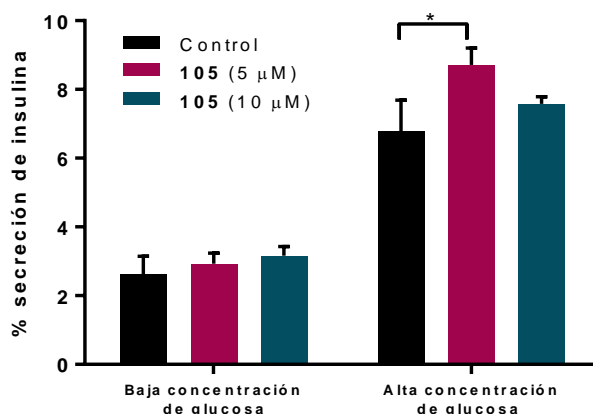


Figura 48. Efecto del compuesto **105** en la secreción de insulina en células de insulinoma de rata. Cada barra representa la media \pm EEM ($n=4$). * $p < 0.05$ representa diferencia significativa en una ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey para comparación múltiple respecto al vehículo.

Para el caso del compuesto **105** se puede observar que es necesaria la presencia de altas concentraciones de glucosa para favorecer la secreción de insulina, es decir, no es un secretagogo clásico como la glibenclamida. Los secretagogos clásicos liberan insulina de forma independiente a las concentraciones de glucosa presente en el cuerpo (Dahlén *et al.*, 2022) y el compuesto **105** es un tipo de secretagogo que requiere presencia de glucosa en el cuerpo para las células β -pancreáticas liberen insulina, este compuesto podrían ser agonista del receptor GPR119 (Kerru *et al.*, 2018), o bien podría estar involucrado con el sistema de las incretinas, particularmente como inhibidor de la DPP-4, ya que es un compuestos pequeño y no un péptido largo como los análogos de incretinas. Es necesario descartar o confirmar su papel en el sistema de incretinas mediante estudios *in vivo*, por ejemplo, realizando una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

Por otro lado, para el compuesto **168** (Figura 49), se pudo observar que, tanto a altas como bajas concentraciones de glucosa, a una concentración de 10 μM favorece la secreción de insulina. En el experimento a baja concentración de glucosa no se pudo observar una diferencia significativa debido a la dispersión de los datos del grupo control, pero a altas concentraciones si se observa esta diferencia más marcada. Este derivado podría funcionar como un secretagogo clásico ya que funciona de forma independiente a la concentración de glucosa en el cuerpo, sería necesario realizar *in vivo* una prueba de efecto hipoglucemiante y confirmar su acción.

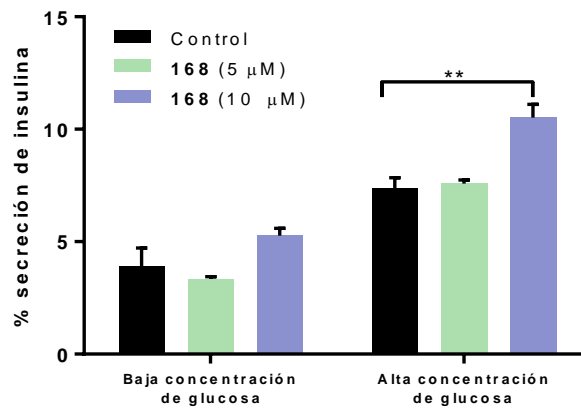


Figura 49. Efecto del compuesto **168** en la secreción de insulina en células de insulinoma de rata. Cada barra representa la media \pm EEM (n=4). **p < 0.01 representa diferencia significativa en una ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey para comparación múltiple respecto al vehículo.

Malbranchea arcuata

El hongo *M. arcuata* fue obtenido de la ATCC (34523). El cultivo se realizó en varias series ya que el rendimiento obtenido era muy pobre por cada matraz cultivado. La relevancia de este hongo se identificó debido a una contaminación fortuita con otro hongo, donde se observó un halo de inhibición alrededor del micelio de *M. arcuata* (Figura 50).

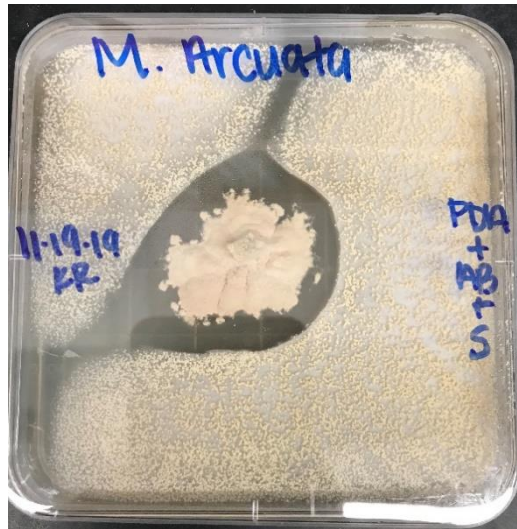
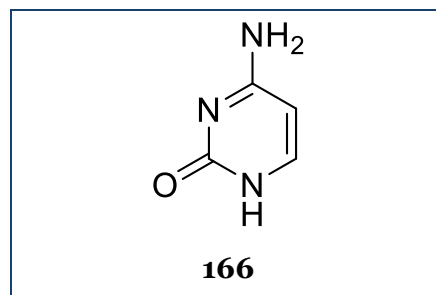


Figura 50. *Malbranchea arcuata* con un halo de inhibición frente a otro microorganismo fúngico.

Por cuestiones de tiempo, solo se logró el aislamiento de 2 metabolitos, cuya descripción se realizará a continuación.

Citosina (166)

El compuesto **166** (Cuadro 33) fue aislado como un sólido blanco, su caracterización se realizó mediante análisis de RMN (Tabla 23), donde se pudieron identificar cuatro señales en el espectro de ^{13}C -RMN y cuatro en el espectro de ^1H -RMN donde se identificó el núcleo pirimidina. En este caso se obtuvo la base nitrogenada ya que no se observó la presencia de un residuo de pentosa, se realizó la comparación de las señales con aquellas descritas en la literatura (Pretsch *et al.*, 2020) y se confirmó la identificación del compuesto **166** como citosina.



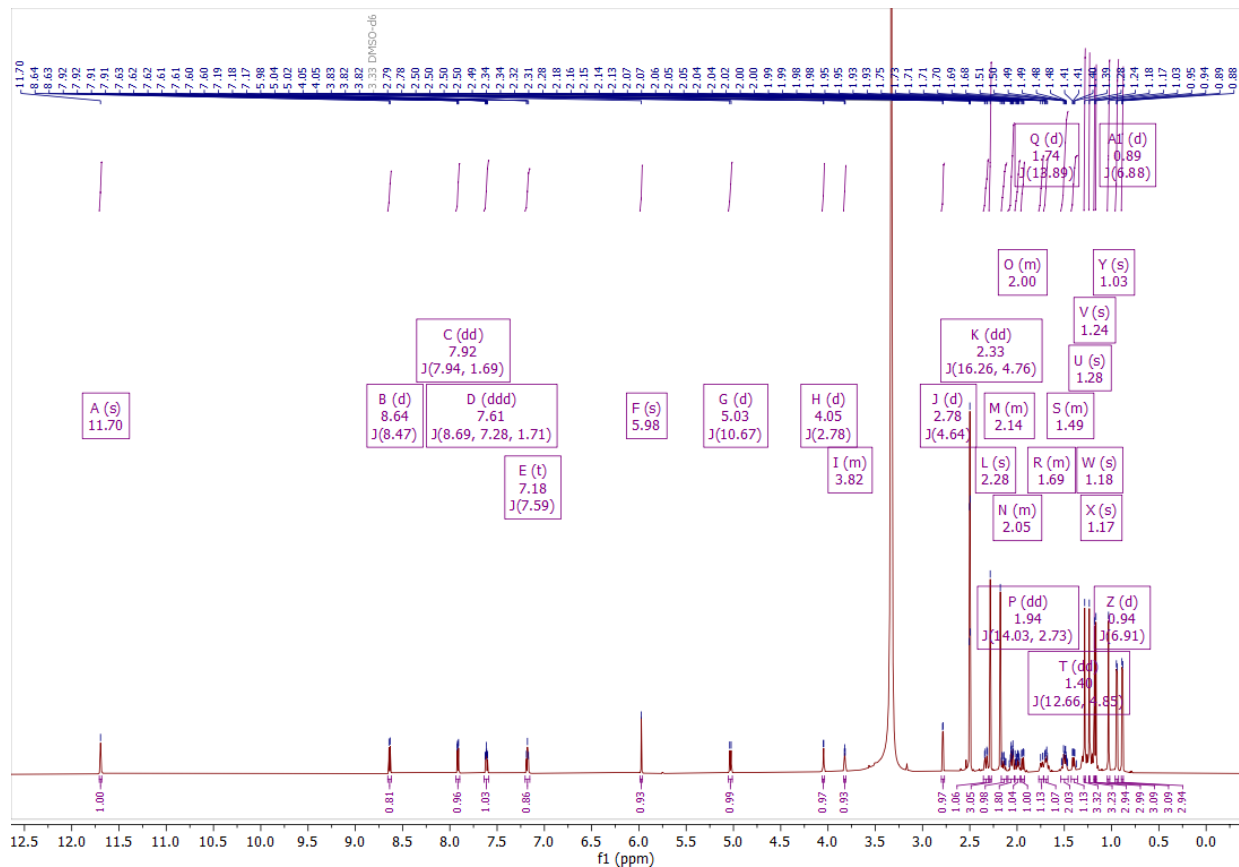
Cuadro 33. Estructura química de la citosina (**166**).

Tabla 23. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **166** en DMSO- δ_6 (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	164.4	
2	100.2	5.45 d ($J=7.6$)
3	142.2	7.39 d ($J=7.6$)
4	151.6	
NH		11.01, 10.81

RM11PEP

El compuesto RM11PEP, fue aislado como un sólido blanco, se realizó su análisis de RMN (Figuras 51 y 52) donde se pudieron identificar aparentemente 38 señales de carbono y 27 señales de protones, la relación m/z en modo ESI positivo fue de 679.3926, lo que llevó a varias fórmulas moleculares, sin embargo, ninguna se adaptaba completamente a lo observado en el espectro de RMN. Se intentó realizar la elucidación estructural pero solo se obtuvieron fragmentos del compuesto. No obstante, se pudieron identificar residuos de ácido antranílico y del aminoácido valina, entre otros.

Figura 51. Espectro de ^1H -RMN del compuesto RM11PEP en DMSO- δ_6 (700 MHz).

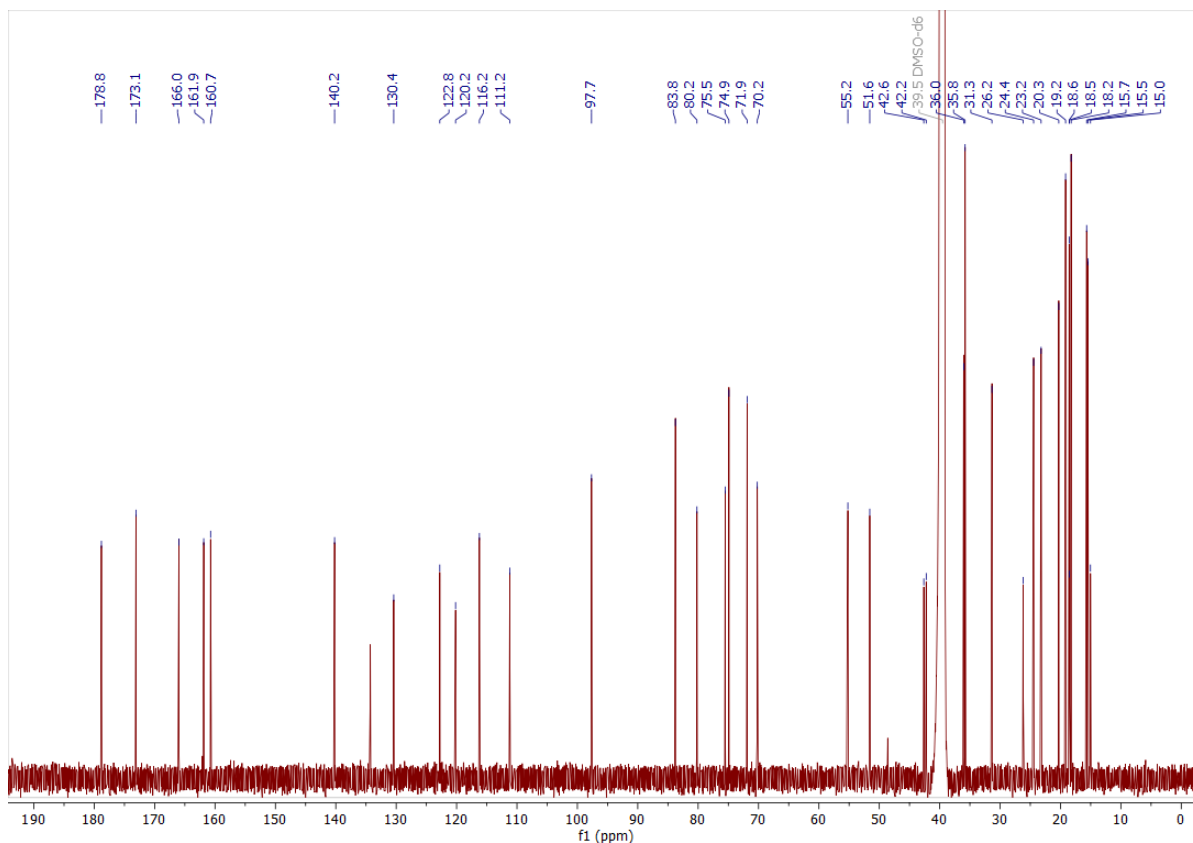


Figura 52. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto RM11PEP en $\text{DMSO}-\delta_6$ (175 MHz).

Para llevar a cabo la elucidación correcta de este péptido, es necesario realizar experimentos adicionales como la reacción de Marfey para observar la fragmentación de los residuos de aminoácidos y determinar la estereoquímica de los mismos (Aparicio-Cuevas *et al.*, 2019), también realizar un análisis por EM para determinar los fragmentos e identificar correctamente los aminoácidos presentes en la estructura, para ello es necesario aislar mayor cantidad del compuesto.

La presencia de citosina en este hongo no se relaciona con sus propiedades antifúngicas y la cantidad de péptido obtenido fue insuficiente para realizar estudio biológico alguno. Indudablemente este hongo plantea relevantes investigaciones a futuro.

VII. Conclusiones

- Se descubrieron nuevos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y PTP-1B de utilidad potencial para el desarrollo de fármacos antidiabéticos a partir de *Malbranchea dendritica* y *Malbranchea flocciformis*. Este hallazgo respondió a la hipótesis planteada.
- Desde el punto de vista quimiotaxonómico, este estudio representa una importante contribución a la química del género, ya que se confirma que la presencia de xantonas, el gymnoascólido A, la antraquinona eritroglaucina y tripéptidos en varias especies de *Malbranchea*. El gymnoascólido A (**46**) se ha aislado a la fecha de *M. dendritica*, *M. flocciformis* y *M. filamentosa*. En tanto que la antraquinona se ha aislado de *M. dendritica* y *M. filamentosa*; y la xantonas de *M. dendritica* y *M. circinata*. Finalmente, los trímeros de ácido antranílico (**105** y **106**) están presentes en *M. flocciformis* y *M. circinata*; su hallazgo en la primera constituye el segundo reporte de estos productos en la naturaleza. De estos metabolitos característicos el gymnoascólido A (**46**) y el trímero de ácido antranílico **105** resultan prometedores para el diseño de nuevos fármacos antidiabéticos.
- Las propiedades inhibidoras de α -glucosidasas del gymnoascólido A (**46**) se demostraron *in vivo* mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones, e *in vitro* mediante análisis enzimático. La aplicación de herramientas quimioinformáticas permitió proponer que los dihidrogymnascólidos (derivados reducidos **167a** y **167b**) poseen una mayor similitud a fármaco que el producto natural, y similar al de muchos productos comerciales.
- La xantona sydowinina B (**121**), el compuesto **105** y su derivado dihidrogenado **168** resultaron inhibidores de la enzima PTP-1B. En el caso del tripéptido y su derivado reducido las pruebas de tolerancia oral a la glucosa y su efecto hipoglucemiante *in vivo* podrían estar relacionados con su inhibición a la enzima PTP-1B. Las predicciones bioinformáticas para el producto **105** y la mezcla enantiomérica **168** indican que estos productos son buenos candidatos para el desarrollo de fármacos, sobre todo porque la síntesis es accesible y permitiría la obtención de diferentes análogos.
- Los estudios de acoplamiento y dinámica molecular permitieron predecir la forma y lugar de interacción de los principios activos con las enzimas blanco, y el comportamiento o evolución de la interacción con las enzimas a través del tiempo.
- Se realizó la identificación taxonómica del hongo ACA-14 como la especie *Parengyodontium album*, mediante métodos moleculares. Un análisis por difracción de rayos X permitió establecer la estructura del metabolito principal JBIR-99 (**154**), que demostró una potente actividad antitumoral contra líneas celulares de cáncer de próstata. Aunque el resultado escapa

de los objetivos del presente estudio, los resultados son inéditos y valiosos para el descubrimiento de fármacos antitumorales.

VIII. Perspectivas

- Continuar con el estudio químico del hongo *Malbranchea arcuata*, con la finalidad de obtener mayor cantidad del compuesto RM11PEP para llevar a cabo su elucidación estructural y determinar su posible actividad biológica como antifúngico.

IX. Referencias

- Adasme, Melissa F., Katja L. Linnemann, Sarah Naomi Bolz, Florian Kaiser, Sebastian Salentin, V. Joachim Haupt, y Michael Schroeder. 2021. "PLIP 2021: Expanding the Scope of the Protein-Ligand Interaction Profiler to DNA and RNA." *Nucleic Acids Research* 49 (W1): W530–34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.
- American Diabetes Association. 2020. "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020." In *Diabetes Care*, 43:S14–31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>.
- Aparicio-Cuevas, Manuel A., María del Carmen González, Huzefa A. Raja, Isabel Rivero-Cruz, Steven J. Kurina, Joanna E. Burdette, Nicholas H. Oberlies, y Mario Figueroa. 2019. "Metabolites from the Marine-Facultative *Aspergillus* sp. MEXU 27854 and *Gymnoascus hyalinusporus* MEXU 29901 from Caleta Bay, Mexico." *Tetrahedron Letters* 60 (25): 1649–52. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.05.037>.
- Asai, Teigo, Shuntaro Morita, Tohru Taniguchi, Kenji Monde, y Yoshiteru Oshima. 2016. "Epigenetic Stimulation of Polyketide Production in *Chaetomium cancroideum* by an NAD⁺-Dependent HDAC Inhibitor." *Organic and Biomolecular Chemistry* 14 (2): 646–51. <https://doi.org/10.1039/c5ob01595b>.
- Bai, Yan, Ping Yi, Songya Zhang, Jiangchun Hu, y Huaqi Pan. 2021. "Novel Antioxidants and α -Glycosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1b Inhibitors from an Endophytic Fungus *Penicillium brefeldianum* F4a." *Journal of Fungi* 7 (11): 1–10. <https://doi.org/10.3390/jof7110913>.
- Bao, Jie, Fei He, Jin Hai Yu, Huijuan Zhai, Zhi Qiang Cheng, Cheng Shi Jiang, Yuying Zhang, *et al.* 2018. "New Chromones from a Marine-Derived Fungus, *Arthrinium* sp., and Their Biological Activity." *Molecules* 23 (8): 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules23081982>.
- Bie, Jianbo, Shuainan Liu, Zhanmei Li, Yongzhao Mu, Bailing Xu, y Zhufang Shen. 2015. "Discovery of Novel Indole Derivatives as Allosteric Inhibitors of Fructose-1,6-Bisphosphatase." *European Journal of Medicinal Chemistry* 90: 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.049>.
- Blanco, Antonio, y Gustavo Blanco. 2017. "Chapter 12- Digestion - Absorption." In *Medical Biochemistry*, editado por Antonio Blanco y Gustavo Blanco, 251–73. Academic Press. <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00012-4>.
- Bruhn, Torsten, Anu Schaumlöffel, Yasmin Hemberger, y Gerhard Bringmann. 2013. "SpecDis: Quantifying the Comparison of Calculated and Experimental Electronic Circular Dichroism Spectra." *Chirality* 25: 243–49. <https://doi.org/10.1002/chir>.
- Caro, Yanis, Linda Anamale, Mireille Fouillaud, Philippe Laurent, Thomas Petit, y Laurent Dufosse. 2012. "Natural Hydroxyanthraquinoid Pigments as Potent Food Grade Colorants: An Overview." *Natural*

- Products and Bioprospecting* 2 (5): 174–93. <https://doi.org/10.1007/s13659-012-0086-0>.
- Case, D. A., Thomas E. Cheatham, Tom Darden, Holger Gohlke, Ray Luo, Kenneth M. Merz, Alexey Onufriev, Carlos Simmerling, Bing Wang, y Robert J. Woods. 2005. “The Amber Biomolecular Simulation Programs.” *Journal of Computational Chemistry* 26 (16): 1668–88. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- Case, D. A., T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, *et al.* 2012. “AMBER 12.” San Francisco: University of California.
- CDC. 2021. “Póngale El Freno a Las Complicaciones de La Diabetes.” Centros Para El Control y Prevención de Enfermedades. 2021. <https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/resources/features/prevent-complications.html>.
- Chan, Cheng Wei, Chu Leng Yu, Jiunn Cherng Lin, Yu Cheng Hsieh, Che Chen Lin, Chen Ying Hung, Cheng Hung Li, *et al.* 2018. “Glitazones and Alpha-Glucosidase Inhibitors as the Second-Line Oral Anti-Diabetic Agents Added to Metformin Reduce Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetes Patients: A Nationwide Cohort Observational Study.” *Cardiovascular Diabetology* 17 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0663-6>.
- Chatterjee, A., y M. Ganguly. 1968. “Self-Condensation of Anthranilic Acid.” *Journal of Organic Chemistry* 33 (8): 3358. <https://doi.org/10.1021/jo01272a086>.
- Chung, Yni Mei, Tomoyuki Fujita, Masahira Nakagawa, Mitsuru Nakayama, Hiroshi Nozaki¹, Gueh Yuh Chen, y Zuei Ching Chen. 1993. “A Novel Quinone Antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54.” *Journal of Antibiotics* 46 (12): 1819–26. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1819>.
- Ciuffreda, P., S. Casati, y A. Manzocohi. 2007. “Spectral Assignments and Reference Data Complete¹H and ¹³C NMR Spectral Assignment of α - And β -Adenosine, 2'-Deoxyadenosine and Their Acetate Derivatives.” *Magnetic Resonance in Chemistry* 45 (9): 781–84. <https://doi.org/10.1002/mrc.2036>.
- Clark, Ben, Robert J. Capon, Ernest Lacey, Shaun Tennant, Jennifer H. Gill, Benjamin Bulheller, y Gerhard Bringmann. 2005. “Gymnoascolides A-C: Aromatic Butenolides from an Australian Isolate of the Soil Ascomycete *Gymnoascus reessii*.” *Journal of Natural Products* 68 (8): 1226–30. <https://doi.org/10.1021/np050145p>.
- Copeland, Robert A. 2000. *ENZYMES A Practical Introduction. The Communications of the TeX Users Group*. Vol. 7. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm020467f>.
- Dahlén, Amelia D., Giovanna Dashi, Ivan Maslov, Misty M. Attwood, Jörgen Jonsson, Vladimir Trukhan, y Helgi B. Schiöth. 2022. “Trends in Antidiabetic Drug Discovery: FDA Approved Drugs, New Drugs in Clinical Trials and Global Sales.” *Frontiers in Pharmacology* 12 (January): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.807548>.

- Daina, Antoine, Olivier Michielin, y Vincent Zoete. 2017. "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules." *Scientific Reports* 7 (March): 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- Deangelis, Andrew, Olga Dmitrenko, y Joseph M. Fox. 2012. "Rh-Catalyzed Intermolecular Reactions of Cyclic α -Diazocarbonyl Compounds with Selectivity over Tertiary C-H Bond Migration." *Journal of the American Chemical Society* 134 (26): 11035–43. <https://doi.org/10.1021/ja3046712>.
- Derosa, Giuseppe, y Pamela Maffioli. 2012. " α -Glucosidase Inhibitors and Their Use in Clinical Practice." *Archives of Medical Science* 8 (5): 899–906. <https://doi.org/10.5114/aoms.2012.31621>.
- Díaz-Rojas, Miriam, Huzefa Raja, Martin González-Andrade, José Rivera-Chávez, Manuel Rangel-Grimaldo, Isabel Rivero-Cruz, y Rachel Mata. 2021. "Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from the Fungus *Malbranchea albolutea*." *Phytochemistry* 184 (January). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112664>.
- Du, Guoli, Wanrun Xie, Yinxia Su, Yao Ma, Xiaoming Gao, Sheng Jiang, y Huazheng Liang. 2020. "Acarbose-Metformin Is More Effective in Glycemic Variability Control than Repaglinide-Metformin in T2DM Patients Inadequately Controlled with Metformin: A Retrospective Cohort Study." *PeerJ* 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.9905>.
- Eguchi, Shoji, Yuji Matsushita, y Hisato Takeuchi. 1992. "Novel Synthetic Route to Benzopoliazamacrocycles. Synthesis of 16-Membered Tetrabenzotetraazamacrocycles via Bisquinazolinone Annelation and Reductive Ring Enlargement." *Journal of Organic Chemistry* 57: 6975–79.
- Elferink, Hidde, Jeroen P.J. Bruekers, Gerrit H. Veeneman, and Thomas J. Boltje. 2020. "A Comprehensive Overview of Substrate Specificity of Glycoside Hydrolases and Transporters in the Small Intestine: 'A Gut Feeling.'" *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (23): 4799–4826. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03564-1>.
- Engelking, Larry R. 2015. "Chapter 6 – Enzyme Kinetics." *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50006-2>.
- Figuroa, Mario, Martín González-Andrade, Alejandro Sosa-Peinado, Abraham Madariaga-Mazón, Federico Del Río-Portilla, María Del Carmen González, y Rachel Mata. 2011. "Fluorescence, Circular Dichroism, NMR, and Docking Studies of the Interaction of the Alkaloid Malbrancheamide with Calmodulin." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 26 (3): 378–85. <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.518964>.
- Figuroa, Mario, María Del Carmen González, y Rachel Mata. 2008. "Malbrancheamide B, a Novel Compound from the Fungus *Malbranchea aurantiaca*." *Natural Product Research* 22 (8): 709–14. <https://doi.org/10.1080/14786410802012361>.

- Finefield, Jennifer M., Jens C. Frisvad, David H. Sherman, y Robert M. Williams. 2012. "Fungal Origins of the Bicyclo[2.2.2]Diazaoctane Ring System of Prenylated Indole Alkaloids." *Journal of Natural Products* 75 (4): 812–33. <https://doi.org/10.1021/np200954v>.
- Fouillaud, Mireille, Mekala Venkatachalam, Emmanuelle Girard-Valenciennes, Yanis Caro, y Laurent Dufossé. 2016. "Anthraquinones and Derivatives from Marine-Derived Fungi: Structural Diversity and Selected Biological Activities." *Marine Drugs* 14 (4). <https://doi.org/10.3390/md14040064>.
- Fukuda, S., T. Ohta, S. Sakata, H. Morinaga, M. Ito, Y. Nakagawa, M. Tanaka, y M. Matsushita. 2010. "Pharmacological Profiles of a Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor, JTT-551." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12: 299–306.
- Garber, Alan J., Yehuda Handelsman, George Grunberger, Daniel Einhorn, Martin J. Abrahamson, Joshua I. Barzilay, Lawrence Blonde, *et al.* 2020. "Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm - 2020 Executive Summary." *Endocrine Practice* 26 (1): 107–39. <https://doi.org/10.4158/CS-2019-0472>.
- Genovese, Massimo, Ilaria Nesi, Anna Caselli, y Paolo Paoli. 2021. "Natural α -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors: A Source of Scaffold Molecules for Synthesis of New Multitarget Antidiabetic Drugs." *Molecules* 26 (16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164818>.
- Ghani, Usman. 2015. "Re-Exploring Promising α -Glucosidase Inhibitors for Potential Development into Oral Anti-Diabetic Drugs: Finding Needle in the Haystack." *European Journal of Medicinal Chemistry* 103: 133–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.043>.
- Hamasaki, Takashi, Yukiharu Sato, y Yuichi Hatsuda. 1975a. "Isolation of New Metabolites from *Aspergillus Sydowi* and Structure of Sydowic Acid." *Agricultural and Biological Chemistry* 39 (12): 2337–40. <https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861954>.
- Hamasaki, Takashi, Yukiharu Sato, y Yuichi Hatsuda. 1975b. "Structure of Sydowinin A , Sydowinin B , and Sydowinol , Metabolites from *Aspergillus Sydowi*" 39 (12): 2341–45.
- He, Rong Jun, Zhi Hong Yu, Ruo Yu Zhang, y Zhong Yin Zhang. 2014. "Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Therapeutic Targets." *Development (Basingstoke)* 57 (1): 1227–46. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.80>.
- Hosoe, Tomoo, Toru Iizuka, Shin Ichirou Komai, Daigo Wakana, Takeshi Itabashi, Koohei Nozawa, Kazutaka Fukushima, y Ken Ichi Kawai. 2005. "4-Benzyl-3-Phenyl-5H-Furan-2-One, a Vasodilator Isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300." *Phytochemistry* 66 (23): 2776–79. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.014>.
- Hossain, Uday, Abhishek Kumar Das, Sumit Ghosh, y Parames C. Sil. 2020. "An Overview on the Role of

- Bioactive α -Glucosidase Inhibitors in Ameliorating Diabetic Complications.” *Food and Chemical Toxicology* 145 (August): 111738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111738>.
- Huo, Changhong, Zhihui Zheng, Yan Xu, Yanbo Ding, Haizhou Zheng, Yunlong Mu, Yuanchen Niu, Jian Gao, y Xinhua Lu. 2020. “Naphthacemycins from a *Streptomyces* sp. as Protein-Tyrosine Phosphatase Inhibitors.” *Journal of Natural Products* 83 (5): 1394–99. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00417>.
- IDF. 2021. *International Diabetes Federation. International Diabetes Federation, Diabetes Atlas, 10th Edition*. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.013>.
- INEGI. 2021a. “Características de Las Defunciones Registradas En México Durante 2020.” *Comunicado de Prensa* No. 592/21. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf.
- INEGI. 2021b. “Estadísticas a Propósito Del Día Mundial de La Diabetes (14 de Noviembre). Datos Nacionales.” *Comunicado de Prensa*. No. 645/21. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-diabetes-2020>.
- INEGI. 2022. “Estadística De Defunciones Registradas Enero a Septiembre De 2021 (Preliminar).” *Comunicado de Prensa*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2022_02.pdf.
- Iwata, Naoki, Naili Wang, Xinsheng Yao, Y Susumu Kitanaka. 2004. “Structures and Histamine Release Inhibitory Effects of Prenylated Orcinol Derivatives from *Rhododendron dauricum*.” *Journal of Natural Products* 67 (7): 1106–9. <https://doi.org/10.1021/np0303916>.
- Johnson, Theodore O., Jacques Ermolieff, y Michael R. Jirousek. 2002. “Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Diabetes.” *Nature Reviews Drug Discovery* 1 (9): 696–709. <https://doi.org/10.1038/nrd895>.
- Joshi, Shashank R., Eberhard Standl, Nanwei Tong, Parag Shah, Sanjay Kalra, y Rahul Rathod. 2015. “Therapeutic Potential of α -Glucosidase Inhibitors in Type 2 Diabetes Mellitus: An Evidence-Based Review.” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16 (13): 1959–81. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1070827>.
- Kerru, Nagaraju, Ashona Singh-Pillay, Paul Awolade, y Parvesh Singh. 2018. “Current Anti-Diabetic Agents and Their Molecular Targets: A Review.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 152: 436–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.061>.
- Kim, Hang Sub, Il Yeong Park, Yun Joo Park, Jeong Hyeong Lee, Young Soo Hong, y Jung Joon Lee. 2002. “A Novel Dihydroxanthone, AGI-B4 with Inhibition of VEGF-Induced Endothelial Cell Growth.” *The*

- Journal of Antibiotics* 55 (7): 669–72. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(83\)90113-7](https://doi.org/10.1016/0022-3999(83)90113-7).
- Kim, Hye Jin, Xiao Jun Li, Dong Cheol Kim, Tai Kyoung Kim, Jae Hak Sohn, Haeun Kwon, Dongho Lee, Youn Chul Kim, Joung Han Yim, y Hyuncheol Oh. 2021. “Ptp1b Inhibitory Secondary Metabolites from an Antarctic Fungal Strain *Acremonium* sp. Sf-7394.” *Molecules* 26 (18): 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules26185505>.
- Kim, Mi Kyung, Ye Hwang Cheong, Seung Ho Lee, Tae Hyoung Kim, Il Hoon Jung, Yuna Chae, Jeong Ha Lee, *et al.* 2021. “A Novel GPR119 Agonist DA-1241 Preserves Pancreatic Function via the Suppression of ER Stress and Increased PDX1 Expression.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 144 (March): 112324. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112324>.
- Kjaerulff, Louise, Alexander Baekager Just Jensen, Chi Ndi, Susan Semple, Birger Lindberg Møller, y Dan Staerk. 2020. “Isolation, Structure Elucidation and PTP1B Inhibitory Activity of Serrulatane Diterpenoids from the Roots of *Myoporum insulare*.” *Phytochemistry Letters* 39 (July): 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.07.001>.
- Kötzler, Miriam P., Susan M. Hancock, y Stephen G. Withers. 2014. “Glycosidases: Functions, Families and Folds.” En *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/047001590X>.
- Lantz, Kristen A., Susan G. Emeigh Hart, Sonia L. Planey, Mitchell F. Roitman, Inez A. Ruiz-White, Henry R. Wolfe, y Michael P. McLane. 2010. “Inhibition of PTP1B by Trodusquemine (MSI-1436) Causes Fat-Specific Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice.” *Obesity* 18 (8): 1516–23. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.444>.
- Leplat, Johann, Alexandre François, y Faisal Boust. 2020. “*Parengyodontium album*, a Frequently Reported Fungal Species in the Cultural Heritage Environment.” *Fungal Biology Reviews* 34 (3): 126–35. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.06.002>.
- Liao, Hai Xia, Cai Juan Zheng, Guo Lei Huang, Rong Qing Mei, Xu Hua Nong, Tai Ming Shao, Guang Ying Chen, y Chang Yun Wang. 2019. “Bioactive Polyketide Derivatives from the Mangrove-Derived Fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ004.” *Journal of Natural Products* 82 (8): 2211–19. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00241>.
- Liu, Shuai, Yanyong Mao, Hedong Lu, Yuping Zhao, Muhammad Bilal, Peter Proksch, y Peihong Hu. 2021. “Two New Torribiellin Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Parengyodontium album*.” *Phytochemistry Letters* 46 (August): 149–52. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.008>.
- Madariaga-Mazon, Abraham, Oswaldo Hernández-Abreu, Samuel Estrada-Soto, y Rachel Mata. 2015. “Insights on the Vasorelaxant Mode of Action of Malbrancheamide.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67 (4): 551–58. <https://doi.org/10.1111/jphp.12346>.
- Mallavadhani, Uppuluri Venkata, Reddy Srilakshmi Tirupathamma, G. Sagarika, y Sistla Ramakrishna.

2019. "Isolation, Chemical Modification, and Anticancer Activity of Major Metabolites of the Lichen *Parmotrema mesotropum*." *Chemistry of Natural Compounds* 55 (5): 825–31. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02824-2>.
- Mangan, Aisling, Neil G. Docherty, Carel W. Le Roux, y Werd Al-Najim. 2018. "Current and Emerging Pharmacotherapy for Prediabetes: Are We Moving Forward?" *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 19 (15): 1663–73. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1517155>.
- Martínez-Aldino, Ingrid Y., Martha Villaseca-Murillo, Jesús Morales-Jiménez, y José Rivera-Chávez. 2021. "Absolute Configuration and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity of Xanthoepocin, a Dimeric Naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429." *Bioorganic Chemistry* 115 (July). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105166>.
- Martínez-Luis, Sergio, María C. González, Miguel Ulloa, y Rachel Mata. 2005. "Phytotoxins from the Fungus *Malbranchea aurantiaca*." *Phytochemistry* 66 (9): 1012–16. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.005>.
- Martínez-Luis, Sergio, Rogelio Rodríguez, Laura Acevedo, María C. González, Alfonso Lira-Rocha, y Rachel Mata. 2006. "Malbrancheamide, a New Calmodulin Inhibitor from the Fungus *Malbranchea aurantiaca*." *Tetrahedron* 62 (8): 1817–22. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.11.047>.
- Meng, Ling Hong, Hui Qin Chen, Imke Form, Belma Konuklugil, Peter Proksch, y Bin Gui Wang. 2016. "New Chromone, Isocoumarin, and Indole Alkaloid Derivatives from Three Sponge-Derived Fungal Strains." *Natural Product Communications* 11 (9): 1293–96. <https://doi.org/10.1177/1934578x1601100927>.
- Mohamed, Gamal A., Sabrin R.M. Ibrahim, y Hani Z. Asfour. 2020. "Antimicrobial Metabolites from the Endophytic Fungus *Aspergillus versicolor*." *Phytochemistry Letters* 35 (November 2019): 152–55. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.12.003>.
- Moriyama, Hiroyoshi, Tomoo Hosoe, Daigo Wakana, Takeshi Itabashi, Ken Ichi Kawai, Toru Iizuka, Keiko Hoshi, Kazutaka Fukushima, y Francis Chun Lau. 2009. "Assay-Guided Informatory Screening Method for Antiplatelet Effect of Adenosine Isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300: Inhibitory Behaviors of Adenosine in Different Solvents." *Journal of Health Science* 55 (1): 103–8. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.103>.
- Nesterova, Anastasia P., Eugene A. Klimov, Maria Zharkova, Sergey Sozin, Vladimir Sobolev, Natalia V. Ivanikova, Maria Shkrob, y Anton Yuryev. 2020. "Endocrine, Nutritional, and Metabolic Diseases." En *Disease Pathways*, editado por Anastasia P. Nesterova, Eugene A. Klimov, Maria Zharkova, Sergey Sozin, Vladimir Sobolev, Natalia V. Ivanikova, Maria Shkrob, y Anton Yuryev, 121–218. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817086-1.00004-x>.
- NOM-015-SSA2-2010. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

- Norton, Luke, Chris Shannon, Amalia Gastaldelli, y Ralph A. DeFronzo. 2022. "Insulin: The Master Regulator of Glucose Metabolism." *Metabolism: Clinical and Experimental* 129. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155142>.
- Pang, Xiaoyan, Guodi Cai, Xiuping Lin, Limbadri Salendra, Xuefeng Zhou, Bin Yang, Junjian Wang, Junfeng Wang, Shihai Xu, y Yonghong Liu. 2019. "New Alkaloids and Polyketides from the Marine Sponge-Derived Fungus *Penicillium* sp. ScSiO41015." *Marine Drugs* 17 (7): 1–9. <https://doi.org/10.3390/md17070398>.
- Premabai, M., y P.L. Narasimharao. 1966. "Thermophilic Microorganisms. IV. Elaboration of Malbranchins A and B by *Malbranchea pulchella*." *Indian Journal of Biochemistry* 3: 187–90.
- Pretsch, Ernö, Philippe Bühlmann, y Martin Badertscher. 2020. *Structure Determination of Organic Compounds*. 4th ed. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-62439-5>.
- Raja, Huzefa A., Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, y Nicholas H. Oberlies. 2017. "Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community." *Journal of Natural Products* 80 (3): 756–70. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
- Rangel-Grimaldo, Manuel, Martha L. Macías-Rubalcava, Martín González-Andrade, Huzefa Raja, Mario Figueroa, y Rachel Mata. 2020. "α-Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from *Malbranchea circinata*." *Journal of Natural Products* 83 (3): 675–83. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01108>.
- Rebollar-Ramos, Daniela, Martha L. Macías-Ruvalcaba, Mario Figueroa, Huzefa A. Raja, Martín González-Andrade, y Rachel Mata. 2018. "Additional α-Glucosidase Inhibitors from *Malbranchea flavorosea* (Leotiomyces, Ascomycota)." *Journal of Antibiotics* 71 (10): 862–71. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0075-6>.
- Ren, Yong Mei, Rui Zhang, Zheling Feng, Chang Qiang Ke, Sheng Yao, Chunping Tang, Ligen Lin, y Yang Ye. 2021. "Macrocephatriolides A and B: Two Guaianolide Trimers from *Ainsliaea macrocephala* as PTP1B Inhibitors and Insulin Sensitizers." *Journal of Organic Chemistry* 86 (24): 17782–89. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01996>.
- Rena, Graham, D. Grahame Hardie, y Ewan R. Pearson. 2017. "The Mechanisms of Action of Metformin." *Diabetologia* 60 (9): 1577–85. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>.
- Röder, Pia V., Bingbing Wu, Yixian Liu, y Weiping Han. 2016. "Pancreatic Regulation of Glucose Homeostasis." *Experimental & Molecular Medicine* 48 (December 2015): e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>.
- Rodríguez-Andrade, Ernesto, José F. Cano-Lira, Nathan Wiederhold, Alba Pérez-Cantero, Josep Guarro, y Alberto M. Stchigel. 2021. "A Revision of *Malbranchea*-like Fungi from Clinical Specimens in the

- United States of America Reveals Unexpected Novelty.” *IMA Fungus* 12 (1): 1–27. <https://doi.org/10.1186/s43008-021-00075-x>.
- Roe, Daniel R., y Thomas E. Cheatham. 2013. “PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data.” *Journal of Chemical Theory and Computation* 9 (7): 3084–95. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.
- Saito, Motoo, Ikutoshi Matsuura, y Hiroshi Okazaki. 1979. “Tf-26Vx, an Antibiotic Produced by a Thermophilic Fungus.” *The Journal of Antibiotics* 32 (11): 1210–12. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.1210>.
- Salentin, Sebastian, Sven Schreiber, V. Joachim Haupt, Melissa F. Adasme, y Michael Schroeder. 2015. “PLIP: Fully Automated Protein-Ligand Interaction Profiler.” *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W443–47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.
- Sander, T. 2001. “OSIRIS Property Explorer.” Idorsia Pharmaceuticals Ltd, Hegenheimermattweg 91, 4123 Allschwil, Switzerland. <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
- Schlegel, Brigitte, Frank Hanel, Friedrich A Gollmick, Hans-Peter Saluz, y Udo Gräfe. 2003a. “New Quinones and Hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and Interaction with Tax/CREB Expression System in Yeast” 56 (11): 917–22.
- Schlegel, Brigitte, A. Härtl, F. A. Gollmick, y U. Gräfe. 2003b. “7-Methoxy-2,3-Dimethylbenzofuran-5-ol, a New Antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286.” *Journal of Antibiotics* 56 (9): 792–94. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.792>.
- Schwöbel, Johannes A.H., Yana K. Koleva, Steven J. Enoch, Fania Bajot, Mark Hewitt, Judith C. Madden, David W. Roberts, Terry W. Schultz, y Mark T.D. Cronin. 2011. “Measurement and Estimation of Electrophilic Reactivity for Predictive Toxicology.” *Chemical Reviews* 111 (4): 2562–96. <https://doi.org/10.1021/cr100098n>.
- Sharma, Bigyan, Liuxing Xie, Fen Yang, Wei Wang, Quanming Zhou, Menghua Xiang, Shizhe Zhou, *et al.* 2020. “Recent Advance on PTP1B Inhibitors and Their Biomedical Applications.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 199: 112376. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112376>.
- Sharma, Prateek, Sukhbir Singh, Vinay Thakur, Neelam Sharma, y Ajmer Singh Grewal. 2021. “Novel and Emerging Therapeutic Drug Targets for Management of Type 2 Diabetes Mellitus.” *Obesity Medicine* 23 (February): 100329. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2021.100329>.
- Sigler, L., y J.W. Carmichael. 1976. “Taxonomy of *Malbranchea* and Some Other Hyphomycetes with Arthroconidia.” *Mycotaxon* 4: 349–488.
- Silva, Matheus Henrique Reis da, Luis Gabriel Cueva-Yesquén, Sinésio Boaventura Júnior, Vera Lucia Garcia, Adilson Sartoratto, Dejanira de Franceschi de Angelis, y Derlene Attili de Angelis. 2020.

- “Endophytic Fungi from *Passiflora incarnata*: An Antioxidant Compound Source.” *Archives of Microbiology* 202 (10): 2779–89. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02001-y>.
- Singh, Sukhbir, Ajmer Singh Grewal, Rupanshi Grover, Neelam Sharma, Bhawna Chopra, Ashwani Kumar Dhingra, Sandeep Arora, Sonika Redhu, y Viney Lather. 2022. “Recent Updates on Development of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Treatment of Diabetes, Obesity and Related Disorders.” *Bioorganic Chemistry* 121 (October 2021): 105626. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>.
- Sujatha, E., S. Grisham, y S.M. Reddy. 2002. “Production of Indole Acetic Acid and Free Amino Acids by Three Thermophilic Fungi.” *Hindustan Antibiotics Bulletin* 44: 37–41.
- Swarbrick, Michael M., Peter J. Havel, Arthur A. Levin, Andrew A. Bremer, Kimber L. Stanhope, Madeline Butler, Sheri L. Booten, *et al.* 2009. “Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase-IB with Antisense Oligonucleotides Improves Insulin Sensitivity and Increases Adiponectin Concentrations in Monkeys.” *Endocrinology* 150 (4): 1670–79. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0885>.
- Tamrakar, Akhilesh Kumar, Chandan K. Maurya, y Amit K. Rai. 2014. “PTP1B Inhibitors for Type 2 Diabetes Treatment: A Patent Review (2011-2014).” *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24 (10): 1101–15. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.947268>.
- Tan, Qing Wei, Ming An Ouyang, Shuo Shen, y Wei Li. 2012. “Bioactive Metabolites from a Marine-Derived Strain of the Fungus *Neosartorya fischeri*.” *Natural Product Research* 26 (15): 1402–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.592834>.
- Tian, Yongqi, Xiaochu Qin, Xiuping Lin, Kumaravel Kaliyaperumal, Xuefeng Zhou, Juan Liu, Zhiran Ju, Zhengchao Tu, y Yonghong Liu. 2015. “Sydoxanthone C and Acemolin B Produced by Deep-Sea-Derived Fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Indo9F01.” *Journal of Antibiotics* 68 (11): 703–6. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.55>.
- Tonks, Nicholas K. 2003. “PTP1B: From the Sidelines to the Front Lines!” *FEBS Letters* 546 (1): 140–48. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00603-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00603-3).
- Trisuwan, Kongkiat, Vatcharin Rukachaisirikul, Morakot Kaewpet, Souwalak Phongpaichit, Nongporn Hutadilok-Towatana, Sita Preedanon, y Jariya Sakayaroj. 2011. “Sesquiterpene and Xanthone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154.” *Journal of Natural Products* 74 (7): 1663–67. <https://doi.org/10.1021/np200374j>.
- Tsang, Chi Ching, Jasper F.W. Chan, Wai Mei Pong, Jonathan H.K. Chen, Antonio H.Y. Ngan, Mei Cheung, Christopher K.C. Lai, Dominic N.C. Tsang, Susanna K.P. Lau, y Patrick C.Y. Woo. 2016. “Cutaneous Hyalohyphomycosis Due to *Parengyodontium album* Gen. et Comb. Nov.” *Medical Mycology* 54 (7): 699–713. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw025>.

- Ueda, Jun Ya, Motoki Takagi, y Kazuo Shin-Ya. 2010. "New Xanthoquinodin-like Compounds, JBIR-97,-98 and-99, Obtained from Marine Sponge-Derived Fungus *Tritirachium* sp. SpBo81112MEf2." *Journal of Antibiotics* 63 (10): 615–18. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.92>.
- Umpierrez, Guillermo E., Timothy S. Bailey, Danielle Carcia, Charles Shaefer, Jay H. Shubrook, y Neil Skolnik. 2018. "Improving Postprandial Hyperglycemia in Patients with Type 2 Diabetes Already on Basal Insulin Therapy: Review of Current Strategies." *Journal of Diabetes* 10 (2): 94–111. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12576>.
- Upadhyay, Jagriti, Stergios A. Polyzos, Nikolaos Perakakis, Bindiya Thakkar, Stavroula A. Paschou, Niki Katsiki, Patricia Underwood, *et al.* 2018. "Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes: An Update." *Metabolism: Clinical and Experimental* 78: 13–42. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.08.010>.
- Ventura-Sobrevilla, J., V. D. Boone-Villa, C. N. Aguilar, R. Román-Ramos, E. Vega-Ávila, E. Campos-Sepúlveda, y F. Alarcón-Aguilar. 2011. "Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice." *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54: 5–9.
- Verastegui-Omaña, Brisa, Daniela Rebollar-Ramos, Araceli Pérez-Vásquez, Ana Laura Martínez, Abraham Madariaga-Mazón, Laura Flores-Bocanegra, y Rachel Mata. 2017. "α-Glucosidase Inhibitors from *Malbranchea flavorosea*." *Journal of Natural Products* 80 (1): 190–95. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00977>.
- Wakana, Daigo, Tomoo Hosoe, Takeshi Itabashi, Kazutaka Fukushima, y Ken-ichi Kawai. 2008a. "Two New Furanone Glycosides, Malfilamentosides A and B, from *Malbranchea filamentosa*." *Mycotoxins* 58 (1): 1–6. <https://doi.org/10.2520/myco.58.1>.
- Wakana, Daigo, Tomoo Hosoe, Takeshi Itabashi, Hideaki Okada, Kazutaka Fukushima, y Ken Ichi Kawai. 2008b. "Structures of New Triterpene Glycosides, Malbrancheosides A-D, from *Malbranchea filamentosa*." *Heterocycles* 75 (5): 1109–22.
- Wakana, Daigo, Tomoo Hosoe, Hiroshi Wachi, Takeshi Itabashi, Kazutaka Fukushima, Takeshi Yaguchi, y Ken Ichi Kawai. 2009. "The Cytotoxic and Antifungal Activities of Two New Sesquiterpenes, Malfilanol A and B, Derived from *Malbranchea filamentosa*." *Journal of Antibiotics* 62 (4): 217–19. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.9>.
- Wakana, Daigo, Takeshi Itabashi, Ken Ichi Kawai, Takashi Yaguchi, Kazutaka Fukushima, Yukihiro Goda, y Tomoo Hosoe. 2014. "Cytotoxic Anthrasteroid Glycosides, Malsterosides A-C, from *Malbranchea filamentosa*." *Journal of Antibiotics* 67 (8): 585–88. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.43>.
- Wang, Junwei, Junhua Liu, Zhifu Xie, Jia Li, Jingya Li, y Lihong Hu. 2020. "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Mogrol Derivatives as a Novel Class of AMPKα2β1γ1 Activators." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 30 (2): 126790. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126790>.

- Wang, Weiyi, Ruixuan Chen, Zhuhua Luo, Wei Wang, y Jianming Chen. 2017a. "Two New Benzoate Derivatives and One New Phenylacetate Derivative from a Marine-Derived Fungus *Engyodontium album*." *Natural Product Research* 31 (7): 758–64. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1242002>.
- Wang, Weiyi, Shanshan Li, Zhuo Chen, Zengpeng Li, Yanyan Liao, y Jianming Chen. 2017b. "Secondary Metabolites Produced by the Deep-Sea-Derived Fungus *Engyodontium album*." *Chemistry of Natural Compounds* 53 (2): 224–26. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-1957-8>.
- Watts, Katharine R., Steven T. Loveridge, Karen Tenney, Joseph Media, Frederick A. Valeriote, y Phillip Crews. 2011. "Utilizing DART Mass Spectrometry to Pinpoint Halogenated Metabolites from a Marine Invertebrate-Derived Fungus." *Journal of Organic Chemistry* 76 (15): 6201–8. <https://doi.org/10.1021/jo2009593>.
- Wu, Bin, Jutta Wiese, Arlette Wenzel-Storjohann, Susan Malien, Rolf Schmaljohann, y Johannes F. Imhoff. 2016. "Engyodontochones, Antibiotic Polyketides from the Marine Fungus *Engyodontium album* Strain LFO69." *Chemistry - A European Journal* 22 (22): 7452–62. <https://doi.org/10.1002/chem.201600430>.
- Wu, Changjing, Xiang Cui, Luzhen Sun, Jiajia Lu, Feng Li, Minghui Song, Yunxia Zhang, *et al.* 2021. "Aspulvinones Suppress Postprandial Hyperglycemia as Potent α -Glucosidase Inhibitors From *Aspergillus terreus* ASM-1." *Frontiers in Chemistry* 9 (August): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.736070>.
- Xu, Zhihong, Yapeng Zhang, Haichao Fu, Huimin Zhong, Kui Hong, y Weiming Zhu. 2011. "Antifungal Quinazolinones from Marine-Derived *Bacillus cereus* and Their Preparation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21 (13): 4005–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.002>.
- Yang, Lingling, Feng Chen, Cheng Gao, Jiabao Chen, Junyan Li, Siyan Liu, Yuanyuan Zhang, Zhouyu Wang, y Shan Qian. 2020. "Design and Synthesis of Tricyclic Terpenoid Derivatives as Novel PTP1B Inhibitors with Improved Pharmacological Property and in vivo Antihyperglycaemic Efficacy." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35 (1): 152–64. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1690481>.
- Yang, Wencong, Qi Tan, Yihao Yin, Yan Chen, Yi Zhang, Jianying Wu, Leyao Gao, Bo Wang, y Zhigang She. 2021. "Secondary Metabolites with α -Glucosidase Inhibitory Activity from Mangrove Endophytic Fungus *Talaromyces* sp. Cy-3." *Marine Drugs* 19 (9). <https://doi.org/10.3390/md19090492>.
- Yao, Qifeng, Jie Wang, Xiaoyong Zhang, Xuhua Nong, Xinya Xu, y Shuhua Qi. 2014. "Cytotoxic Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Engyodontium album* DFFSCSo21." *Marine Drugs* 12 (12): 5902–15. <https://doi.org/10.3390/md12125902>.
- Yi, Lin, Mary L. Bandu, y Heather Desaire. 2005. "Identifying Lactone Hydrolysis in Pharmaceuticals. A Tool for Metabolite Structural Characterization." *Analytical Chemistry* 77 (20): 6655–63.

<https://doi.org/10.1021/ac0507237>.

Zhang, Zhong Yin, y Seung Yub Lee. 2003. "PTP1B Inhibitors as Potential Therapeutics in the Treatment of Type 2 Diabetes and Obesity." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 12 (2): 223–33. <https://doi.org/10.1517/13543784.12.2.223>.

Zhou, Peng, Shan Yan, Yuanyuan Lu, Xiao Nian Li, Mi Zhang, Qin Li, Xia Chen, *et al.* 2021. "Five New Secondary Metabolites from the Fungus *Phomopsis asparagi*." *Fitoterapia* 150 (October 2020): 104840. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104840>.

X. Apéndice.

Figura A1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto JBIR-99 (154) en CDCl_3 a 400 MHz.....	132
Figura A2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto JBIR-99 (154) en CDCl_3 a 100 MHz.	132
Figura A3. Espectro de ^1H -RMN del compuesto JBIR-97 (152) en CDCl_3 a 400 MHz.....	133
Figura A4. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto JBIR-97 (152) en CDCl_3 a 100 MHz.	133
Figura A5. Espectro de ^1H -RMN del compuesto gymnoascólido A (46) en CDCl_3 a 700 MHz.....	134
Figura A6. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto gymnoascólido A (46) en CDCl_3 a 175 MHz.	134
Figura A7. Espectro de ^1H -RMN del compuesto sydowinina A (120) en CDCl_3 a 700 MHz.	135
Figura A8. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto sydowinina A (120) en CDCl_3 a 175 MHz.	135
Figura A 9. Espectro de ^1H -RMN del compuesto sydowinina B (121) en $\text{DMSO}-\delta_6$ a 700 MHz.....	136
Figura A10. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto sydowinina B (121) en $\text{DMSO}-\delta_6$ a 175 MHz.	136
Figura A11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto AGI-B4 (124) en CDCl_3 a 700 MHz.....	137
Figura A12. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto AGI-B4 (124) en CDCl_3 a 175 MHz.	137
Figura A13. Espectro de ^1H -RMN del compuesto orcinol (162) en CDCl_3 a 400 MHz.	138
Figura A14. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto orcinol (162) en CDCl_3 a 100 MHz.....	138
Figura A15. Espectro de ^1H -RMN del compuesto eritroglaucina (57) en CDCl_3 a 700 MHz.	139
Figura A16. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto eritroglaucina (57) en CDCl_3 a 175 MHz.	139
Figura A17. Espectro de ^1H -RMN del compuesto desoxiadenosina (163) en CD_3OD a 700 MHz.	140
Figura A18. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto desoxiadenosina (163) en CD_3OD a 175 MHz.	140
Figura A19. Espectro de ^1H -RMN del compuesto adenosina (55) en CD_3OD a 700 MHz.....	141
Figura A20. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto adenosina (55) en CD_3OD a 175 MHz.	141
Figura A21. Espectro de ^1H -RMN del compuesto uridina (165) en CD_3OD a 700 MHz.....	142
Figura A22. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto uridina (165) en CD_3OD a 175 MHz.	142
Figura A23. Estructura ORTEP de la timidina (164) generada por difracción de rayos X.....	143
Figura A24. Espectro de ^1H -RMN del derivado dihidrogenado (167a/167b) en CDCl_3 a 400 MHz.....	143
Figura A25. Espectro de ^{13}C -RMN del derivado dihidrogenado (167a/167b) en CDCl_3 a 100 MHz.....	144
Figura A26. Análisis de espectrometría de masas de alta resolución del derivado dihidrogenado (167a/167b).....	144
Figura A27. Análisis de rotación óptica del derivado dihidrogenado (167a/167b).....	145
Figura A28. Análisis de IR del derivado dihidrogenado (167a/167b).	145
Figura A29. Análisis de UV del derivado dihidrogenado (167a/167b).	146
Figura A 30. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto 46 , calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.	146
Figura A31. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto 46 obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer (https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/).	147
Figura A32. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto 167a , calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.	147
Figura A33. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto 167b , calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.	148
Figura A34. Resultados predictivos de toxicidad de los compuestos 167a y 167b obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer (https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/).....	148
Figura A35. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto 121 , calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.	149
Figura A36. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto 121 obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer, también se indican los fragmentos que marcan alertas como posibles causante de efectos reproductivos y mutagénicos (https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/).	149

Figura A37. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (PDB:3A4A) representada en caricatura azul claro, con el control positivo acarbosa representada en color verde en el sitio catalítico de la enzima. 150

Figura A38. Modelo estructural de los sitios de unión de la subunidad C-terminal de la maltasa glucoamilasa de humano (PDB:3TOP) representada en caricatura verde claro, con el control positivo acarbosa, representado en color rojo en el sitio catalítico de la enzima. 150

Figura A39. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima PTP-1B (PDB:1T49) representada en caricatura amarilla, con el ácido ursólico, control positivo, el cual está representado en color morado en el sitio alostérico de la enzima. 151

Figura A40. Espectro de ^1H -RMN del trímero de ácido antranílico (**105**) en CD_3OD a 400 MHz. 151

Figura A41. Espectro de ^{13}C -RMN del trímero de ácido antranílico (**105**) en CD_3OD a 100 MHz. 152

Figura A42. Espectro de ^1H -RMN del trímero hidroxilado de ácido antranílico (**106**) en CD_3OD a 400 MHz. 152

Figura A43. Espectro de ^{13}C -RMN del trímero hidroxilado de ácido antranílico (**106**) en CD_3OD a 100 MHz. 153

Figura A44. Espectro de IR del compuesto **168**. 153

Figura A45. Espectro de masas exactas del compuesto **168** obtenido mediante ESI en modo positivo. 154

Figura A46. Datos de rotación óptica del compuesto **168** en metanol. 154

Figura A47. Espectro de UV/Visible del compuesto **168** en metanol. 155

Figura A48. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **105**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME. 155

Figura A49. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **168**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME. 156

Figura A50. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto **105** obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer, también se indica el fragmento que marca alerta como posible causante de efectos reproductivos (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). 156

Figura A51. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto **168** (ambos enantiómeros) obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). 157

Figura A52. Espectro de ^1H -RMN de la citosina (**166**) en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz. 157

Figura A53. Espectro de ^{13}C -RMN de la citosina (**166**) en $\text{DMSO}-d_6$ a 100 MHz. 158

Figura A54. Árbol filogenético de *Malbranchea/Auxarthron*, donde se confirma la identidad de *Malbranchea dendritica* ATCC 34527. 159

Tabla A1. Datos del cristal y refinamiento de la estructura de JBIR-99 (**154**). 160

Tabla A2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros equivalentes de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para JBIR-99 (**154**). $U(\text{eq})$ se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U^{ij} 161

Tabla A3. Tamaño de enlaces [Å] y ángulos [$^\circ$] para JBIR-99 (**154**). 163

Tabla A4. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para JBIR-99 (**154**). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$ 166

Tabla A5. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para JBIR-99 (**154**). 168

Tabla A6. Enlaces de hidrógeno para JBIR-99 (**154**) [Å y $^\circ$]. 169

Tabla A7. Datos del cristal y refinamiento de la estructura del trímero de ácido antranílico (**105**). 170

Tabla A8. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros equivalentes de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para el trímero de ácido antranílico (**105**). $U(\text{eq})$ se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U^{ij} 171

Tabla A9. Tamaño de enlaces [Å] y ángulos [$^\circ$] para el trímero de ácido antranílico (**105**). 172

Tabla A10. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para el trímero de ácido antranílico (105). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$ 174

Tabla A11. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para el trímero de ácido antranílico (105)..... 175

Tabla A12. Enlaces de hidrógeno para el trímero de ácido antranílico (105) [Å y $^\circ$]...... 175

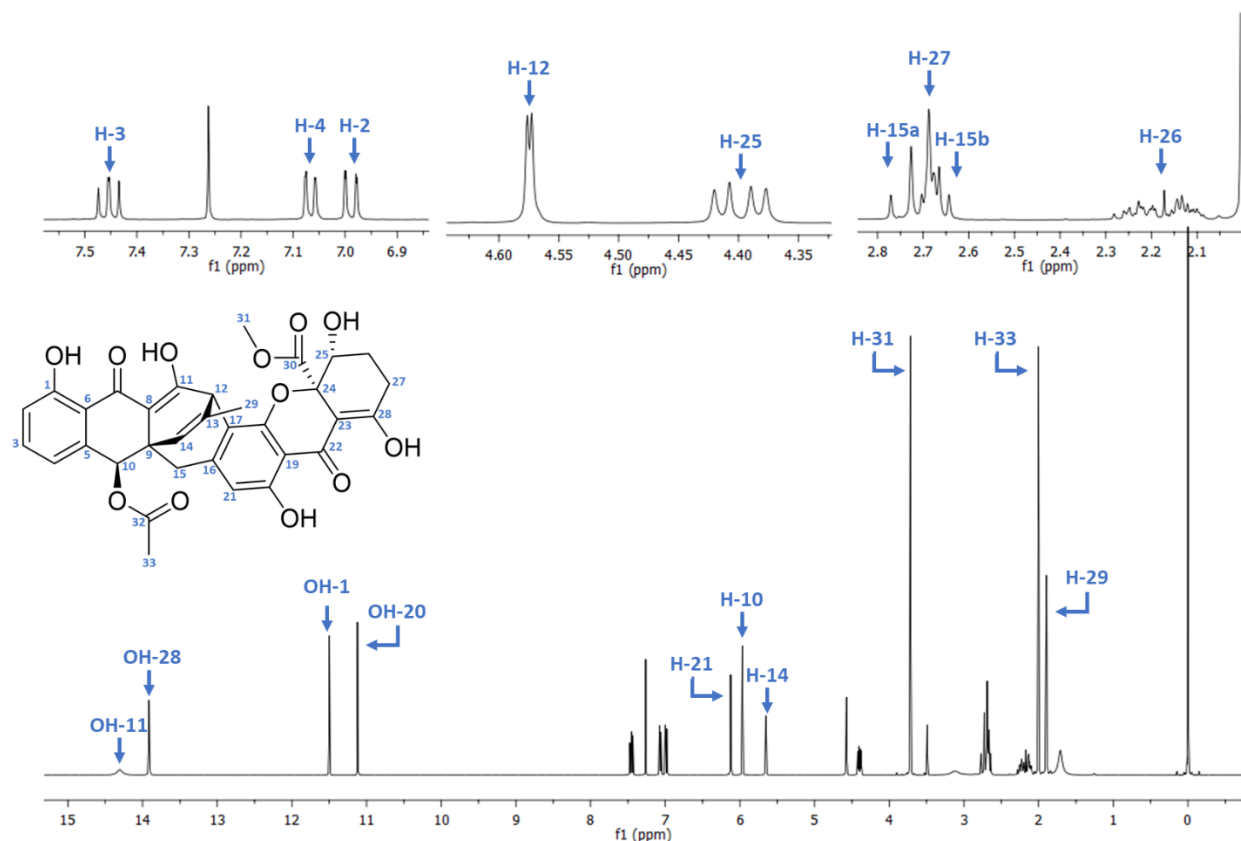


Figura A1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto JBIR-99 (**154**) en CDCl_3 a 400 MHz.

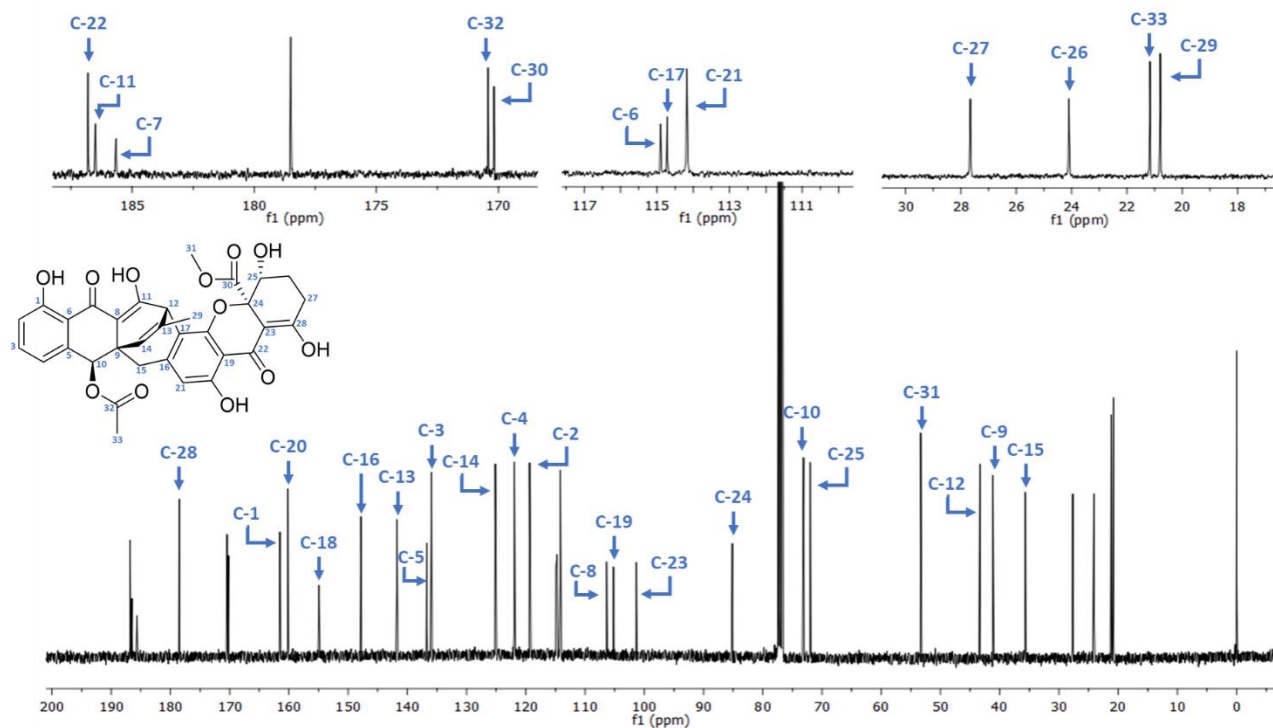


Figura A2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto JBIR-99 (**154**) en CDCl_3 a 100 MHz.

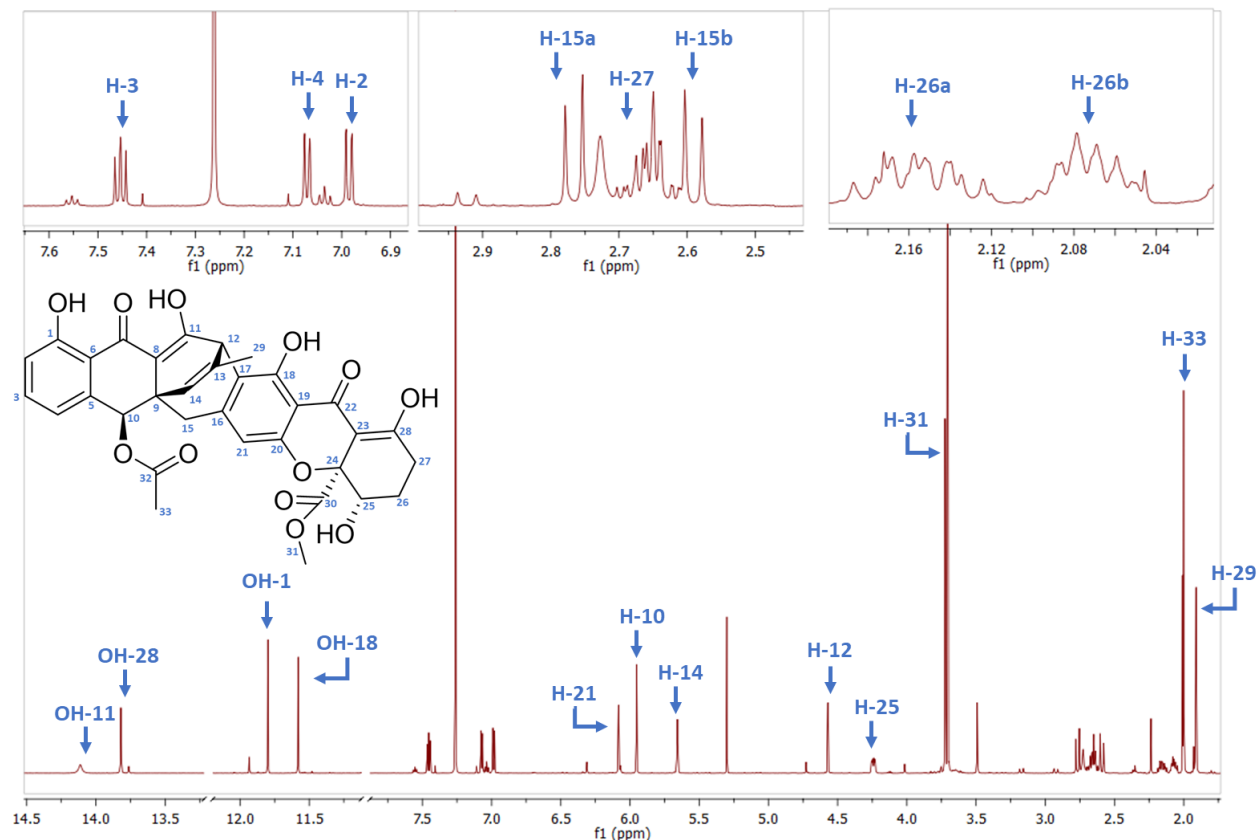


Figura A3. Espectro de ^1H -RMN del compuesto JBIR-97 (**152**) en CDCl_3 a 400 MHz.

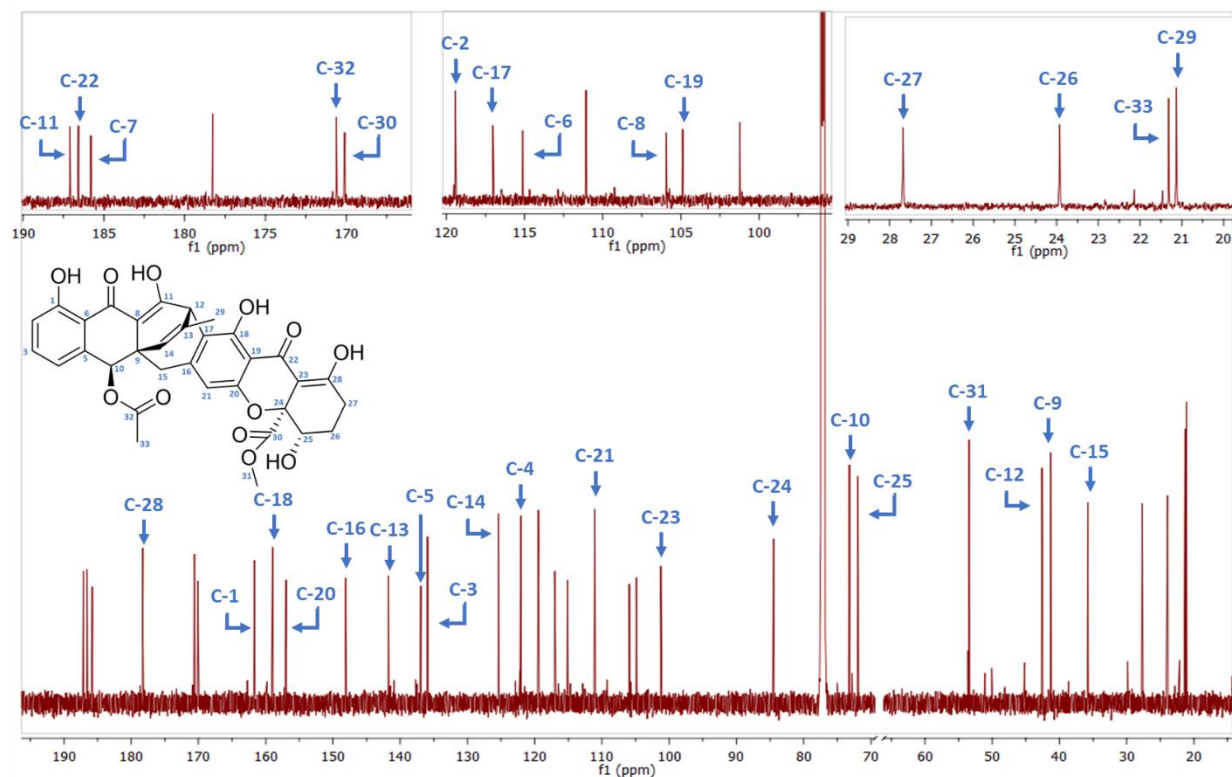


Figura A4. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto JBIR-97 (**152**) en CDCl_3 a 100 MHz.

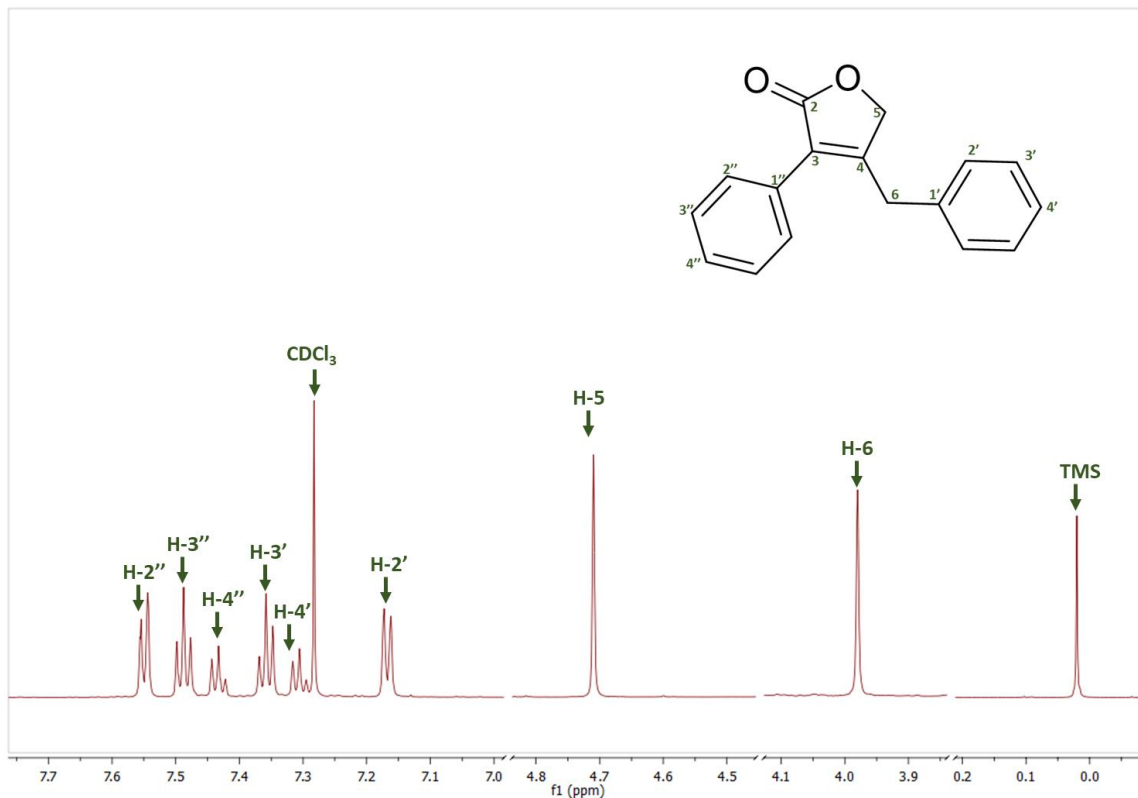


Figura A5. Espectro de ¹H-RMN del compuesto gymnoscólido A (**46**) en CDCl₃ a 700 MHz.

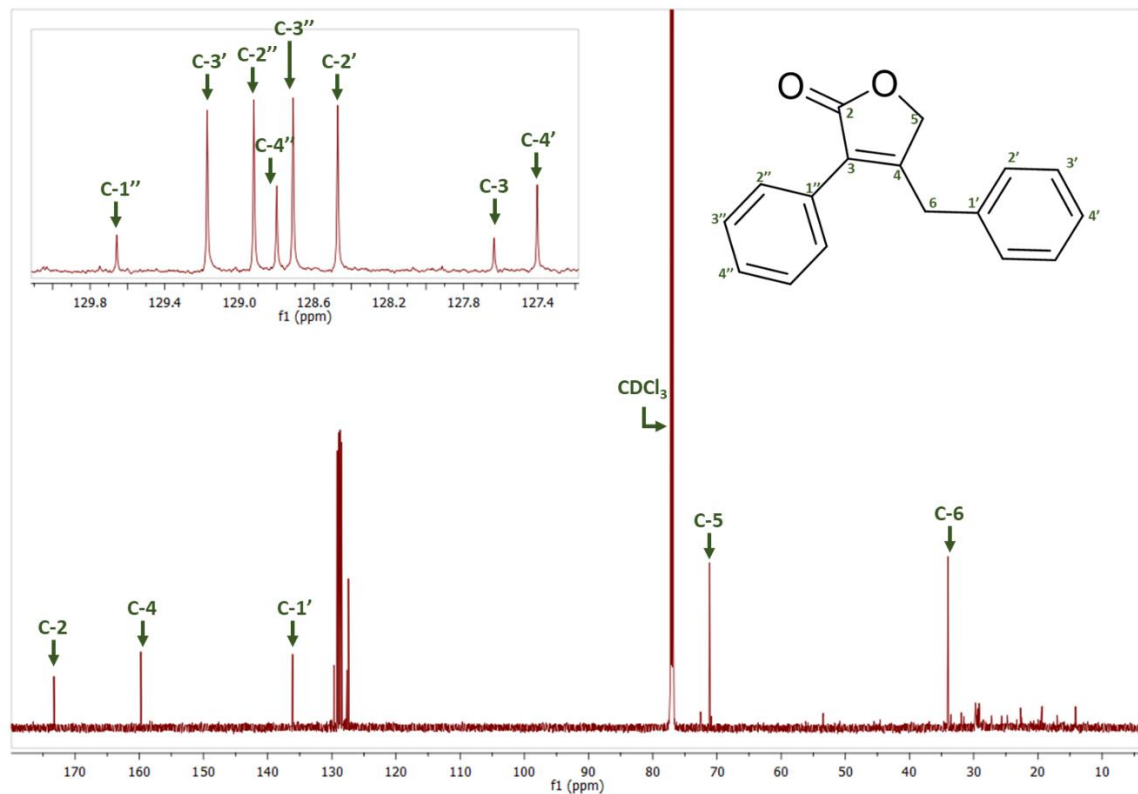


Figura A6. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto gymnoscólido A (**46**) en CDCl₃ a 175 MHz.

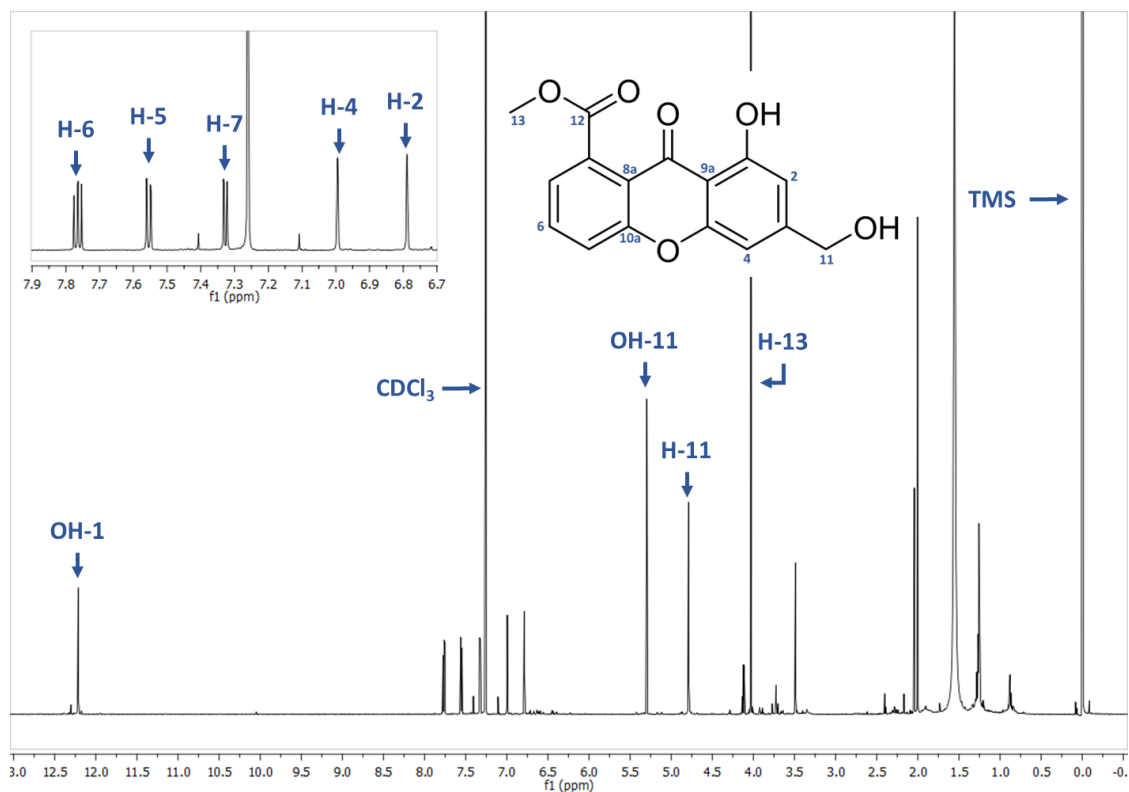


Figura A7. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del compuesto sydownina A (**120**) en CDCl_3 a 700 MHz.

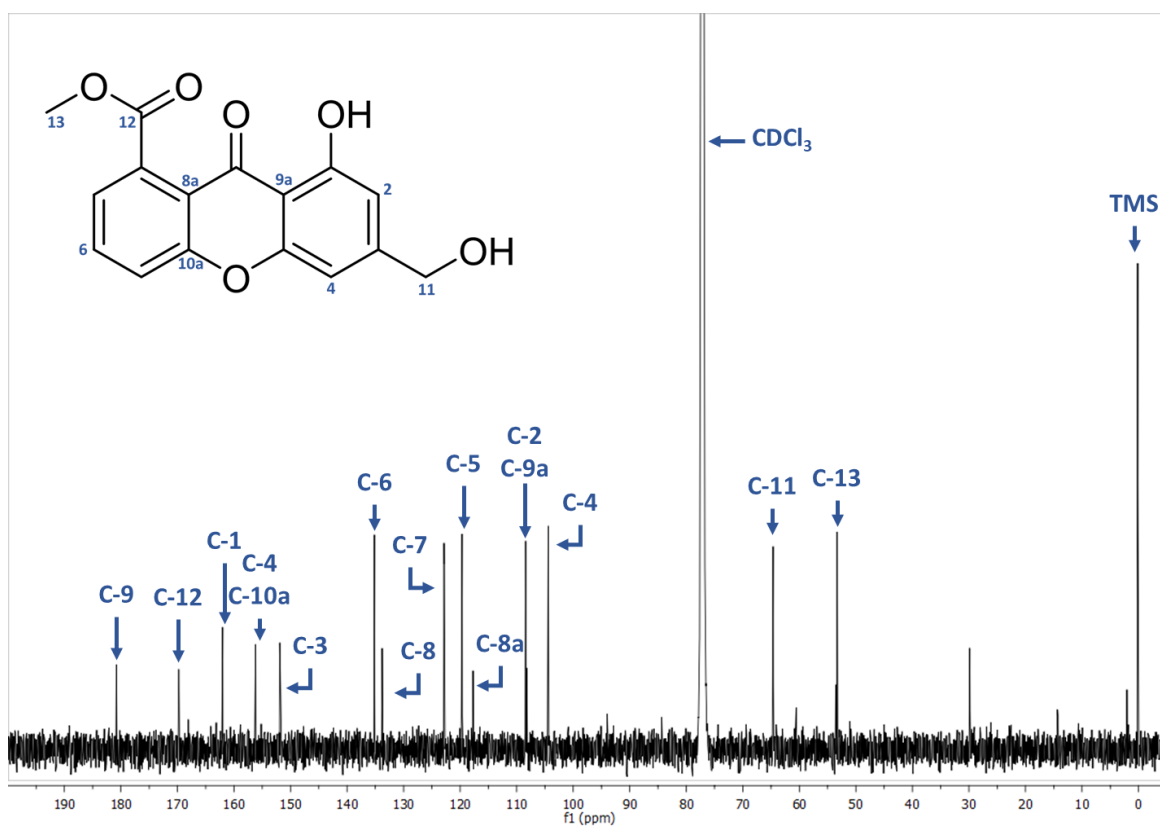


Figura A8. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ del compuesto sydownina A (**120**) en CDCl_3 a 175 MHz.

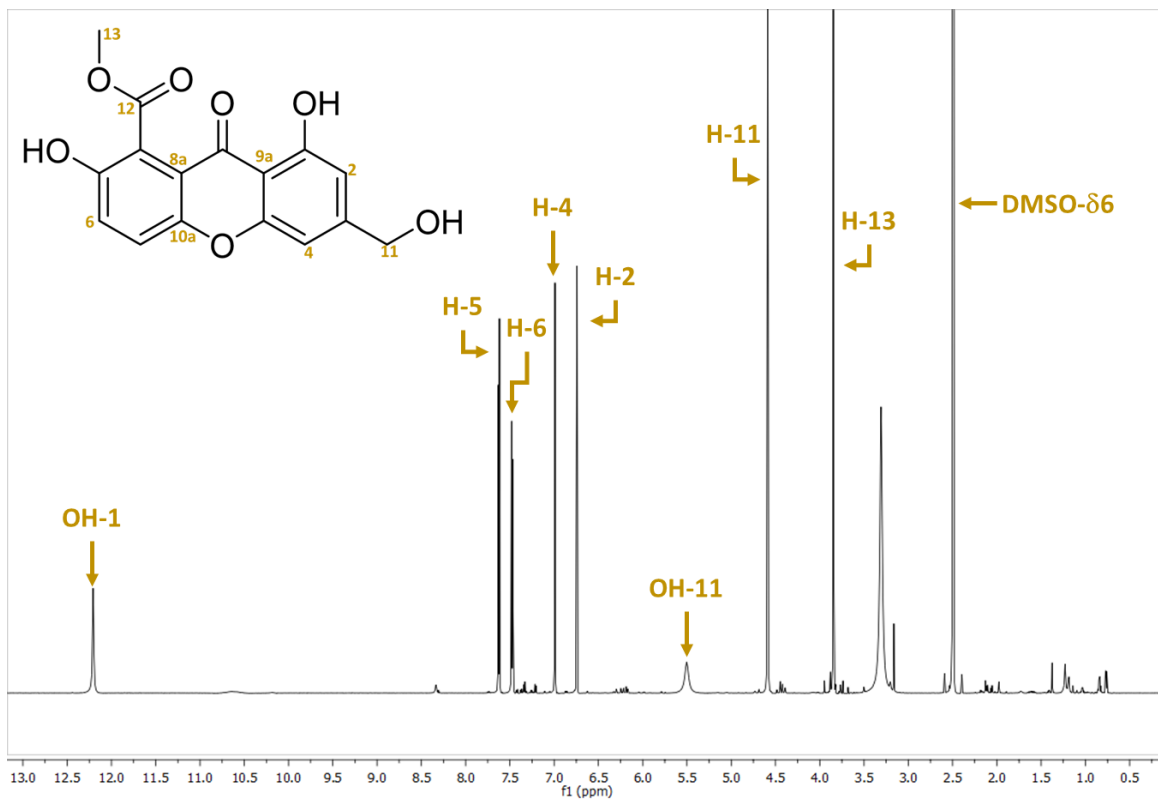


Figura A9. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del compuesto sydownina B (**121**) en $\text{DMSO-}d_6$ a 700 MHz.

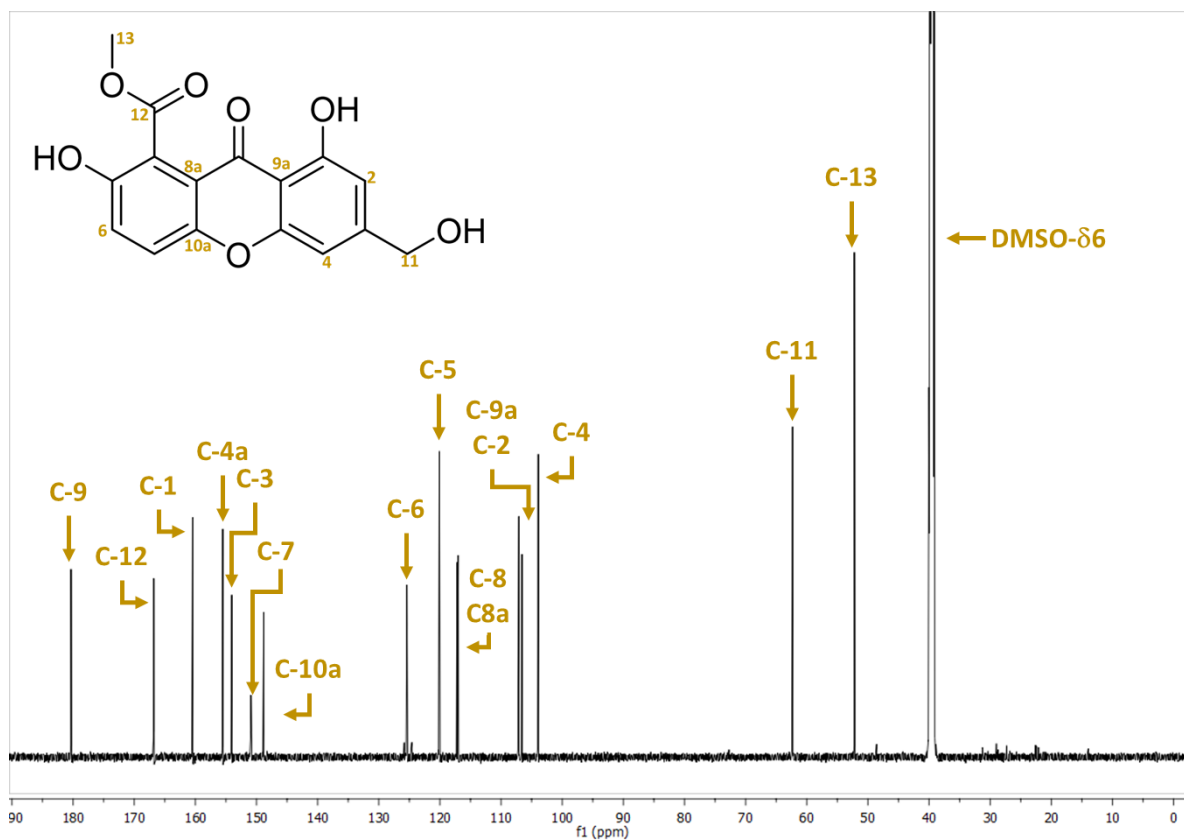


Figura A10. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ del compuesto sydownina B (**121**) en $\text{DMSO-}d_6$ a 175 MHz.

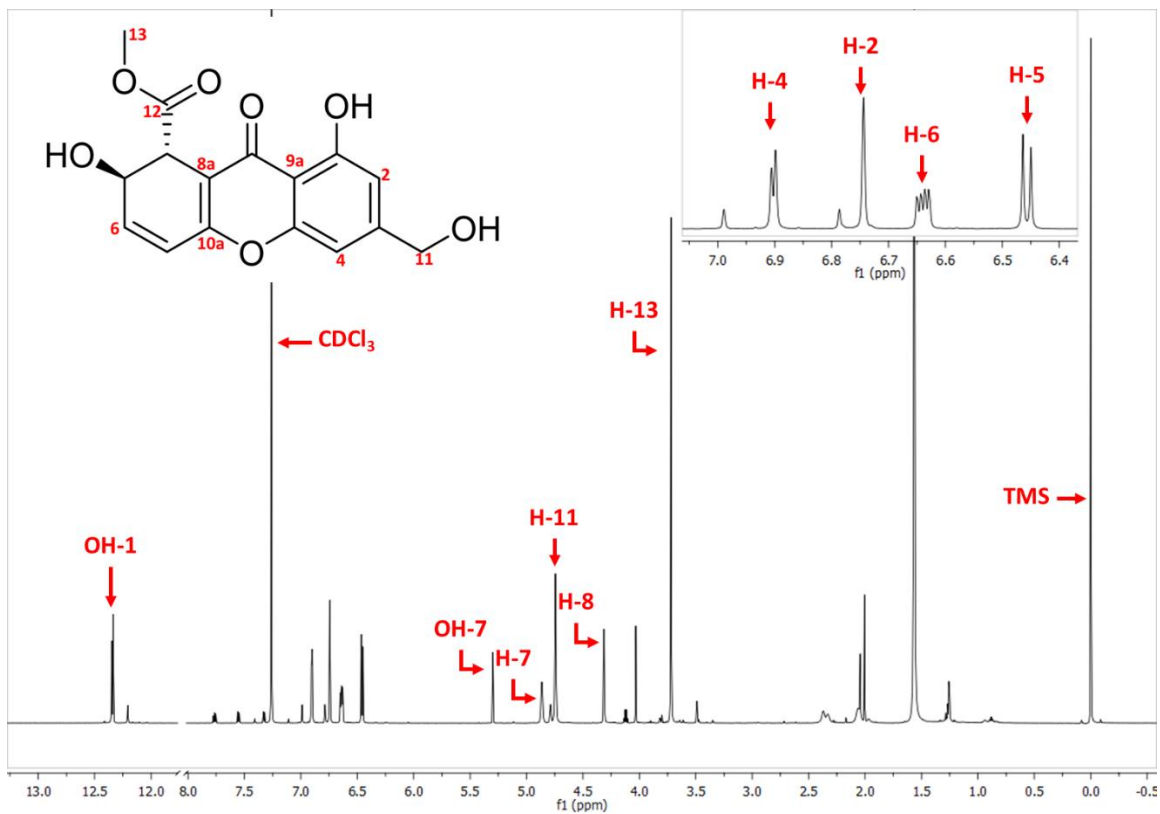


Figura A11. Espectro de ¹H-RMN del compuesto AGI-B4 (**124**) en CDCl₃ a 700 MHz.

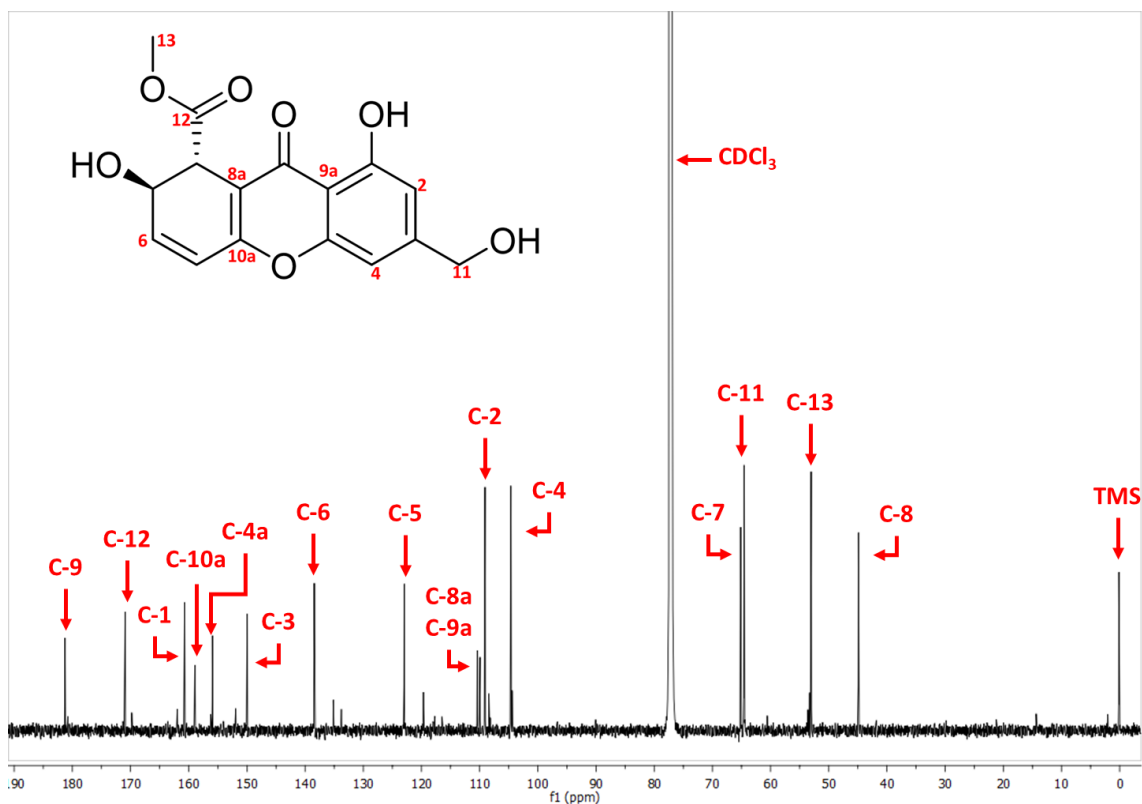


Figura A12. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto AGI-B4 (**124**) en CDCl₃ a 175 MHz.

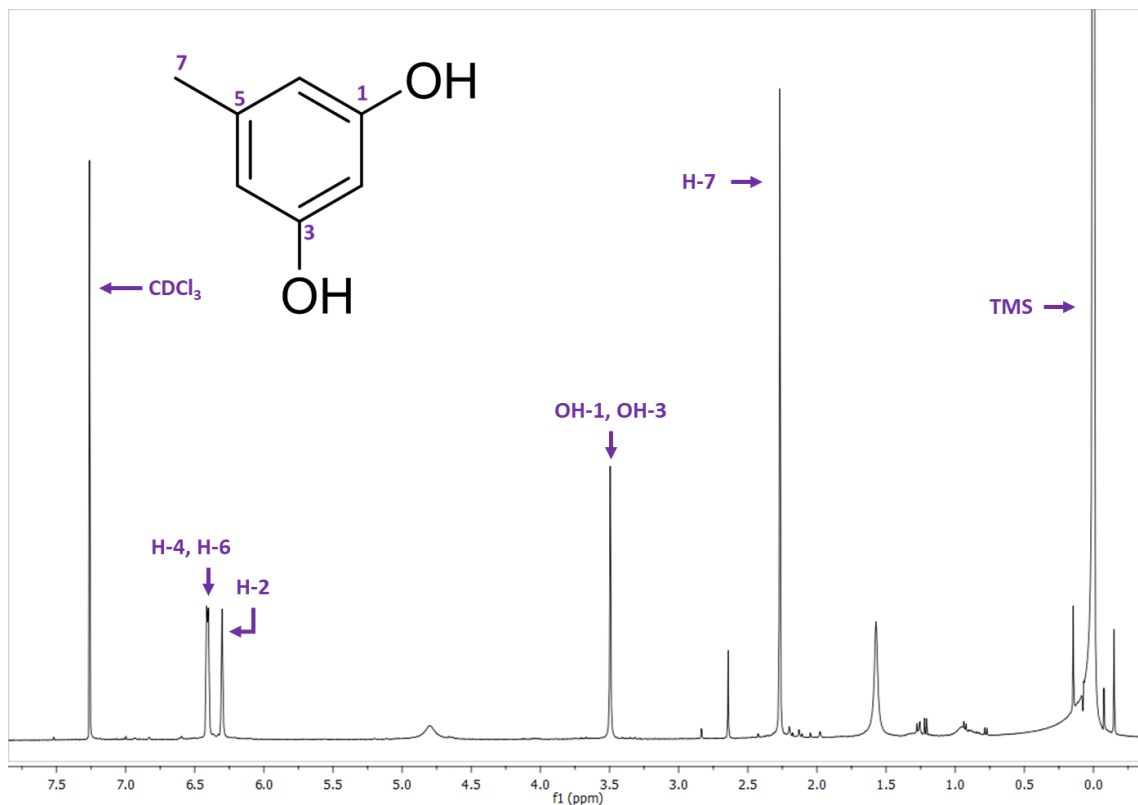


Figura A13. Espectro de ^1H -RMN del compuesto orcinol (**162**) en CDCl_3 a 400 MHz.

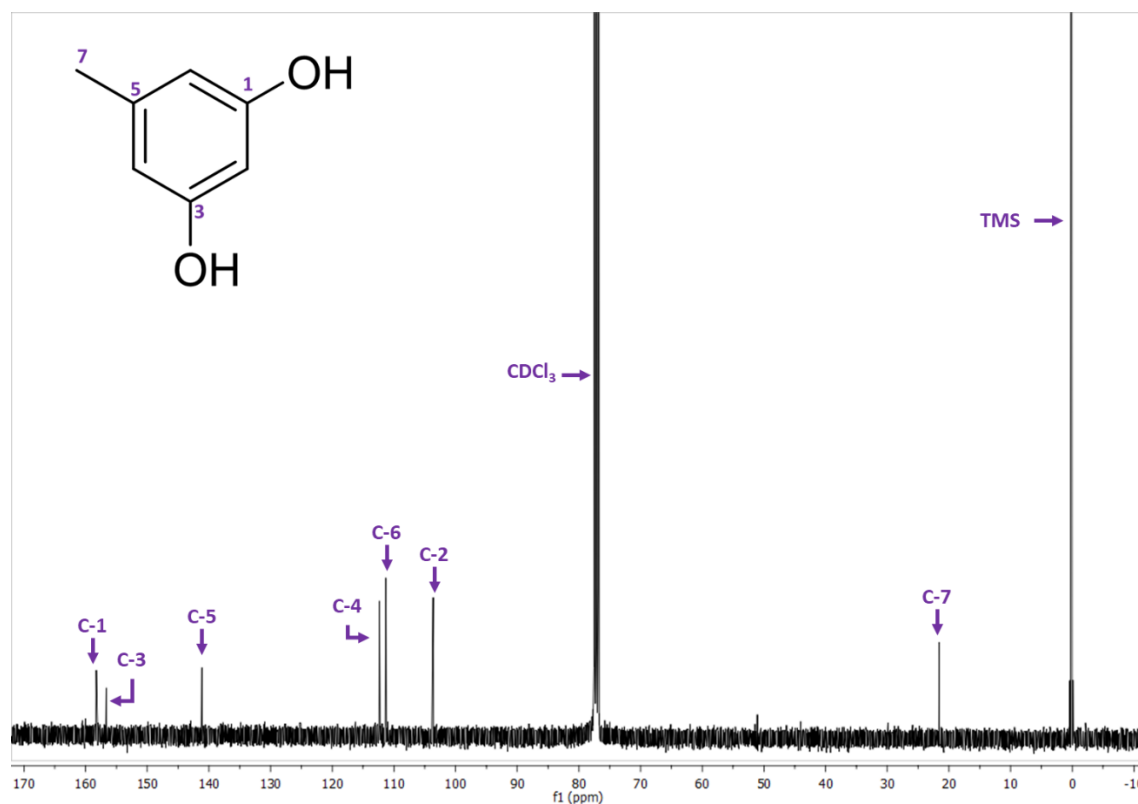


Figura A14. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto orcinol (**162**) en CDCl_3 a 100 MHz.

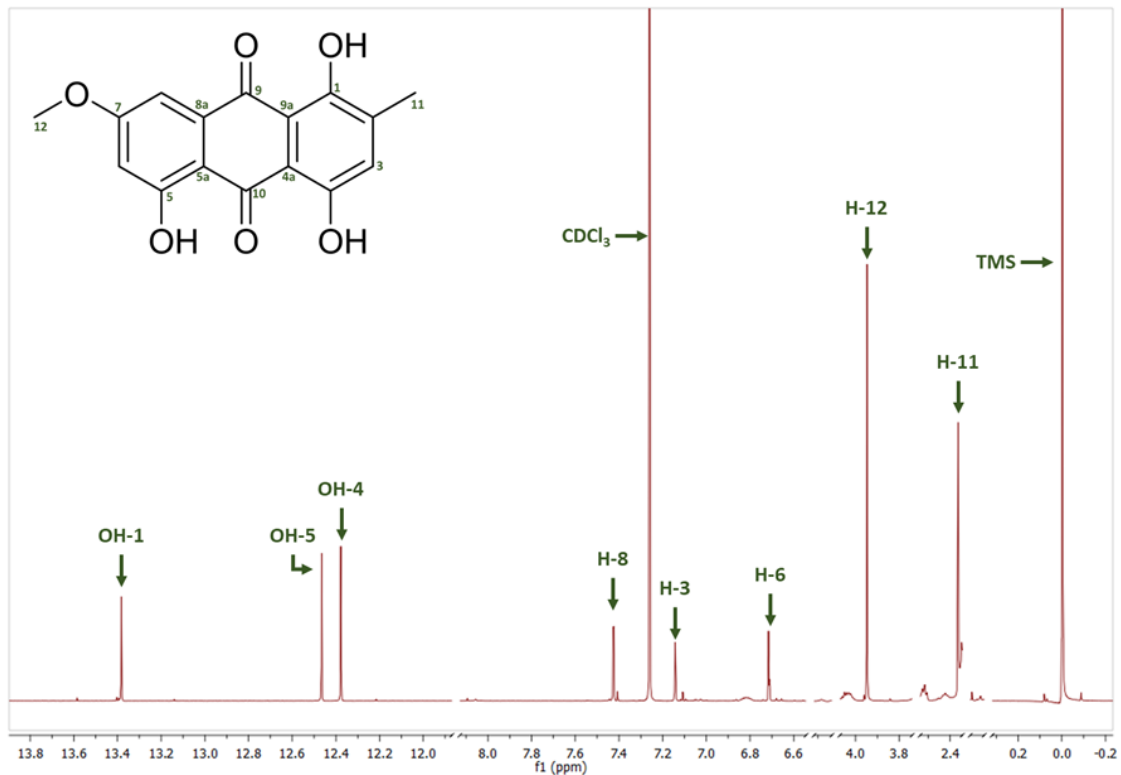


Figura A15. Espectro de ¹H-RMN del compuesto eritroglauca (57) en CDCl₃ a 700 MHz.

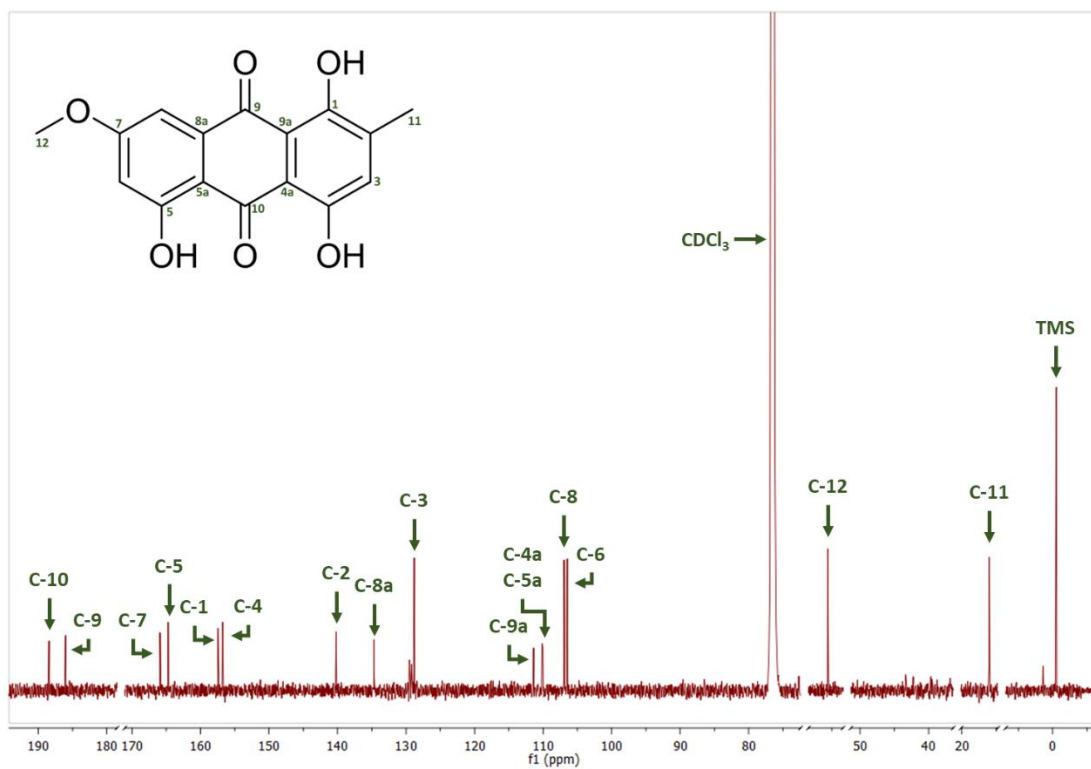


Figura A16. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto eritroglauca (57) en CDCl₃ a 175 MHz.

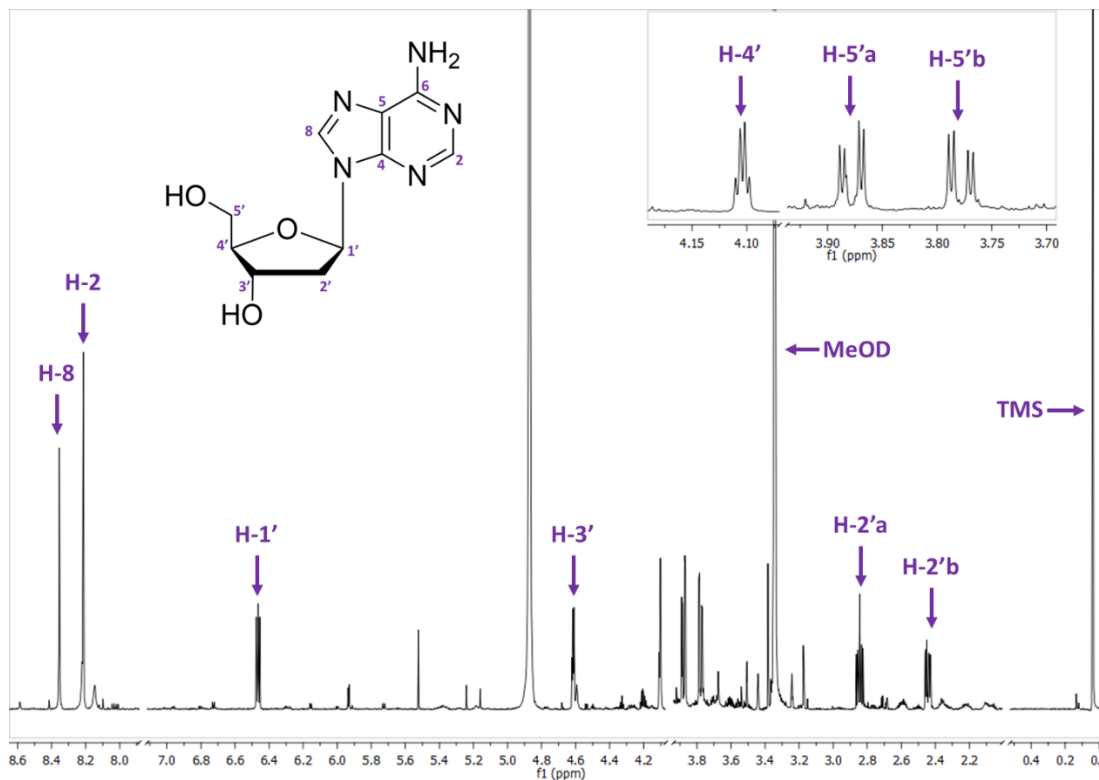


Figura A17. Espectro de ¹H-RMN del compuesto desoxiadenosina (**163**) en CD₃OD a 700 MHz.

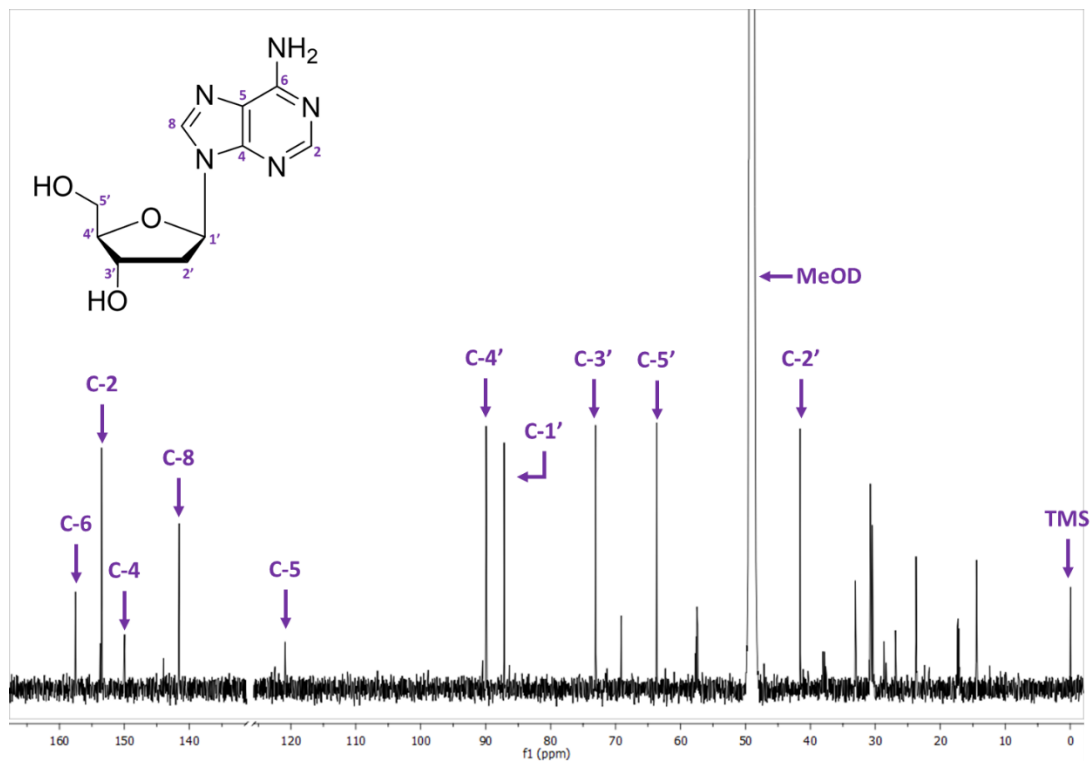


Figura A18. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto desoxiadenosina (**163**) en CD₃OD a 175 MHz.

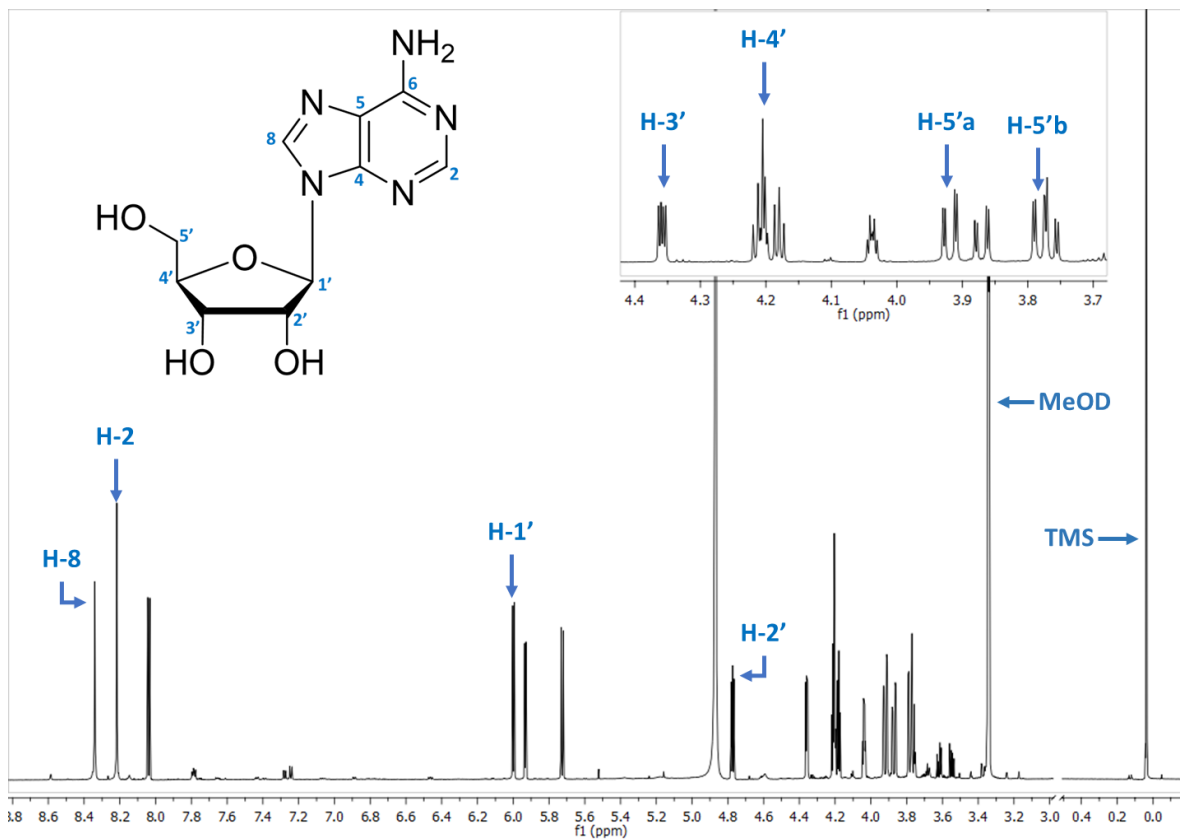


Figura A19. Espectro de ¹H-RMN del compuesto adenosina (55) en CD₃OD a 700 MHz.

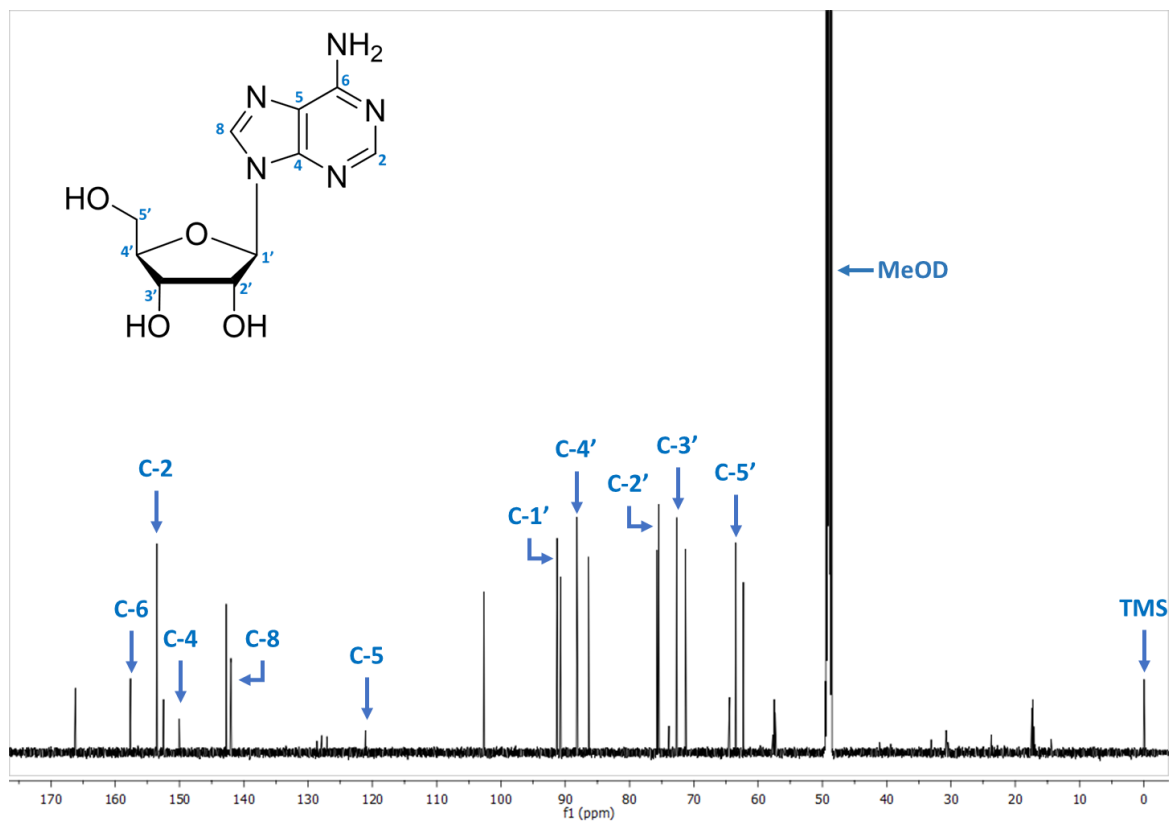


Figura A20. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto adenosina (55) en CD₃OD a 175 MHz.

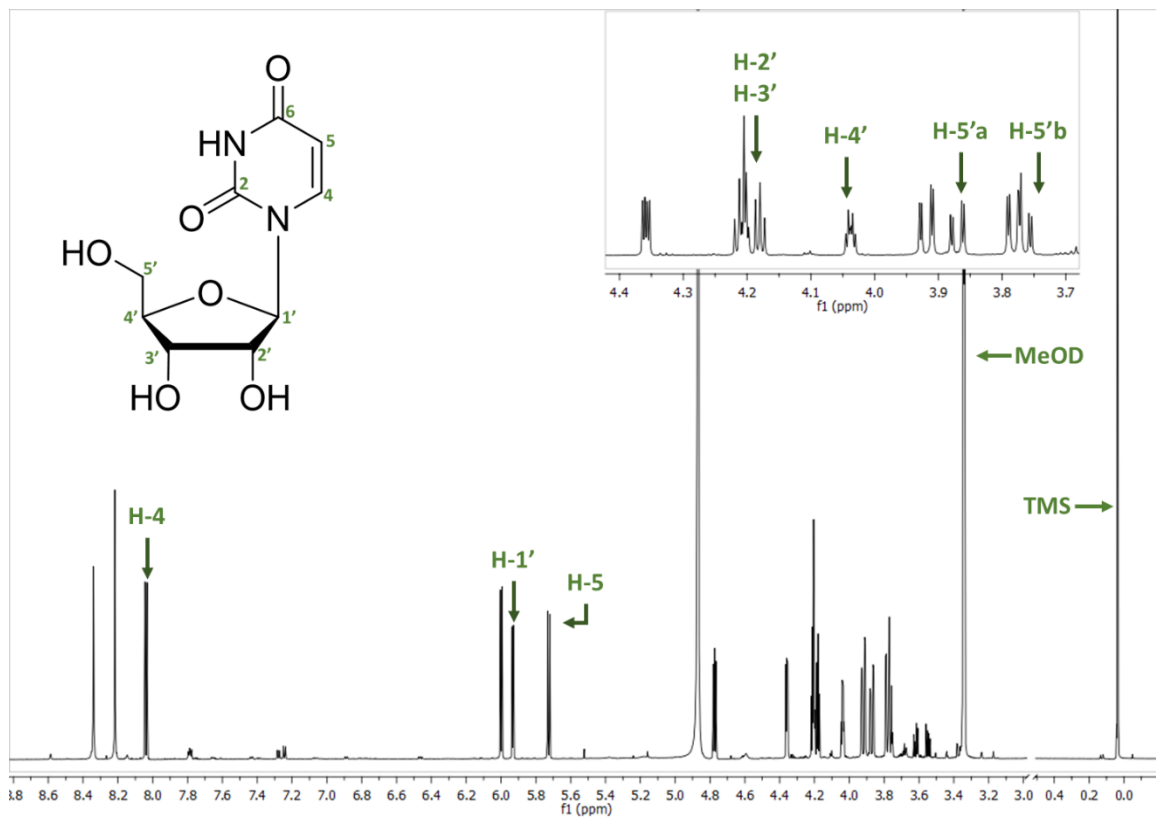


Figura A21. Espectro de ¹H-RMN del compuesto uridina (165) en CD₃OD a 700 MHz.

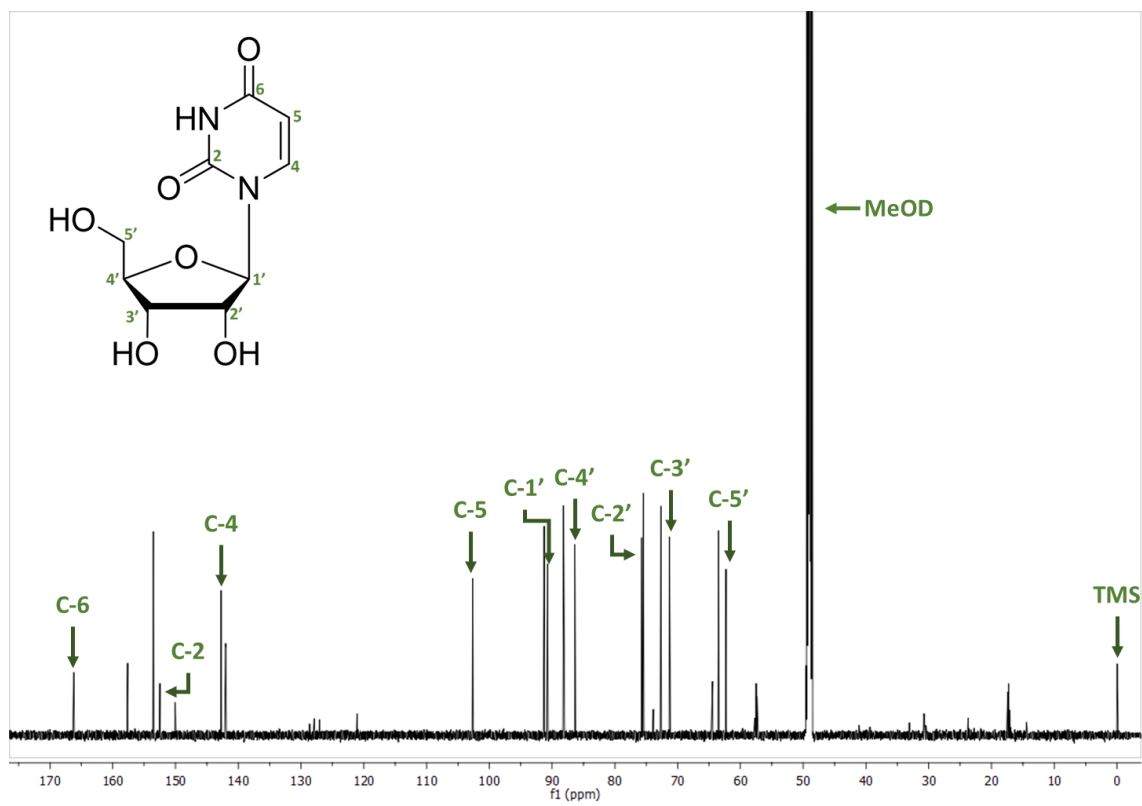


Figura A22. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto uridina (165) en CD₃OD a 175 MHz.

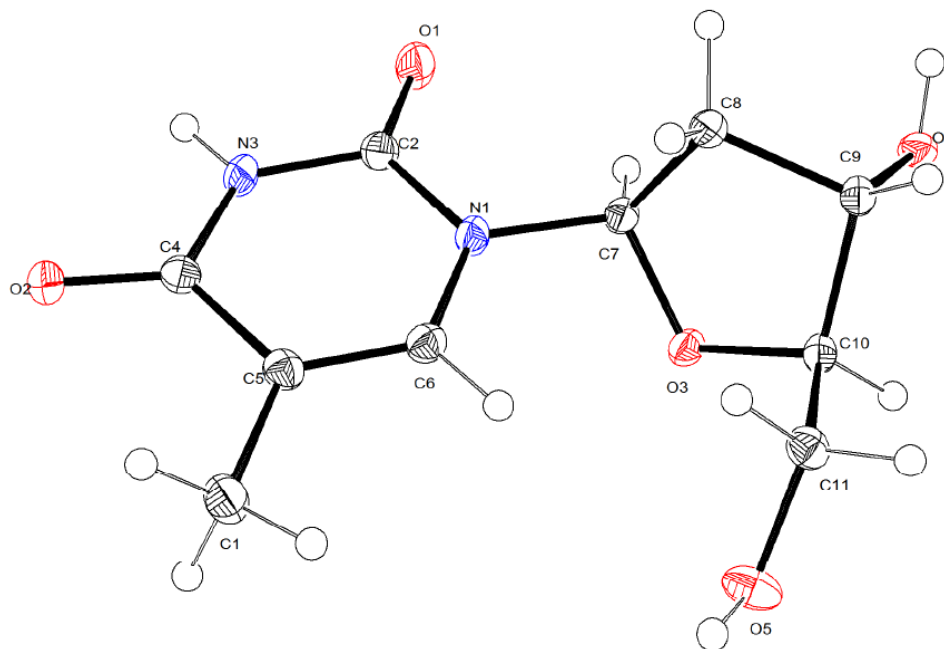


Figura A23. Estructura ORTEP de la timidina (**164**) generada por difracción de rayos X.

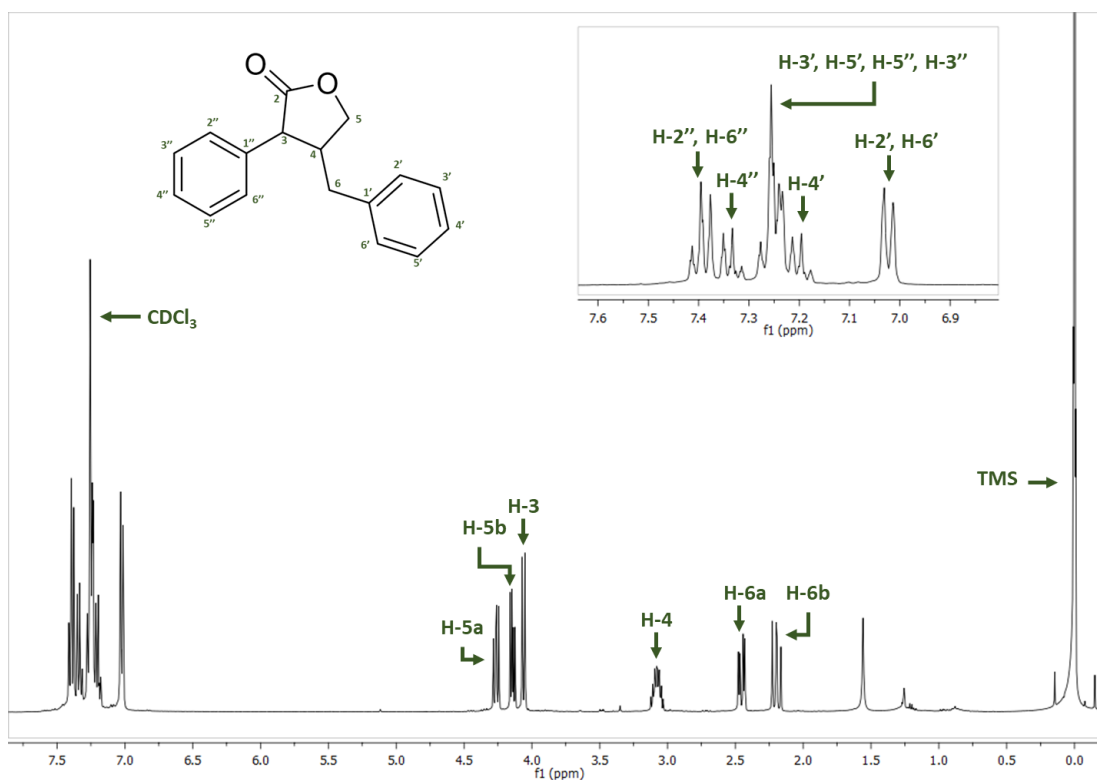


Figura A24. Espectro de ¹H-RMN del derivado dihidrogenado (**167a/167b**) en CDCl₃ a 400 MHz.

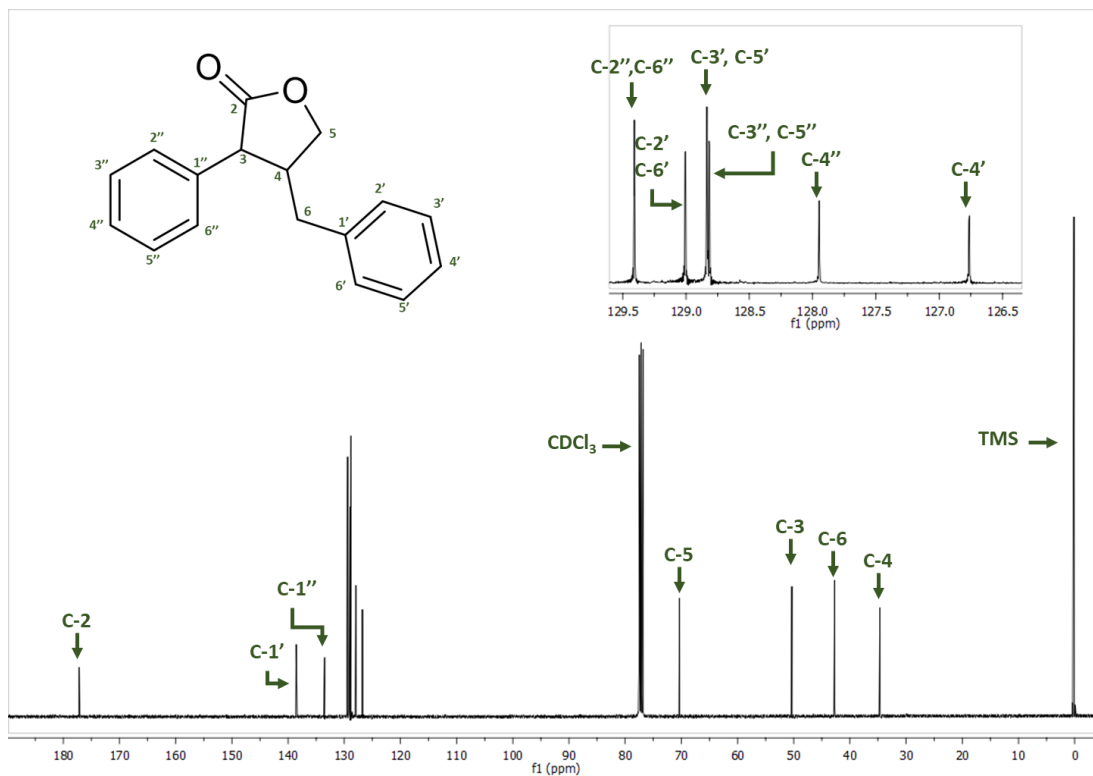


Figura A25. Espectro de ^{13}C -RMN del derivado dihidrogenado (**167a/167b**) en CDCl_3 a 100 MHz.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:24 STE-8685 RMII-HGA

Sample Name:Dra Rachel Mata / Operador: Carmen Garcia

Description:

Ionization Mode:ESI+

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

Acquired:3/3/2021 4:13:29 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal_Peg 600

Created:3/3/2021 4:57:09 PM

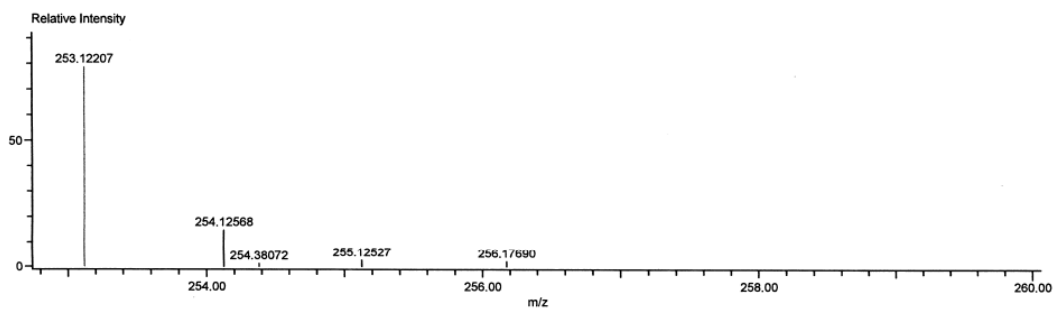
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

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

Element: ^{12}C :0 .. 20, ^1H :0 .. 20, ^{16}O :0 .. 3



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
253.12207	116961.60	253.12285	-0.78	-3.09	$^{12}\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_2$	9.5

Figura A26. Análisis de espectrometría de masas de alta resolución del derivado dihidrogenado (**167a/167b**).

Anton Paar GmbH
Anton Paar Strasse 10
8054 Graz
Austria



Anton Paar Polarimeter - Measurement(s)

MCP 150
Software Version: 1.50.4074.82
Serial Number: 82104658

Unique Id 907

- ▶ Sample Name: Dihidro-GA (HGA).1mg per ml.methanol
- ▶ Date: 01/29/2021 - 11:16 AM
- ▶ Username: Administrator
- ▶ Sample State: Ok
- ▶ Measurement Mode: Specific Rotation
- ▶ Measurement Result: -4,000 °
- ▶ Concentration: 1,000 g/l
- ▶ Optical Rotation: -0,004 °
- ▶ Set Temperature: 20.0 °C
- ▶ Temperature: 20.0 °C
- ▶ Wavelength in air: 589.28 nm
- ▶ Wavelength in vacuum: 589.44 nm
- ▶ Cell Length: 100.00 mm

Friday, January 29, 2021 | 11:39:16 AM

Signature

Figura A27. Análisis de rotación óptica del derivado dihidrogenado (167a/167b).

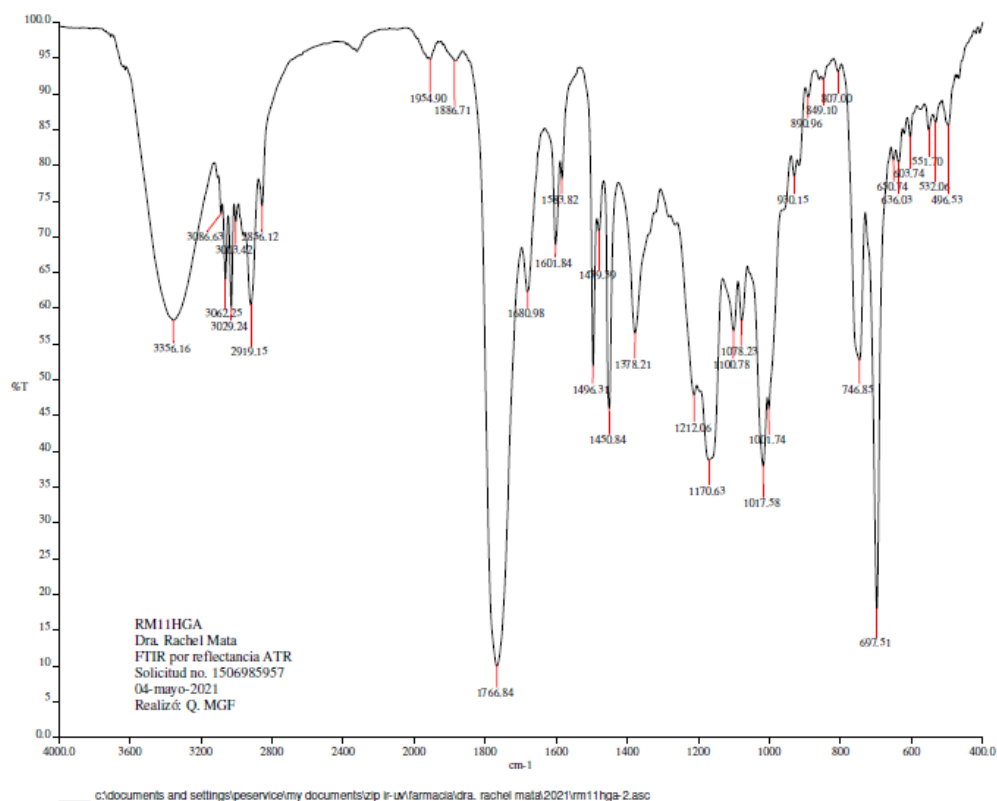


Figura A28. Análisis de IR del derivado dihidrogenado (167a/167b).

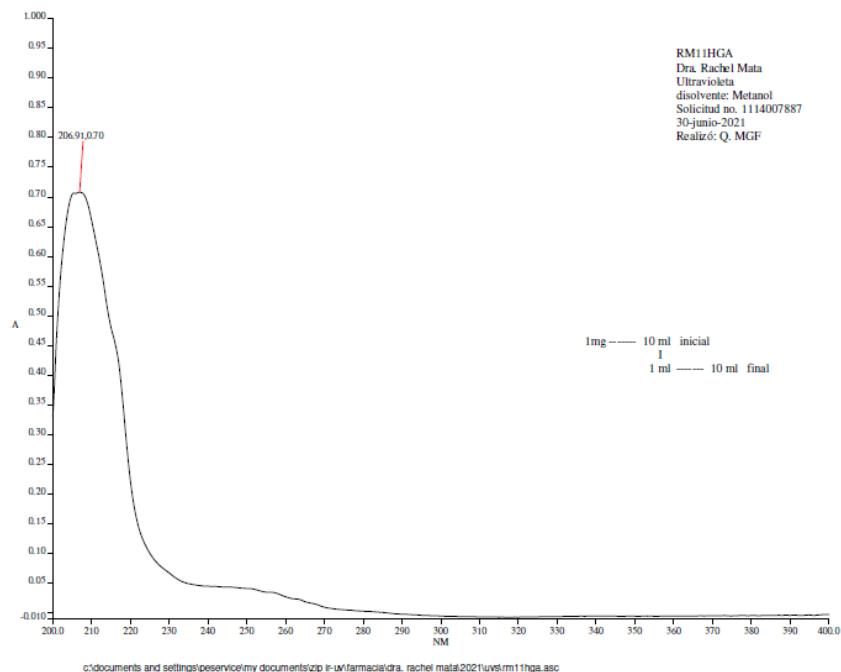


Figura A29. Análisis de UV del derivado dihidrogenado (167a/167b).

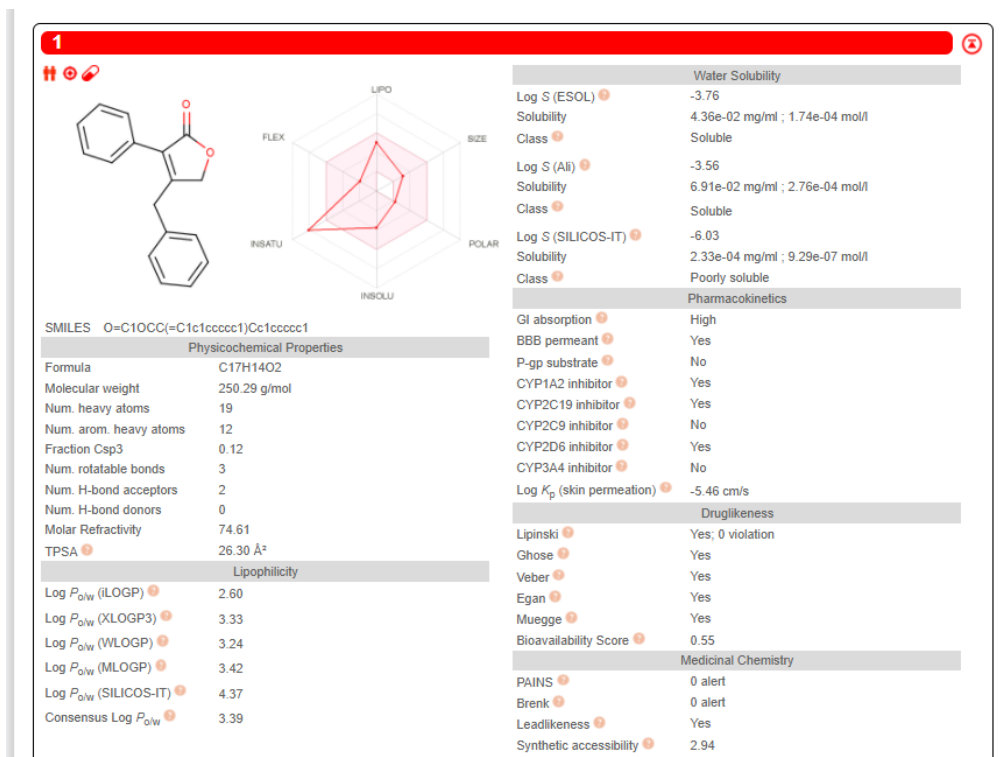


Figura A 30. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto 46, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.

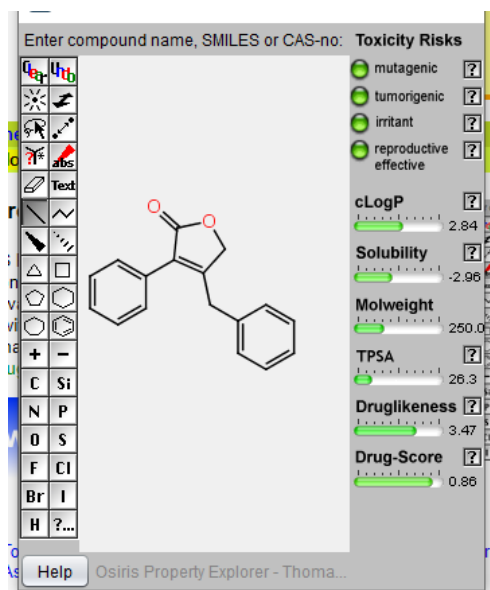


Figura A31. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto **46** obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

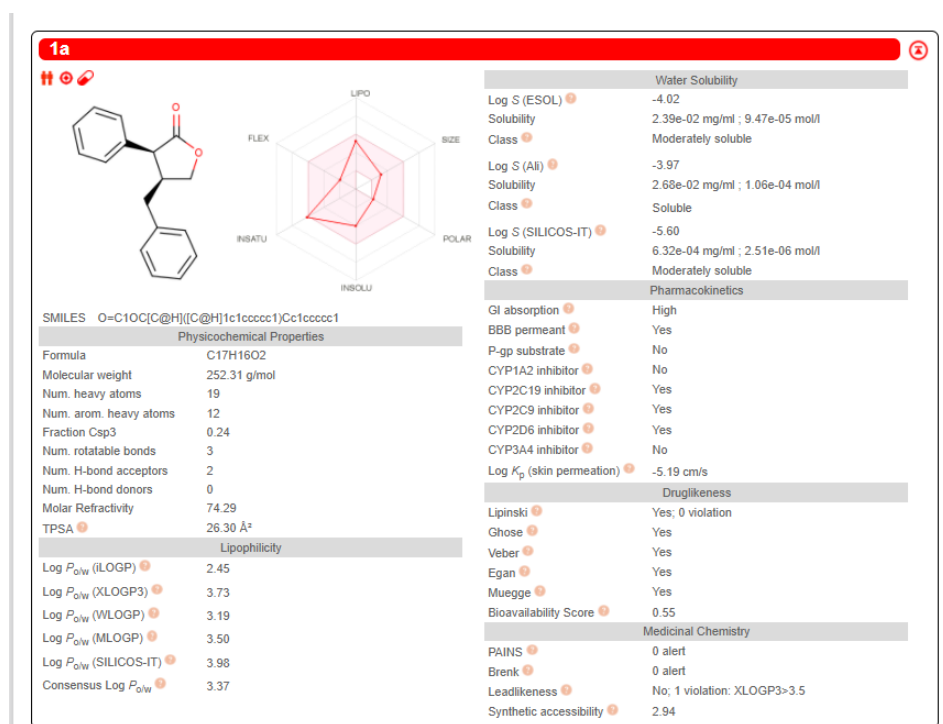


Figura A32. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **167a**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.

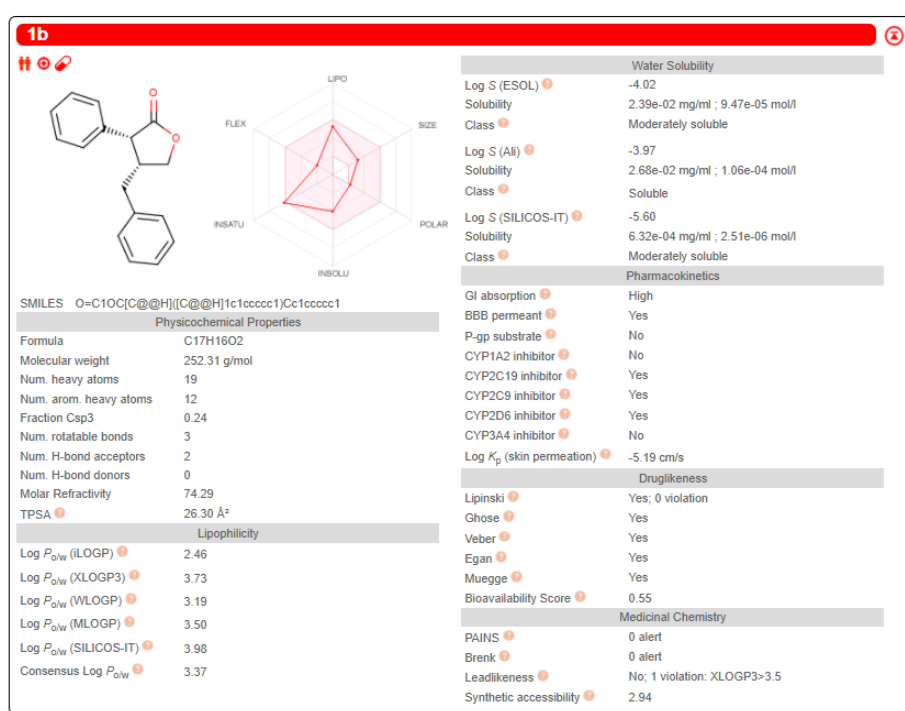


Figura A33. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **167b**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.

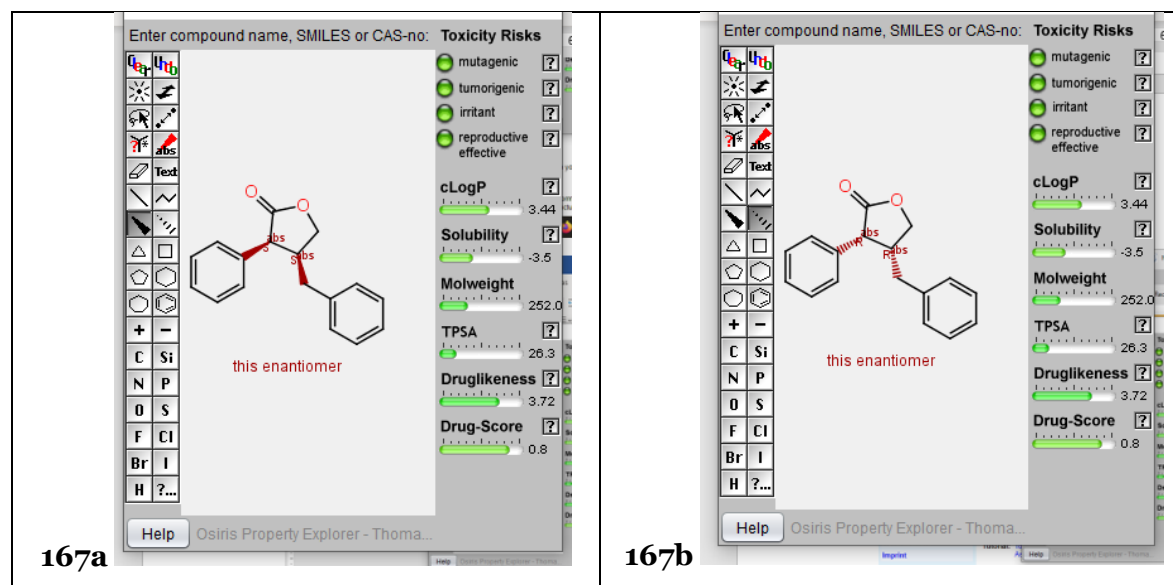


Figura A34. Resultados predictivos de toxicidad de los compuestos **167a** y **167b** obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

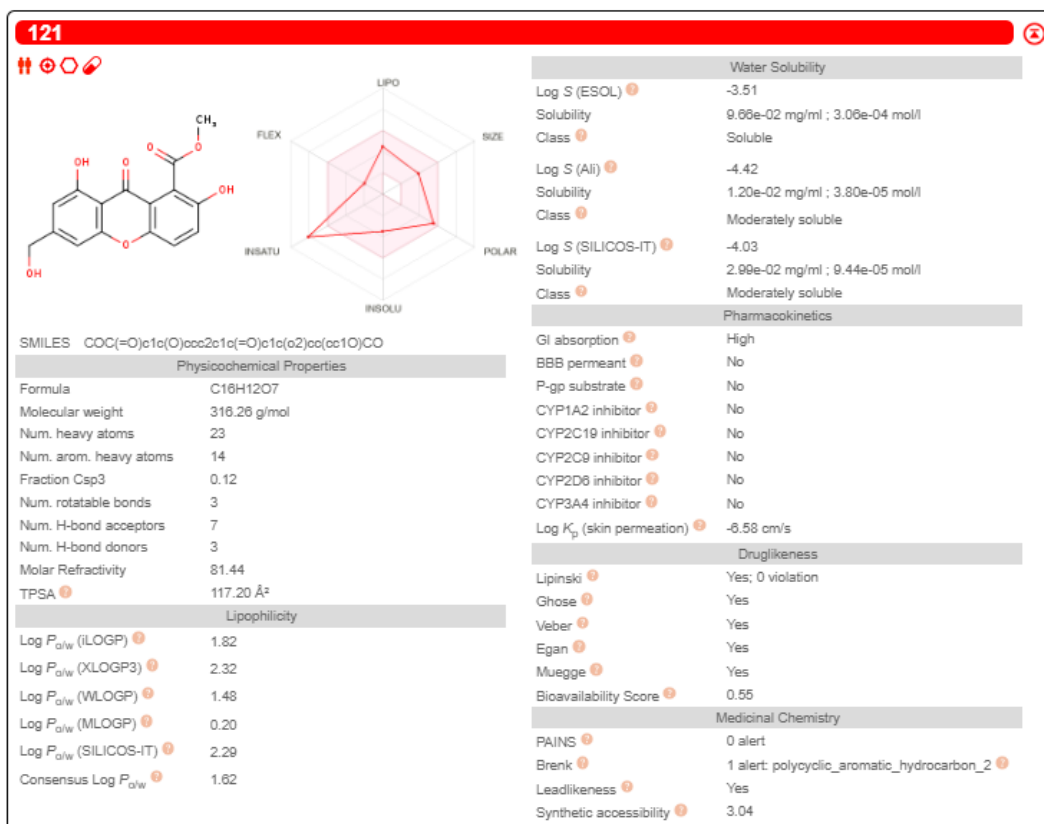


Figura A35. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **121**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.

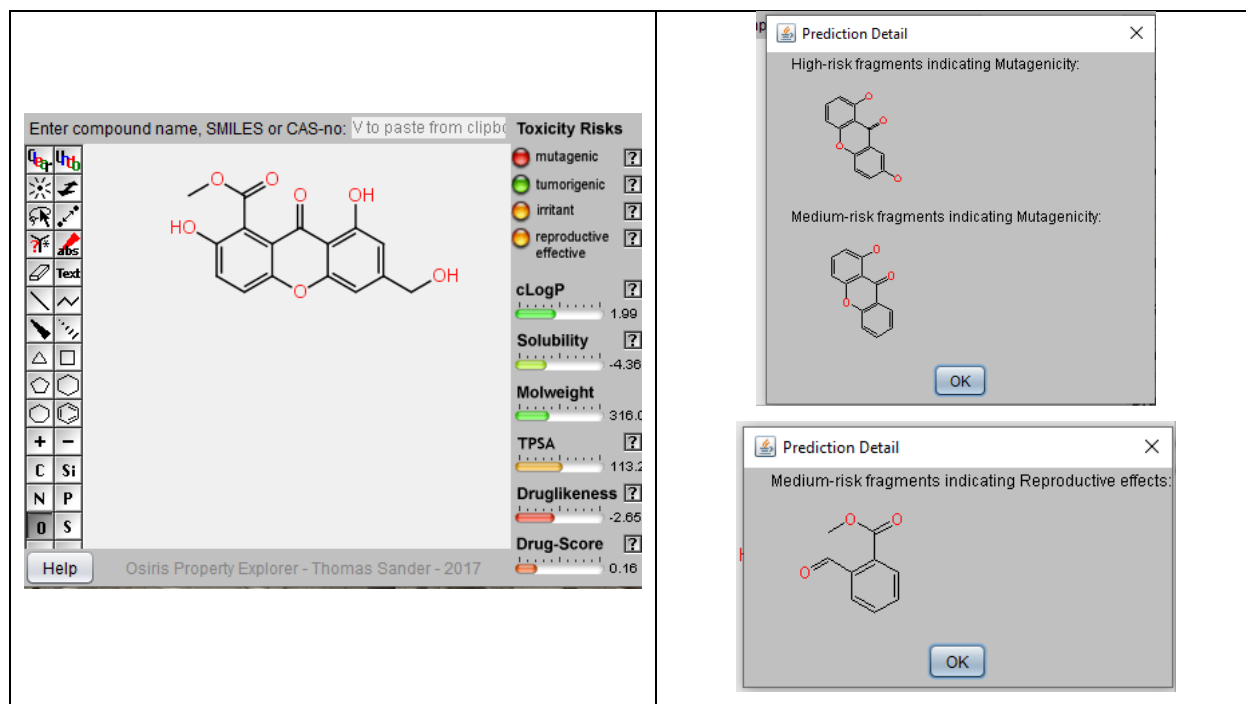


Figura A36. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto **121** obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer, también se indican los fragmentos que marcan alertas como posibles causante de efectos reproductivos y mutagénicos (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

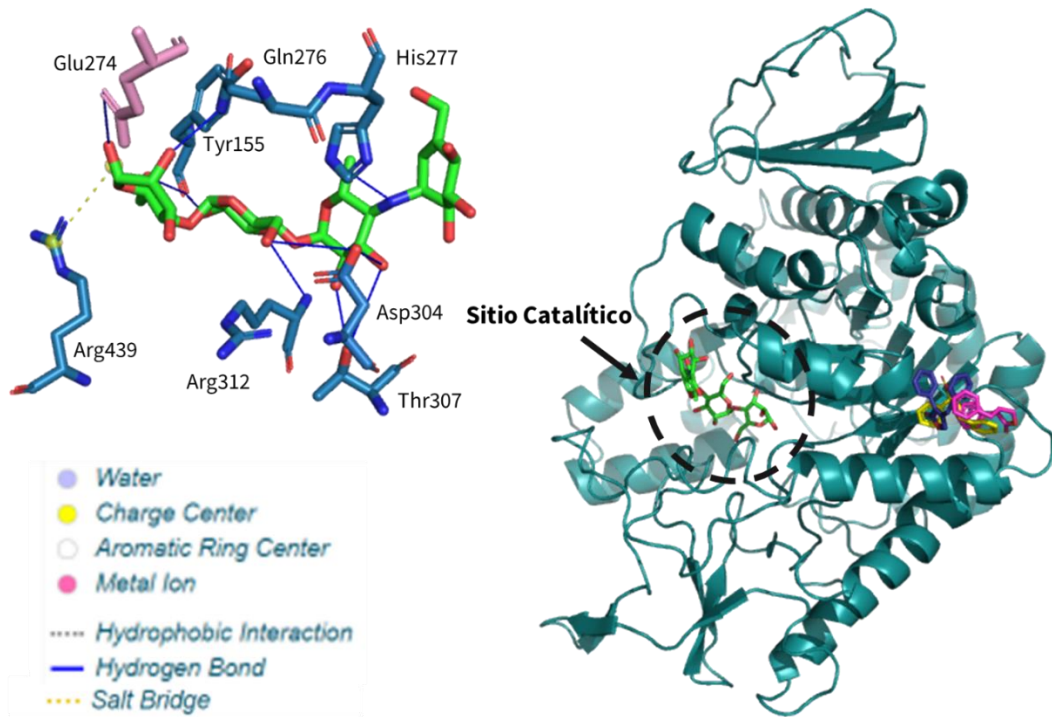


Figura A37. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (PDB:3A4A) representada en caricatura azul claro, con el control positivo acarbosa representada en color verde en el sitio catalítico de la enzima.

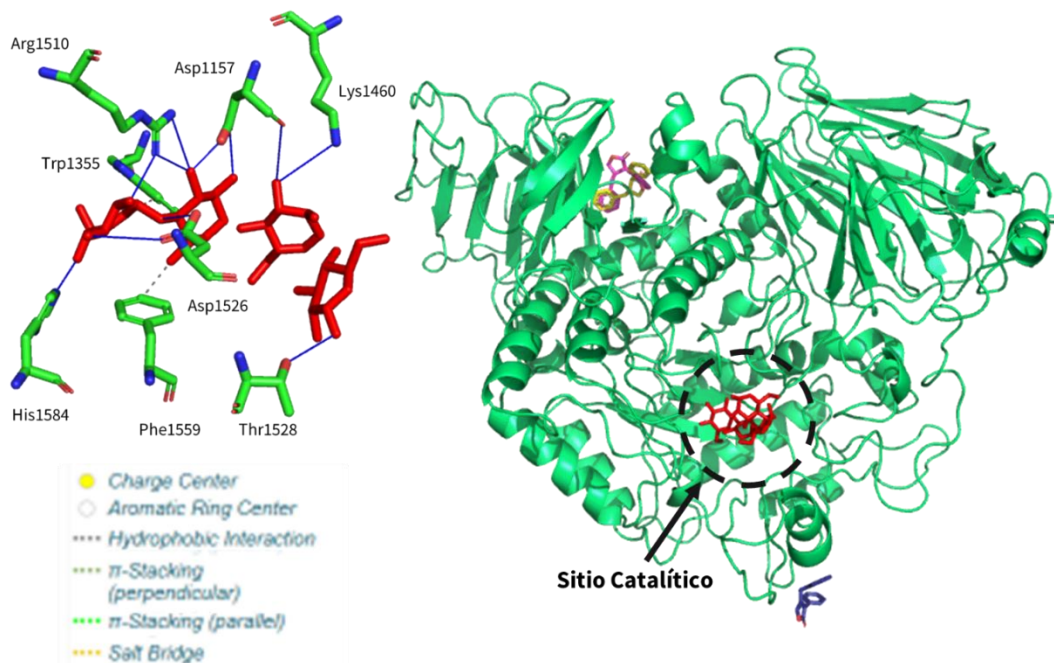


Figura A38. Modelo estructural de los sitios de unión de la subunidad C-terminal de la maltasa glucoamilasa de humano (PDB:3TOP) representada en caricatura verde claro, con el control positivo acarbosa, representado en color rojo en el sitio catalítico de la enzima.

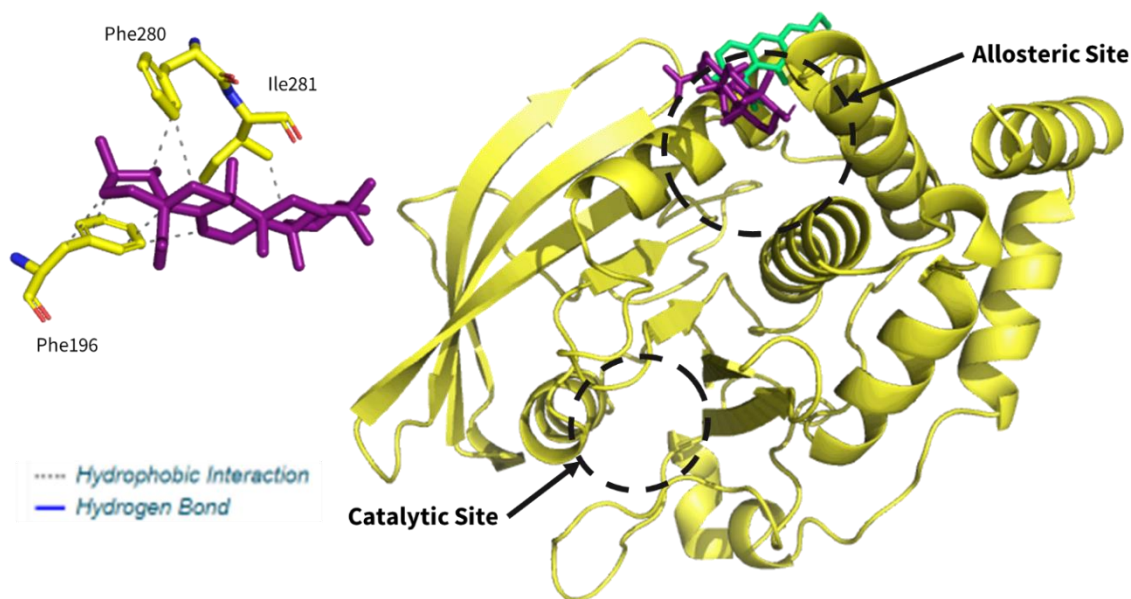


Figura A39. Modelo estructural de los sitios de unión de la enzima PTP-1B (PDB:1T49) representada en caricatura amarilla, con el ácido ursólico, control positivo, el cual está representado en color morado en el sitio alostérico de la enzima.

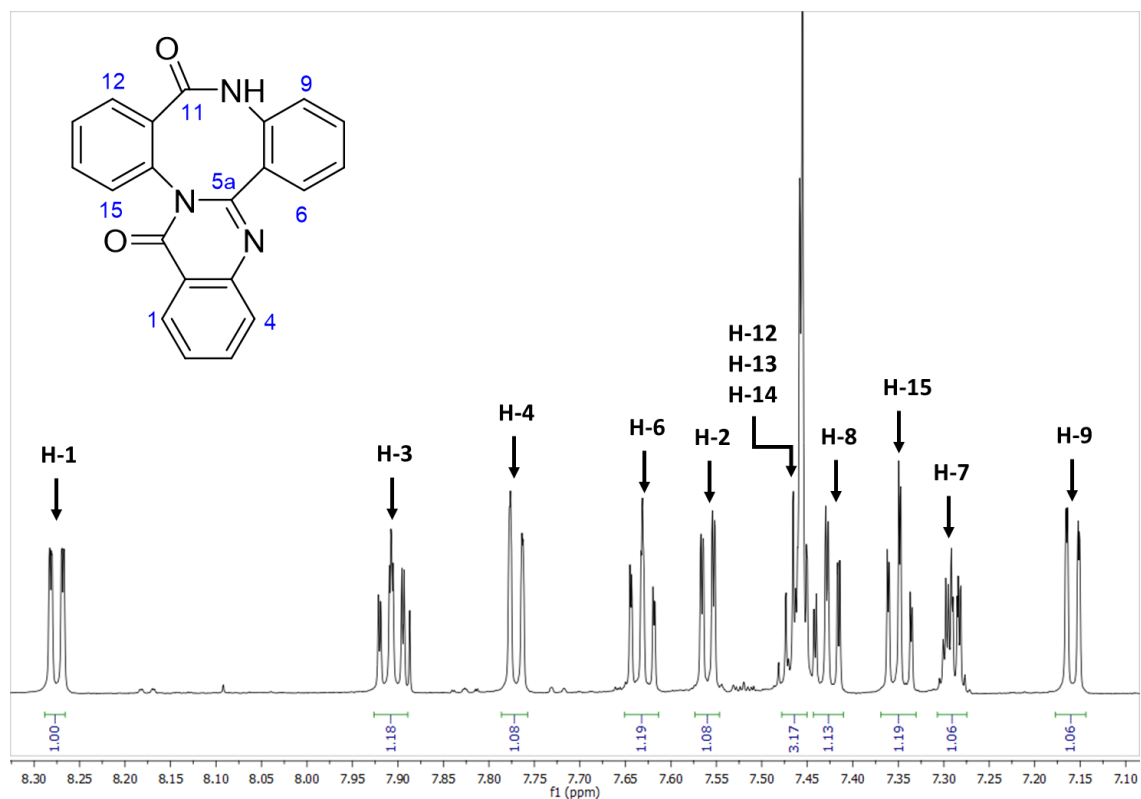


Figura A40. Espectro de ^1H -RMN del trímero de ácido antranílico (**105**) en CD_3OD a 400 MHz.

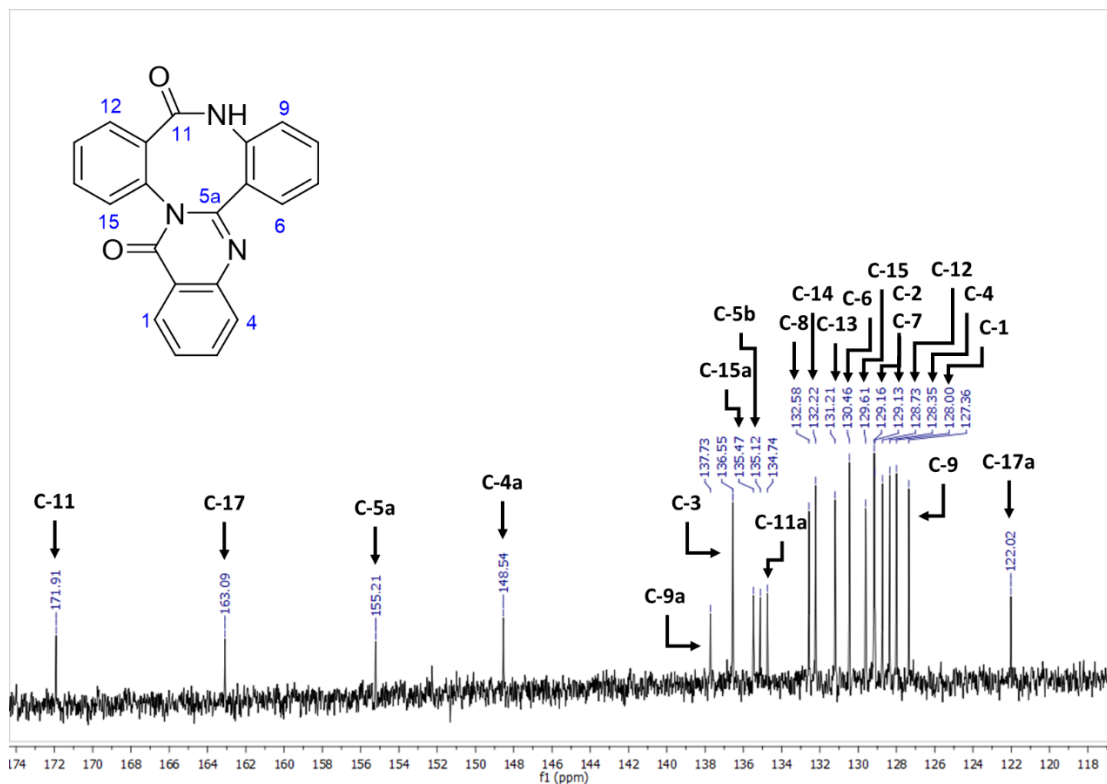


Figura A41. Espectro de ^{13}C -RMN del trímero de ácido antranílico (**105**) en CD_3OD a 100 MHz.

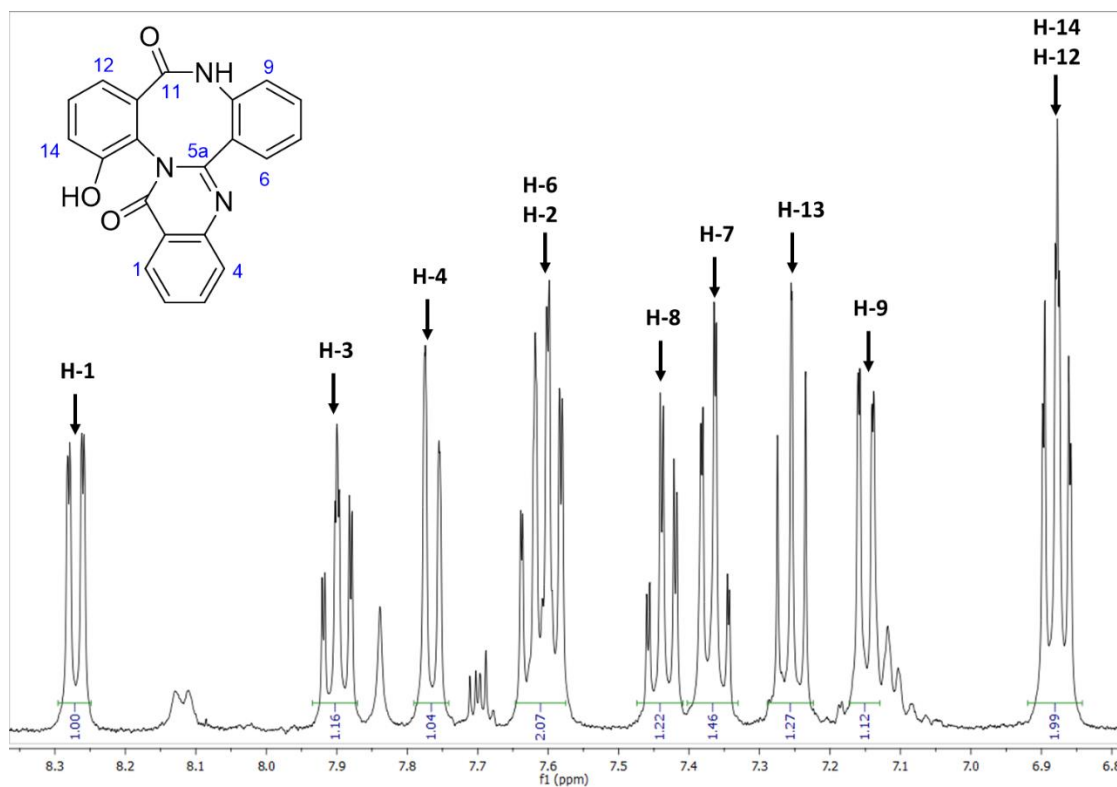


Figura A42. Espectro de ^1H -RMN del trímero hidroxilado de ácido antranílico (**106**) en CD_3OD a 400 MHz.

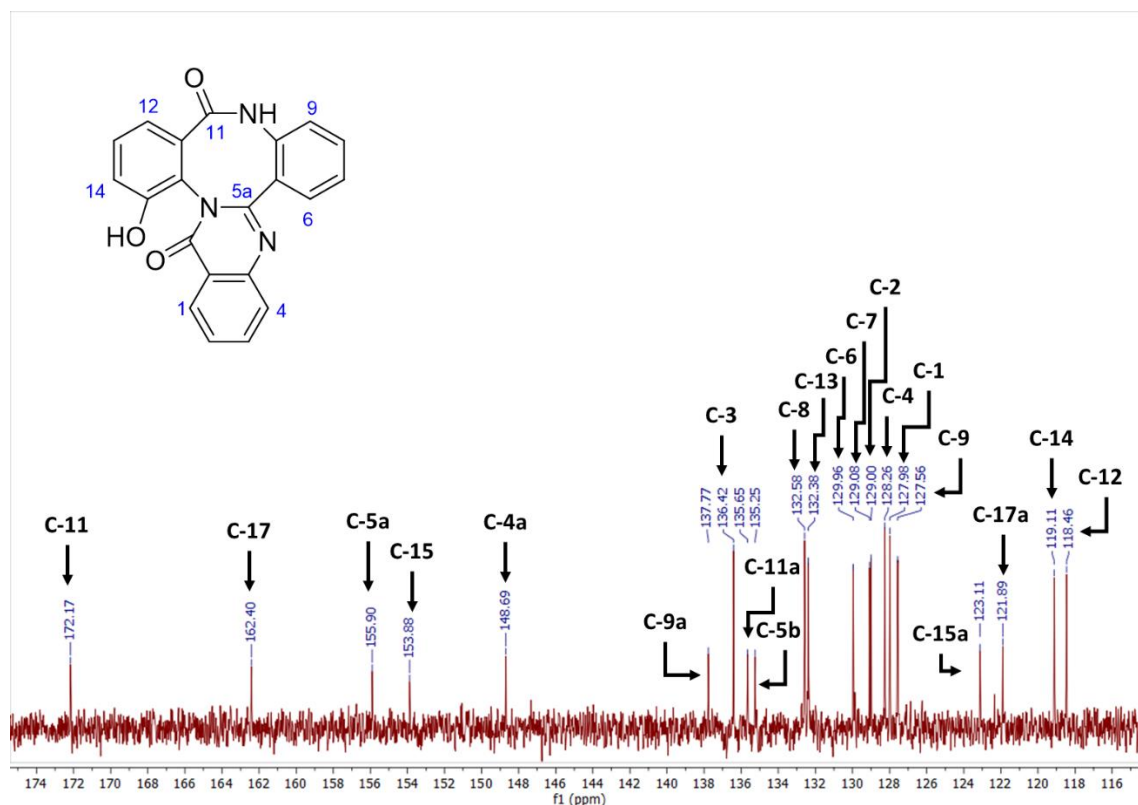


Figura A43. Espectro de ^{13}C -RMN del trímero hidroxilado de ácido antránico (**106**) en CD_3OD a 100 MHz.

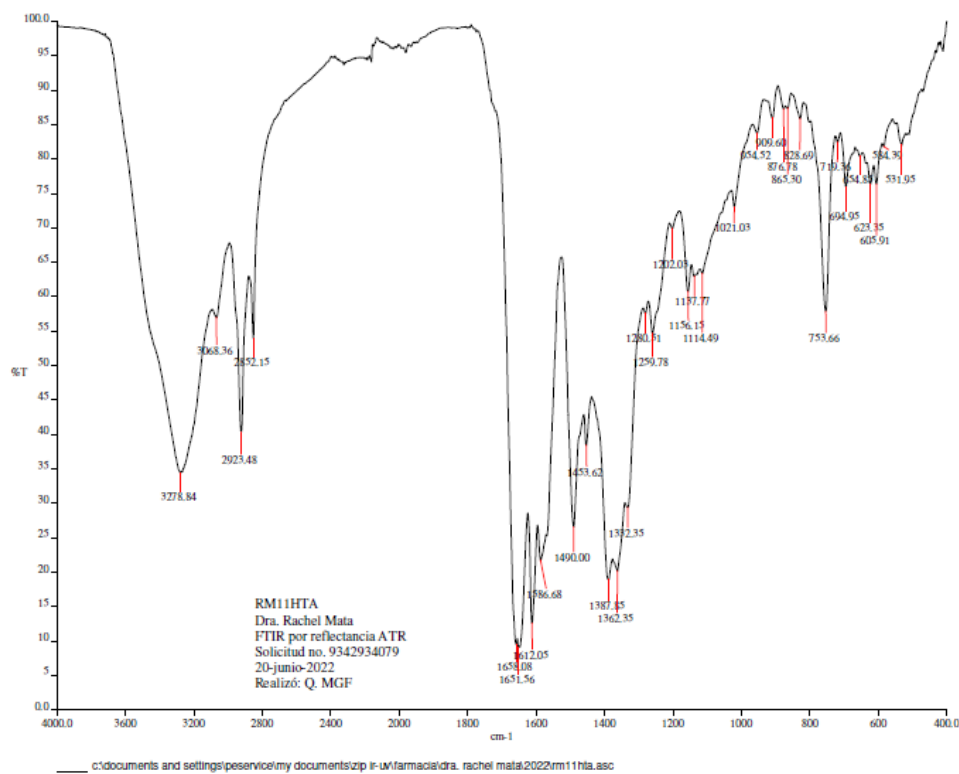


Figura A44. Espectro de IR del compuesto **168**.

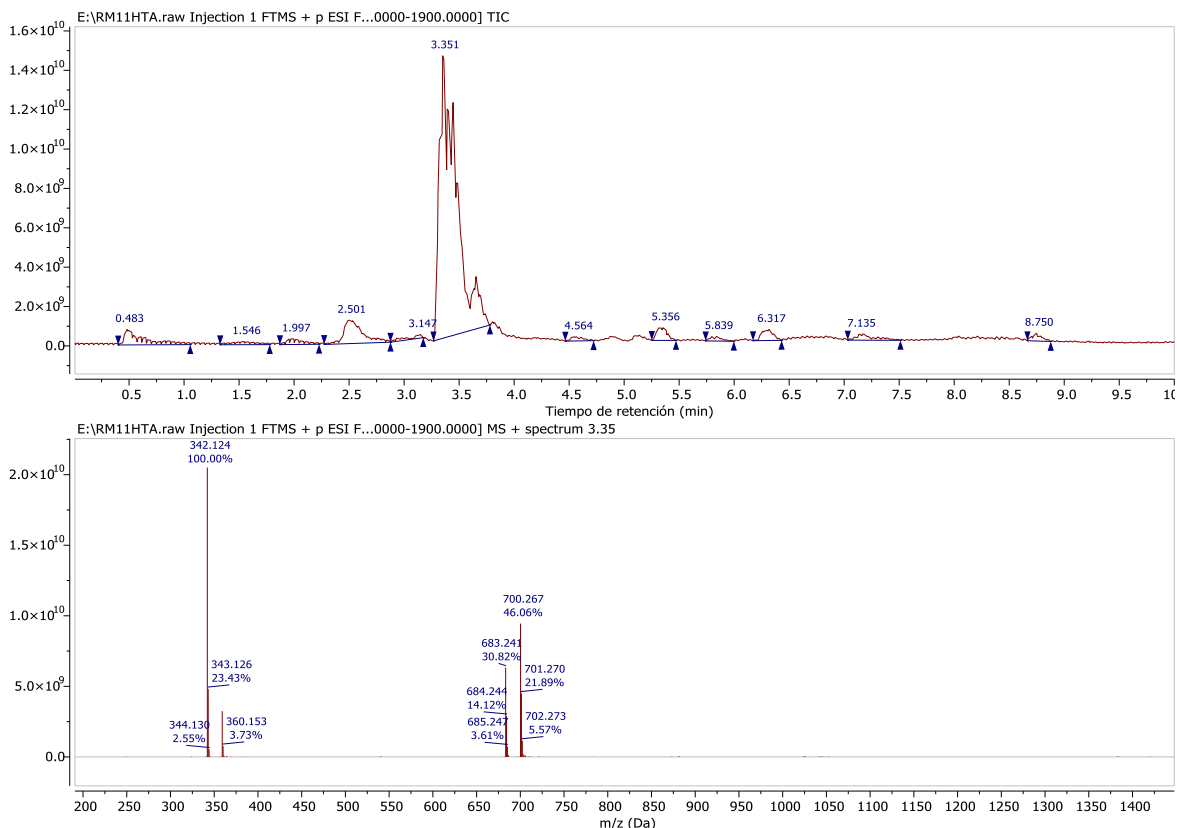


Figura A45. Espectro de masas exactas del compuesto **168** obtenido mediante ESI en modo positivo.



INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

POLARIMETRÍA

Muestra: <u>RM11-HTA</u>	Investigador: <u>Dra. Patricia Cano Sánchez/Secretaría Técnica</u>
Disolvente: <u>Metanol</u>	
Concentración: <u>1.0 mg/mL</u>	
Longitud de celda: <u>1 dm</u>	α : <u>+0.002</u> a 589 nm (Na)
Tiempo de Integración: <u>5 s</u>	
Observaciones: _____	Operador: <u>Dra. Adriana Romo Pérez</u>
	No. de registro: <u>STE-9249</u>
	Fecha: <u>20/06/2022</u>

Figura A46. Datos de rotación óptica del compuesto **168** en metanol.

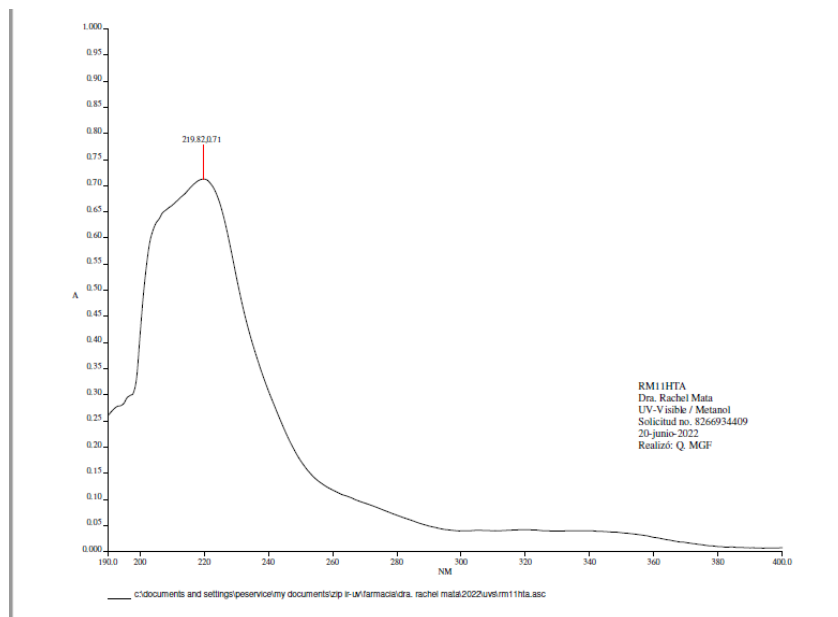


Figura A47. Espectro de UV/Visible del compuesto **168** en metanol.

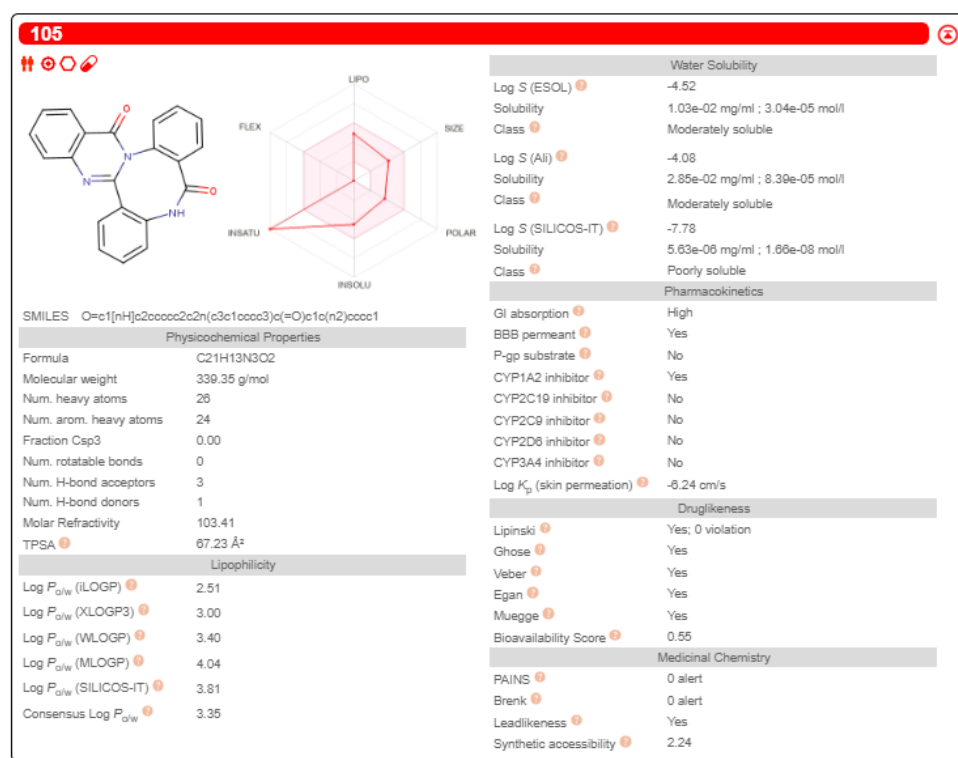


Figura A48. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **105**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.

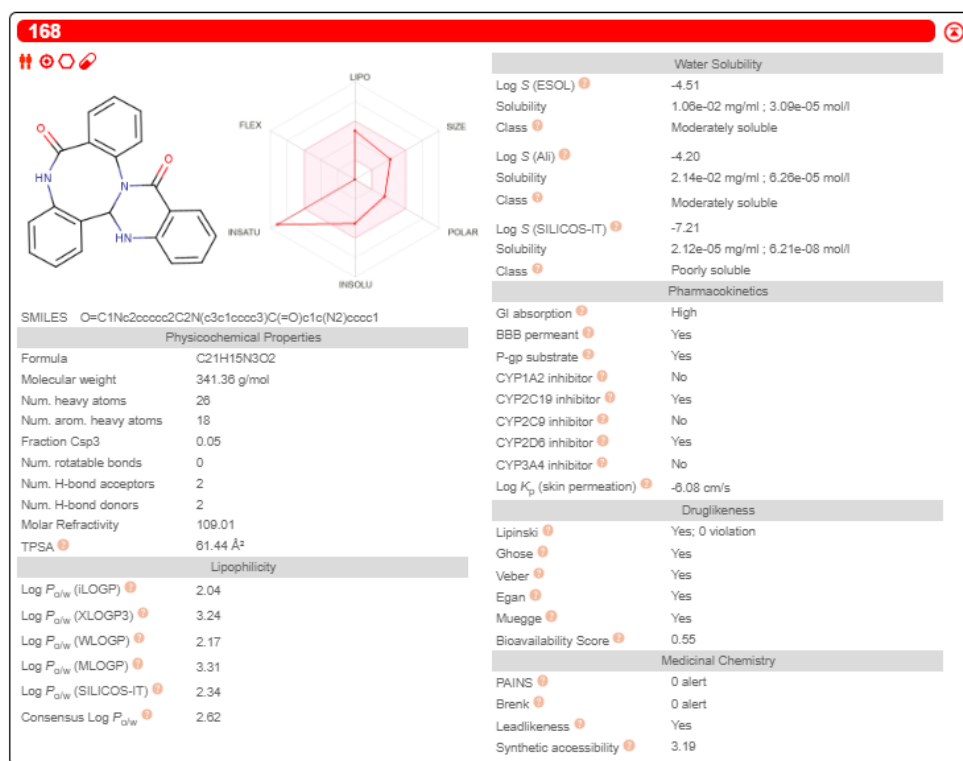


Figura A49. Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química farmacéutica del compuesto **168**, calculadas mediante la herramienta de libre acceso SwissADME.

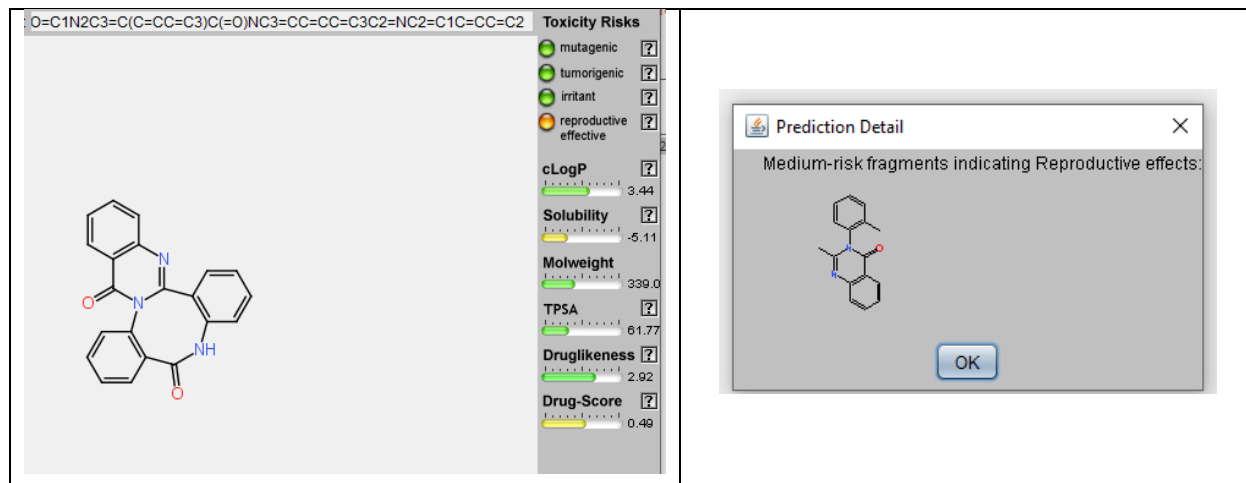


Figura A50. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto **105** obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer, también se indica el fragmento que marca alerta como posible causante de efectos reproductivos (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

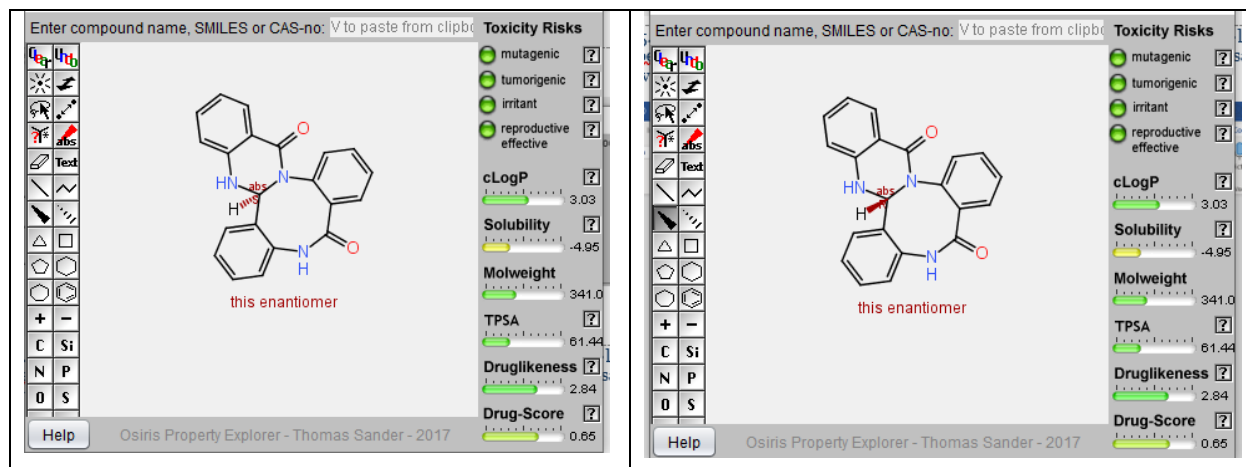


Figura A51. Resultados predictivos de toxicidad del compuesto **168** (ambos enantiómeros) obtenidos mediante la herramienta Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

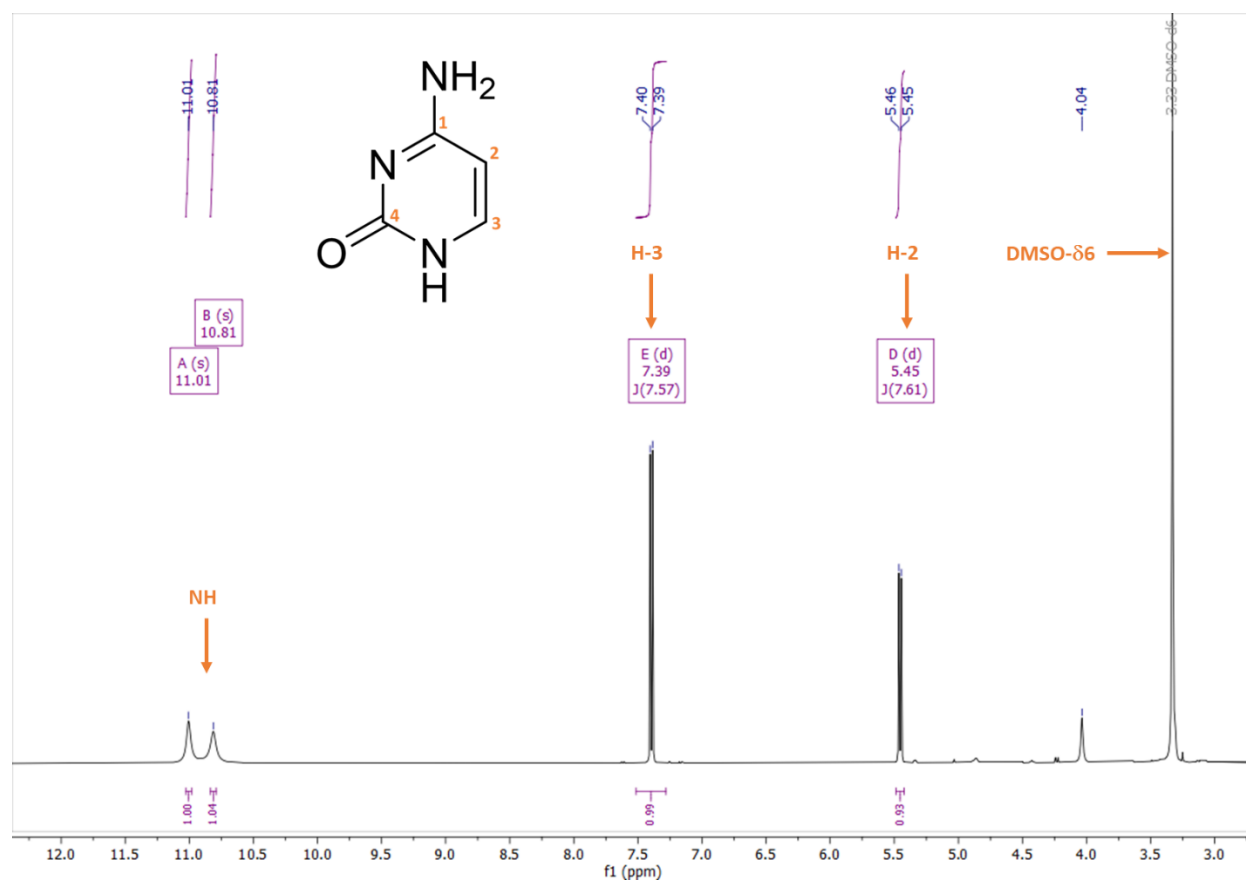


Figura A52. Espectro de ¹H-RMN de la citosina (**166**) en DMSO- δ_6 a 400 MHz.

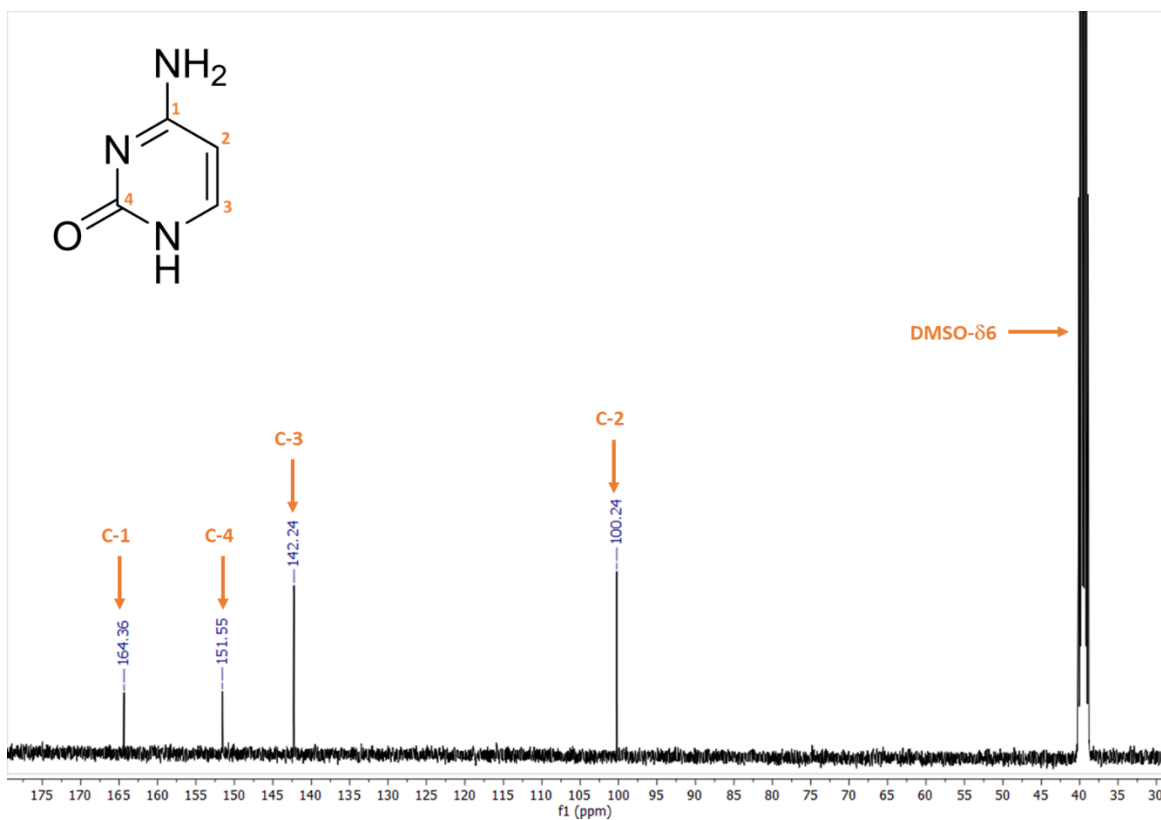


Figura A53. Espectro de ^{13}C -RMN de la citosina (**166**) en $\text{DMSO}-d_6$ a 100 MHz.

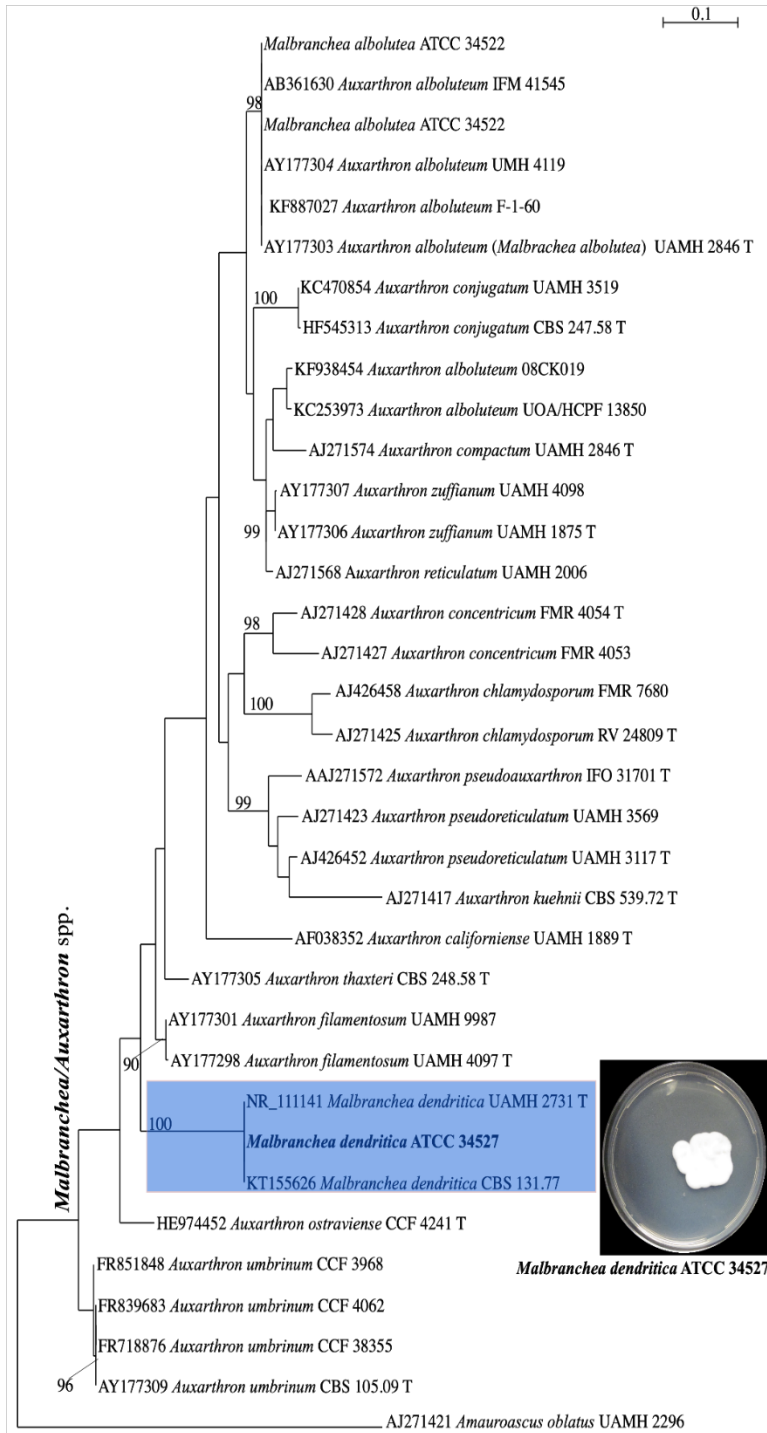


Figura A54. Árbol filogenético de *Malbranchea/Auxarthron*, donde se confirma la identidad de *Malbranchea dendritica* ATCC 34527.

Filograma del árbol más probable ($-\ln L = 3070.036$) de un análisis ML de 35 secuencias basadas en la región ITS (483 pb) usando IQ-TREE. Los números se refieren a valores de soporte de UFbootstrap ≥ 90 % basados en 5000 repeticiones. Los nodos ≥ 95 se consideran fuertemente soportados. A la derecha se muestra un cultivo de 10 días de edad en medio de agar papa dextrosa. Como grupo externo se utilizó *Amauroascus oblatum* (UAMH 2296)1. Los aislamientos de tipo Ex se designan con una barra T que indica las sustituciones de nucleótidos por sitio.

Tabla A1. Datos del cristal y refinamiento de la estructura de JBIR-99 (154).

Código de identificación	438XYZ15	
Fórmula empírica	C ₆₉ H ₅₆ N O ₂₅	
Fórmula (masa)	1299.14	
Temperatura	296(2) K	
Longitud de onda	1.54178 Å	
Sistema cristalino	Ortorrómbico	
Grupo espacial	P 21 21 21	
Dimensiones de la celda unitaria	a = 7.9424(2) Å	α = 90°.
	b = 15.0840(3) Å	β = 90°.
	c = 25.7179(6) Å	γ = 90°.
Volumen	3081.09(12) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1.400 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.910 mm ⁻¹	
F (000)	1354	
Tamaño del cristal	0.341 x 0.089 x 0.053 mm ³	
Rango Theta para colección de datos	3.397 a 68.318°.	
	-9<=h<=4, -18<=k<=18, -	
	30<=l<=30	
Rangos de índice		
Reflexiones colectadas	22861	
Reflexiones independientes	5627 [R(int) = 0.1141]	
Integridad de theta = 67.679°	99.30%	
Corrección de absorción	Analytical	
Max. y min. de transmisión	0.9617 y 0.8607	
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F ²	
Datos / restricciones / parámetros	5627 / 6 / 469	
Calidad de ajuste en F ²	1.076	
Índices R [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0516, wR2 = 0.1347	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0581, wR2 = 0.1412	
Parámetro de estructura absoluta	0.04(12)	
Dif. de pico y agujeros más grande	0.214 y -0.217 e.Å ⁻³	

Tabla A2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros equivalentes de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para JBIR-99 (154). $U(\text{eq})$ se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U^{ij} .

	x	y	z	U(eq)
O(1)	6012(3)	10176(2)	10265(1)	33(1)
O(2)	8184(5)	11672(2)	10433(1)	54(1)
O(3)	6131(5)	9566(2)	12077(1)	52(1)
O(4)	5054(5)	8412(2)	11427(1)	51(1)
O(5)	3948(5)	7290(2)	10742(1)	51(1)
O(6)	9070(4)	9745(2)	10065(1)	47(1)
O(7)	9840(5)	9643(3)	10889(1)	77(1)
O(8)	8220(4)	9735(2)	8829(1)	46(1)
O(9)	8621(3)	8573(2)	8113(1)	45(1)
O(10)	9019(4)	7170(2)	7522(1)	51(1)
O(11)	3541(4)	9111(2)	7608(1)	39(1)
O(12)	1488(5)	8478(3)	7132(1)	70(1)
C(2)	7110(5)	10228(2)	10707(1)	32(1)
C(3)	7292(6)	11227(3)	10830(2)	42(1)
C(4)	8248(7)	11360(3)	11338(2)	50(1)
C(5)	7441(6)	10886(3)	11794(2)	48(1)
C(6)	6661(5)	10014(3)	11663(1)	40(1)
C(7)	6391(5)	9735(3)	11166(1)	35(1)
C(8)	5513(5)	8927(3)	11063(1)	37(1)
C(9)	5130(5)	8723(2)	10526(1)	32(1)
C(10)	4344(5)	7914(3)	10385(2)	36(1)
C(11)	3970(5)	7748(3)	9869(1)	36(1)
C(12)	4321(5)	8372(2)	9483(1)	31(1)
C(13)	5083(4)	9181(2)	9612(1)	30(1)
C(14)	5438(4)	9351(2)	10136(1)	29(1)
C(15)	8842(5)	9833(3)	10565(2)	38(1)
C(16)	10717(6)	9419(4)	9908(2)	64(1)
C(1')	3454(5)	8372(3)	7980(1)	35(1)
C(2')	4526(5)	7640(3)	7770(1)	37(1)
C(3')	3822(7)	6940(3)	7498(2)	49(1)
C(4')	4857(8)	6328(3)	7255(2)	61(1)
C(5')	6578(7)	6417(3)	7262(2)	54(1)
C(6')	7322(6)	7121(3)	7533(2)	42(1)
C(7')	6311(5)	7726(3)	7800(1)	34(1)
C(8')	7031(5)	8439(3)	8120(1)	34(1)
C(9')	5958(4)	8932(2)	8453(1)	31(1)
C(10')	6623(5)	9518(2)	8806(1)	34(1)
C(11')	5461(5)	9908(2)	9208(1)	34(1)
C(12')	3794(5)	10173(3)	8960(1)	38(1)

C(13')	3141(5)	9603(3)	8622(1)	35(1)
C(14')	4081(5)	8756(2)	8494(1)	32(1)
C(15')	3775(5)	8090(3)	8937(1)	36(1)
C(17')	2510(5)	9064(3)	7189(2)	42(1)
C(18')	2830(6)	9808(4)	6822(2)	54(1)
C(19')	3014(8)	11029(3)	9132(2)	56(1)
O(13)	6410(30)	2284(13)	9578(8)	77(4)
C(17)	7560(50)	2610(40)	9239(14)	240(30)
N(1)	6290(50)	2580(20)	9712(12)	101(9)
C(17A)	7230(50)	2630(40)	9312(16)	290(50)
C(18A)	8530(40)	2110(30)	8757(10)	185(13)

Tabla A3. Tamaño de enlaces[Å] y ángulos [°] para JBIR-99 (154).

O(1)-C(14)	1.366(4)	C(11)-H(11)	0.9300
O(1)-C(2)	1.435(4)	C(12)-C(13)	1.402(5)
O(2)-C(3)	1.412(5)	C(12)-C(15')	1.531(5)
O(2)-H(2)	0.93(6)	C(13)-C(14)	1.399(5)
O(3)-C(6)	1.330(5)	C(13)-C(11')	1.540(5)
O(3)-H(3A)	0.855(14)	C(16)-H(16A)	0.9600
O(4)-C(8)	1.269(5)	C(16)-H(16B)	0.9600
O(5)-C(10)	1.351(5)	C(16)-H(16C)	0.9600
O(5)-H(5)	0.852(10)	C(1')-C(2')	1.495(6)
O(6)-C(15)	1.306(5)	C(1')-C(14')	1.527(5)
O(6)-C(16)	1.455(5)	C(1')-H(1')	0.9800
O(7)-C(15)	1.184(5)	C(2')-C(3')	1.385(6)
O(8)-C(10')	1.311(5)	C(2')-C(7')	1.425(6)
O(8)-H(8)	0.858(14)	C(3')-C(4')	1.385(7)
O(9)-C(8')	1.279(5)	C(3')-H(3')	0.9300
O(10)-C(6')	1.350(6)	C(4')-C(5')	1.374(8)
O(10)-H(10)	0.848(14)	C(4')-H(4')	0.9300
O(11)-C(17')	1.356(5)	C(5')-C(6')	1.400(6)
O(11)-C(1')	1.470(4)	C(5')-H(5')	0.9300
O(12)-C(17')	1.209(6)	C(6')-C(7')	1.398(6)
C(2)-C(7)	1.509(5)	C(7')-C(8')	1.468(5)
C(2)-C(15)	1.543(5)	C(8')-C(9')	1.420(5)
C(2)-C(3)	1.547(5)	C(9')-C(10')	1.372(5)
C(3)-C(4)	1.523(6)	C(9')-C(14')	1.518(5)
C(3)-H(3)	0.9800	C(10')-C(11')	1.506(5)
C(4)-C(5)	1.517(6)	C(11')-C(12')	1.523(6)
C(4)-H(4A)	0.9700	C(11')-H(11')	0.9800
C(4)-H(4B)	0.9700	C(12')-C(13')	1.327(6)
C(5)-C(6)	1.493(6)	C(12')-C(19')	1.499(6)
C(5)-H(5A)	0.9700	C(13')-C(14')	1.516(5)
C(5)-H(5B)	0.9700	C(13')-H(13')	0.9300
C(6)-C(7)	1.360(5)	C(14')-C(15')	1.538(5)
C(7)-C(8)	1.430(6)	C(15')-H(15A)	0.9700
C(8)-C(9)	1.446(5)	C(15')-H(15B)	0.9700
C(9)-C(14)	1.403(5)	C(17')-C(18')	1.488(6)
C(9)-C(10)	1.418(6)	C(18')-H(18A)	0.9600
C(10)-C(11)	1.383(5)	C(18')-H(18B)	0.9600
C(11)-C(12)	1.396(5)	C(18')-H(18C)	0.9600

C(19')-H(19A)	0.9600	O(13)-C(17)	1.36(3)
C(19')-H(19B)	0.9600	N(1)-C(17A)	1.273(14)
C(19')-H(19C)	0.9600	C(17A)-C(18A)	1.93(5)
C(14)-O(1)-C(2)	116.4(3)	C(8)-C(7)-C(2)	117.3(3)
C(3)-O(2)-H(2)	105(4)	O(4)-C(8)-C(7)	121.6(4)
C(6)-O(3)-H(3A)	103(4)	O(4)-C(8)-C(9)	120.9(4)
C(10)-O(5)-H(5)	106(4)	C(7)-C(8)-C(9)	117.5(3)
C(15)-O(6)-C(16)	115.6(4)	C(14)-C(9)-C(10)	118.3(3)
C(10')-O(8)-H(8)	107(4)	C(14)-C(9)-C(8)	120.2(3)
C(6')-O(10)-H(10)	100(4)	C(10)-C(9)-C(8)	121.3(3)
C(17')-O(11)-C(1')	116.7(3)	O(5)-C(10)-C(11)	118.4(3)
O(1)-C(2)-C(7)	111.3(3)	O(5)-C(10)-C(9)	121.9(3)
O(1)-C(2)-C(15)	109.5(3)	C(11)-C(10)-C(9)	119.8(3)
C(7)-C(2)-C(15)	109.5(3)	C(10)-C(11)-C(12)	121.2(3)
O(1)-C(2)-C(3)	105.8(3)	C(10)-C(11)-H(11)	119.4
C(7)-C(2)-C(3)	110.7(3)	C(12)-C(11)-H(11)	119.4
C(15)-C(2)-C(3)	109.9(3)	C(11)-C(12)-C(13)	120.3(3)
O(2)-C(3)-C(4)	107.8(4)	C(11)-C(12)-C(15')	114.1(3)
O(2)-C(3)-C(2)	111.1(3)	C(13)-C(12)-C(15')	125.6(3)
C(4)-C(3)-C(2)	110.6(3)	C(14)-C(13)-C(12)	118.3(3)
O(2)-C(3)-H(3)	109.1	C(14)-C(13)-C(11')	118.7(3)
C(4)-C(3)-H(3)	109.1	C(12)-C(13)-C(11')	123.0(3)
C(2)-C(3)-H(3)	109.1	O(1)-C(14)-C(13)	117.9(3)
C(5)-C(4)-C(3)	113.0(4)	O(1)-C(14)-C(9)	119.9(3)
C(5)-C(4)-H(4A)	109.0	C(13)-C(14)-C(9)	122.1(3)
C(3)-C(4)-H(4A)	109.0	O(7)-C(15)-O(6)	125.1(4)
C(5)-C(4)-H(4B)	109.0	O(7)-C(15)-C(2)	121.6(4)
C(3)-C(4)-H(4B)	109.0	O(6)-C(15)-C(2)	113.3(3)
H(4A)-C(4)-H(4B)	107.8	O(6)-C(16)-H(16A)	109.5
C(6)-C(5)-C(4)	114.5(3)	O(6)-C(16)-H(16B)	109.5
C(6)-C(5)-H(5A)	108.6	H(16A)-C(16)-H(16B)	109.5
C(4)-C(5)-H(5A)	108.6	O(6)-C(16)-H(16C)	109.5
C(6)-C(5)-H(5B)	108.6	H(16A)-C(16)-H(16C)	109.5
C(4)-C(5)-H(5B)	108.6	H(16B)-C(16)-H(16C)	109.5
H(5A)-C(5)-H(5B)	107.6	O(11)-C(1')-C(2')	107.3(3)
O(3)-C(6)-C(7)	123.0(4)	O(11)-C(1')-C(14')	105.1(3)
O(3)-C(6)-C(5)	113.5(3)	C(2')-C(1')-C(14')	114.0(3)
C(7)-C(6)-C(5)	123.4(4)	O(11)-C(1')-H(1')	110.1
C(6)-C(7)-C(8)	121.0(4)	C(2')-C(1')-H(1')	110.1
C(6)-C(7)-C(2)	121.6(4)	C(14')-C(1')-H(1')	110.1

C(3')-C(2')-C(7')	119.9(4)	C(13')-C(14')-C(1')	110.4(3)
C(3')-C(2')-C(1')	121.0(4)	C(9')-C(14')-C(1')	109.1(3)
C(7')-C(2')-C(1')	118.7(3)	C(13')-C(14')-C(15')	108.2(3)
C(4')-C(3')-C(2')	119.8(5)	C(9')-C(14')-C(15')	108.7(3)
C(4')-C(3')-H(3')	120.1	C(1')-C(14')-C(15')	109.9(3)
C(2')-C(3')-H(3')	120.1	C(12)-C(15')-C(14')	116.9(3)
C(5')-C(4')-C(3')	121.3(4)	C(12)-C(15')-H(15A)	108.1
C(5')-C(4')-H(4')	119.3	C(14')-C(15')-H(15A)	108.1
C(3')-C(4')-H(4')	119.3	C(12)-C(15')-H(15B)	108.1
C(4')-C(5')-C(6')	120.0(4)	C(14')-C(15')-H(15B)	108.1
C(4')-C(5')-H(5')	120.0	H(15A)-C(15')-H(15B)	107.3
C(6')-C(5')-H(5')	120.0	O(12)-C(17')-O(11)	122.7(4)
O(10)-C(6')-C(7')	123.2(4)	O(12)-C(17')-C(18')	126.1(4)
O(10)-C(6')-C(5')	116.9(4)	O(11)-C(17')-C(18')	111.2(4)
C(7')-C(6')-C(5')	119.8(4)	C(17')-C(18')-H(18A)	109.5
C(6')-C(7')-C(2')	119.0(4)	C(17')-C(18')-H(18B)	109.5
C(6')-C(7')-C(8')	122.0(4)	H(18A)-C(18')-H(18B)	109.5
C(2')-C(7')-C(8')	119.0(3)	C(17')-C(18')-H(18C)	109.5
O(9)-C(8')-C(9')	121.1(4)	H(18A)-C(18')-H(18C)	109.5
O(9)-C(8')-C(7')	119.6(4)	H(18B)-C(18')-H(18C)	109.5
C(9')-C(8')-C(7')	119.2(3)	C(12')-C(19')-H(19A)	109.5
C(10')-C(9')-C(8')	120.4(3)	C(12')-C(19')-H(19B)	109.5
C(10')-C(9')-C(14')	116.4(3)	H(19A)-C(19')-H(19B)	109.5
C(8')-C(9')-C(14')	122.6(3)	C(12')-C(19')-H(19C)	109.5
O(8)-C(10')-C(9')	124.3(4)	H(19A)-C(19')-H(19C)	109.5
O(8)-C(10')-C(11')	117.7(3)	H(19B)-C(19')-H(19C)	109.5
C(9')-C(10')-C(11')	118.0(3)	N(1)-C(17A)-C(18A)	152(5)
C(10')-C(11')-C(12')	110.3(3)		
C(10')-C(11')-C(13)	107.8(3)		
C(12')-C(11')-C(13)	107.5(3)		
C(10')-C(11')-H(11')	110.4		
C(12')-C(11')-H(11')	110.4		
C(13)-C(11')-H(11')	110.4		
C(13')-C(12')-C(19')	126.1(4)		
C(13')-C(12')-C(11')	116.3(3)		
C(19')-C(12')-C(11')	117.5(4)		
C(12')-C(13')-C(14')	119.7(4)		
C(12')-C(13')-H(13')	120.1		
C(14')-C(13')-H(13')	120.1		
C(13')-C(14')-C(9')	110.6(3)		

Tabla A4. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para JBIR-99 (154). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$.

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
O(1)	31(1)	32(1)	35(1)	-2(1)	-3(1)	-1(1)
O(2)	64(2)	45(2)	54(2)	2(1)	-8(2)	-17(2)
O(3)	60(2)	64(2)	31(1)	-1(1)	-2(1)	1(2)
O(4)	68(2)	52(2)	34(1)	7(1)	5(1)	-5(2)
O(5)	71(2)	44(2)	38(2)	10(1)	-1(2)	-16(2)
O(6)	34(2)	63(2)	45(2)	-4(1)	11(1)	4(1)
O(7)	48(2)	128(4)	56(2)	-17(2)	-14(2)	32(2)
O(8)	35(2)	58(2)	46(2)	-8(2)	2(1)	-17(1)
O(9)	29(1)	58(2)	47(2)	-6(1)	5(1)	-2(1)
O(10)	46(2)	55(2)	51(2)	-4(2)	4(1)	14(2)
O(11)	37(1)	47(2)	33(1)	4(1)	-7(1)	-4(1)
O(12)	53(2)	86(3)	71(2)	6(2)	-26(2)	-20(2)
C(2)	30(2)	33(2)	32(2)	-3(2)	-3(1)	4(1)
C(3)	44(2)	33(2)	49(2)	-8(2)	-3(2)	2(2)
C(4)	55(3)	44(2)	50(2)	-11(2)	-4(2)	-7(2)
C(5)	39(2)	59(3)	45(2)	-15(2)	-1(2)	0(2)
C(6)	31(2)	53(2)	37(2)	-6(2)	-1(2)	9(2)
C(7)	34(2)	39(2)	33(2)	-4(2)	1(2)	5(2)
C(8)	35(2)	41(2)	34(2)	2(2)	6(2)	7(2)
C(9)	28(2)	36(2)	31(2)	3(2)	4(1)	2(2)
C(10)	39(2)	32(2)	38(2)	6(2)	5(2)	-2(2)
C(11)	35(2)	33(2)	39(2)	4(2)	4(2)	-9(2)
C(12)	29(2)	31(2)	34(2)	0(2)	5(1)	1(2)
C(13)	26(2)	31(2)	33(2)	3(2)	2(1)	-3(1)
C(14)	21(2)	31(2)	35(2)	0(2)	2(1)	1(1)
C(15)	31(2)	40(2)	44(2)	-7(2)	0(2)	2(2)
C(16)	34(2)	86(4)	74(3)	-10(3)	19(2)	2(2)
C(1')	32(2)	38(2)	34(2)	3(2)	-3(2)	-8(2)
C(2')	41(2)	38(2)	32(2)	3(2)	0(2)	-5(2)
C(3')	53(3)	46(2)	48(2)	-5(2)	-4(2)	-12(2)
C(4')	80(4)	44(2)	59(3)	-17(2)	0(3)	-13(2)
C(5')	72(3)	44(2)	47(2)	-7(2)	5(2)	6(2)
C(6')	51(2)	39(2)	36(2)	2(2)	2(2)	3(2)
C(7')	39(2)	34(2)	31(2)	2(2)	1(2)	1(2)
C(8')	34(2)	38(2)	31(2)	4(2)	-1(1)	-1(2)

C(9')	26(2)	34(2)	32(2)	-1(1)	1(1)	-4(1)
C(10')	33(2)	37(2)	33(2)	4(2)	0(2)	-10(2)
C(11')	43(2)	28(2)	31(2)	0(2)	1(2)	-7(2)
C(12')	45(2)	34(2)	35(2)	3(2)	6(2)	1(2)
C(13')	30(2)	40(2)	36(2)	4(2)	-1(2)	5(2)
C(14')	28(2)	35(2)	31(2)	1(1)	1(1)	-4(2)
C(15')	36(2)	36(2)	36(2)	-2(2)	2(2)	-8(2)
C(17')	31(2)	59(2)	38(2)	1(2)	-2(2)	3(2)
C(18')	51(3)	68(3)	44(2)	10(2)	-4(2)	13(2)
C(19')	72(3)	39(2)	59(3)	-1(2)	2(2)	12(2)
O(13)	65(7)	102(11)	63(9)	26(8)	14(7)	32(8)
C(17)	150(30)	400(70)	170(30)	100(40)	80(30)	-60(30)
N(1)	81(12)	140(20)	83(15)	12(12)	7(11)	42(15)
C(17A)	120(30)	250(60)	490(120)	140(70)	-90(40)	80(40)
C(18A)	150(20)	270(40)	136(18)	40(20)	-13(18)	30(30)

Tabla A5. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para JBIR-99 (154).

	x	y	z	U(eq)
H(2)	7370(80)	11850(40)	10190(20)	65
H(3A)	5590(70)	9130(30)	11940(20)	62
H(5)	4230(70)	7510(40)	11035(11)	61
H(8)	8700(60)	9520(30)	8557(13)	56
H(10)	9170(70)	7660(20)	7675(19)	61
H(3)	6169	11490	10863	50
H(4A)	9391	11145	11295	59
H(4B)	8307	11989	11414	59
H(5A)	8290	10793	12060	57
H(5B)	6581	11268	11941	57
H(11)	3477	7212	9778	43
H(16A)	11566	9836	10011	97
H(16B)	10742	9346	9537	97
H(16C)	10928	8858	10072	97
H(1')	2287	8169	8017	42
H(3')	2658	6881	7479	59
H(4')	4377	5848	7084	73
H(5')	7249	6009	7088	65
H(11')	5989	10421	9376	41
H(13')	2110	9722	8466	42
H(15A)	2581	7956	8947	43
H(15B)	4359	7544	8851	43
H(18A)	2456	9644	6480	81
H(18B)	4013	9936	6813	81
H(18C)	2226	10324	6935	81
H(19A)	3584	11515	8968	85
H(19B)	3113	11083	9503	85
H(19C)	1846	11036	9036	85

Tabla A6. Enlaces de hidrógeno para JBIR-99 (154) [Å y °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(2)-H(2)...O(13)#1	0.93(6)	1.88(6)	2.77(2)	160(5)
O(3)-H(3A)...O(4)	0.855(14)	1.77(3)	2.560(5)	153(5)
O(5)-H(5)...O(4)	0.852(10)	1.82(3)	2.596(4)	151(6)
O(8)-H(8)...O(9)	0.858(14)	1.83(4)	2.561(4)	142(5)
O(10)-H(10)...O(9)	0.848(14)	1.83(3)	2.625(4)	156(6)
O(10)-H(10)...O(12)#2	0.848(14)	2.62(5)	2.956(5)	105(4)

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

Tabla A7. Datos del cristal y refinamiento de la estructura del trímero de ácido antranílico (**105**).

Código de identificación	075XYZ22	
Fórmula empírica	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₃	
Fórmula (masa)	371.38	
Temperatura	296(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 _{1/n}	
Dimensiones de la celda unitaria	a = 9.7351(2) Å b = 12.7268(3) Å c = 14.9207(4) Å	α = 90°. β = 100.6050(10)°. γ = 90°.
Volumen	1817.05(8) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.358 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.092 mm ⁻¹	
F (000)	776	
Tamaño del cristal	0.38 x 0.18 x 0.14 mm ³	
Rango Theta para colección de datos	2.119 a 27.621°.	
Rangos de índice	-12 ≤ h ≤ 12, -16 ≤ k ≤ 16, -19 ≤ l ≤ 19	
Reflexiones colectadas	30915	
Reflexiones independientes	4216 [R(int) = 0.0445]	
Integridad de theta = 25.242°	99.8%	
Corrección de absorción	Semi-empirical from equivalents	
Max. y min. de transmisión	0.7456 y 0.7011	
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F ²	
Datos / restricciones / parametros	4216 / 2 / 260	
Calidad de ajuste en F ²	1.080	
Índices R [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	R1 = 0.0438, wR2 = 0.1174	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0468, wR2 = 0.1198	
Dif. de pico y agujeros más grande	0.347 y -0.278 e.Å ⁻³	

Tabla A8. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros equivalentes de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para el trímero de ácido antranílico (**105**). U(eq) se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U^{\ddagger} .

	x	y	z	U (eq)
O(1)	6139(1)	2750(1)	2708(1)	21(1)
C(1)	11391(2)	5876(1)	4366(1)	19(1)
O(2)	10093(1)	4882(1)	2685(1)	20(1)
C(2)	11901(2)	6360(1)	5189(1)	20(1)
C(3)	10974(2)	6795(1)	5701(1)	20(1)
C(4)	9549(2)	6757(1)	5389(1)	18(1)
C(4A)	9023(2)	6297(1)	4537(1)	15(1)
N(5)	7589(1)	6345(1)	4207(1)	15(1)
C(5A)	7121(1)	5970(1)	3403(1)	14(1)
C(5B)	5619(1)	6143(1)	3008(1)	14(1)
C(6)	5155(2)	7177(1)	2844(1)	17(1)
C(7)	3746(2)	7379(1)	2525(1)	21(1)
C(8)	2801(2)	6555(1)	2373(1)	22(1)
C(9)	3255(2)	5524(1)	2526(1)	19(1)
C(9A)	4664(2)	5315(1)	2843(1)	16(1)
N(10)	5108(1)	4254(1)	3044(1)	16(1)
C(11)	5900(1)	3688(1)	2565(1)	16(1)
C(11A)	6438(1)	4253(1)	1816(1)	15(1)
C(12)	5985(2)	3896(1)	925(1)	18(1)
C(13)	6449(2)	4371(1)	201(1)	21(1)
C(14)	7349(2)	5223(1)	354(1)	21(1)
C(15)	7805(2)	5593(1)	1236(1)	18(1)
C(15A)	7357(1)	5103(1)	1959(1)	14(1)
N(16)	7939(1)	5458(1)	2873(1)	14(1)
C(17)	9400(1)	5348(1)	3156(1)	15(1)
C(17A)	9946(2)	5847(1)	4033(1)	15(1)
O(3)	5859(1)	6788(1)	5482(1)	29(1)
C(18)	5334(2)	7795(1)	5202(1)	29(1)

Tabla A9. Tamaño de enlaces[Å] y ángulos [°] para el trímero de ácido antranílico (**105**).

O(1)-C(11)	1.2269(18)	C(9)-C(9A)	1.391(2)
C(1)-C(2)	1.382(2)	C(9)-H(9)	0.9300
C(1)-C(17A)	1.404(2)	C(9A)-N(10)	1.4324(18)
C(1)-H(1)	0.9300	N(10)-C(11)	1.3524(18)
O(2)-C(17)	1.2151(17)	N(10)-H(10)	0.894(9)
C(2)-C(3)	1.399(2)	C(11)-C(11A)	1.5021(19)
C(2)-H(2)	0.9300	C(11A)-C(15A)	1.3944(19)
C(3)-C(4)	1.381(2)	C(11A)-C(12)	1.3972(19)
C(3)-H(3)	0.9300	C(12)-C(13)	1.384(2)
C(4)-C(4A)	1.4072(19)	C(12)-H(12)	0.9300
C(4)-H(4)	0.9300	C(13)-C(14)	1.387(2)
C(4A)-N(5)	1.3933(18)	C(13)-H(13)	0.9300
C(4A)-C(17A)	1.397(2)	C(14)-C(15)	1.392(2)
N(5)-C(5A)	1.2938(18)	C(14)-H(14)	0.9300
C(5A)-N(16)	1.3836(17)	C(15)-C(15A)	1.3843(19)
C(5A)-C(5B)	1.4884(19)	C(15)-H(15)	0.9300
C(5B)-C(9A)	1.398(2)	C(15A)-N(16)	1.4495(17)
C(5B)-C(6)	1.3979(19)	N(16)-C(17)	1.4140(18)
C(6)-C(7)	1.391(2)	C(17)-C(17A)	1.4631(19)
C(6)-H(6)	0.9300	O(3)-C(18)	1.415(2)
C(7)-C(8)	1.387(2)	O(3)-H(3A)	0.853(10)
C(7)-H(7)	0.9300	C(18)-H(18A)	0.9600
C(8)-C(9)	1.390(2)	C(18)-H(18B)	0.9600
C(8)-H(8)	0.9300	C(18)-H(18C)	0.9600
C(2)-C(1)-C(17A)	119.99(14)	C(3)-C(4)-H(4)	120.2
C(2)-C(1)-H(1)	120.0	C(4A)-C(4)-H(4)	120.2
C(17A)-C(1)-H(1)	120.0	N(5)-C(4A)-C(17A)	121.94(12)
C(1)-C(2)-C(3)	119.91(14)	N(5)-C(4A)-C(4)	118.41(13)
C(1)-C(2)-H(2)	120.0	C(17A)-C(4A)-C(4)	119.59(13)
C(3)-C(2)-H(2)	120.0	C(5A)-N(5)-C(4A)	118.12(12)
C(4)-C(3)-C(2)	120.74(13)	N(5)-C(5A)-N(16)	124.13(13)
C(4)-C(3)-H(3)	119.6	N(5)-C(5A)-C(5B)	117.75(12)
C(2)-C(3)-H(3)	119.6	N(16)-C(5A)-C(5B)	118.07(12)
C(3)-C(4)-C(4A)	119.69(14)	C(9A)-C(5B)-C(6)	119.73(13)
C(9A)-C(5B)-C(5A)	122.11(12)	C(12)-C(13)-C(14)	120.05(13)
C(6)-C(5B)-C(5A)	118.09(12)	C(12)-C(13)-H(13)	120.0
C(7)-C(6)-C(5B)	120.06(14)	C(14)-C(13)-H(13)	120.0

C(7)-C(6)-H(6)	120.0	C(13)-C(14)-C(15)	120.12(14)
C(5B)-C(6)-H(6)	120.0	C(13)-C(14)-H(14)	119.9
C(8)-C(7)-C(6)	119.93(14)	C(15)-C(14)-H(14)	119.9
C(8)-C(7)-H(7)	120.0	C(15A)-C(15)-C(14)	119.58(13)
C(6)-C(7)-H(7)	120.0	C(15A)-C(15)-H(15)	120.2
C(7)-C(8)-C(9)	120.38(14)	C(14)-C(15)-H(15)	120.2
C(7)-C(8)-H(8)	119.8	C(15)-C(15A) C(11A)	120.97(13)
C(9)-C(8)-H(8)	119.8	C(15)-C(15A)-N(16)	117.89(12)
C(8)-C(9)-C(9A)	120.03(14)	C(11A)-C(15A)-N(16)	121.03(12)
C(8)-C(9)-H(9)	120.0	C(5A)-N(16)-C(17)	121.98(11)
C(9A)-C(9)-H(9)	120.0	C(5A)-N(16)-C(15A)	121.15(11)
C(9)-C(9A)-C(5B)	119.87(13)	C(17)-N(16)-C(15A)	116.58(11)
C(9)-C(9A)-N(10)	119.47(13)	O(2)-C(17)-N(16)	120.73(12)
C(5B)-C(9A)-N(10)	120.57(12)	O(2)-C(17)-C(17A)	125.46(13)
C(11)-N(10)-C(9A)	124.84(12)	N(16)-C(17)-C(17A)	113.80(12)
C(11)-N(10)-H(10)	118.4(12)	C(4A)-C(17A)-C(1)	120.01(13)
C(9A)-N(10)-H(10)	116.3(12)	C(4A)-C(17A)-C(17)	119.73(13)
O(1)-C(11)-N(10)	122.28(13)	C(1)-C(17A)-C(17)	120.26(13)
O(1)-C(11)-C(11A)	121.02(13)	C(18)-O(3)-H(3A)	105.0(15)
N(10)-C(11)-C(11A)	116.66(12)	O(3)-C(18)-H(18A)	109.5
C(15A)-C(11A)-C(12)	118.69(13)	O(3)-C(18)-H(18B)	109.5
C(15A)-C(11A)-C(11)	123.96(12)	H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
C(12)-C(11A)-C(11)	117.35(12)	O(3)-C(18)-H(18C)	109.5
C(13)-C(12)-C(11A)	120.57(14)	H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
C(13)-C(12)-H(12)	119.7	H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(11A)-C(12)-H(12)	119.7		

Tabla A10. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para el trímero de ácido antranílico (**105**). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$.

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
O(1)	26(1)	13(1)	24(1)	2(1)	2(1)	1(1)
C(1)	18(1)	20(1)	18(1)	3(1)	3(1)	-2(1)
O(2)	17(1)	23(1)	20(1)	-3(1)	5(1)	2(1)
C(2)	19(1)	21(1)	19(1)	5(1)	-1(1)	-5(1)
C(3)	27(1)	15(1)	15(1)	2(1)	-2(1)	-5(1)
C(4)	24(1)	13(1)	15(1)	1(1)	2(1)	0(1)
C(4A)	19(1)	11(1)	14(1)	2(1)	1(1)	-2(1)
N(5)	18(1)	13(1)	15(1)	1(1)	3(1)	0(1)
C(5A)	16(1)	11(1)	15(1)	2(1)	4(1)	-1(1)
C(5B)	16(1)	16(1)	13(1)	0(1)	4(1)	2(1)
C(6)	20(1)	16(1)	17(1)	0(1)	5(1)	1(1)
C(7)	24(1)	19(1)	19(1)	4(1)	6(1)	7(1)
C(8)	16(1)	28(1)	20(1)	4(1)	4(1)	6(1)
C(9)	16(1)	22(1)	18(1)	1(1)	4(1)	-2(1)
C(9A)	18(1)	16(1)	14(1)	1(1)	5(1)	1(1)
N(10)	18(1)	13(1)	18(1)	3(1)	5(1)	-1(1)
C(11)	15(1)	15(1)	15(1)	-1(1)	-1(1)	-2(1)
C(11A)	16(1)	12(1)	16(1)	0(1)	3(1)	2(1)
C(12)	20(1)	14(1)	19(1)	-3(1)	1(1)	2(1)
C(13)	25(1)	21(1)	15(1)	-4(1)	1(1)	4(1)
C(14)	26(1)	23(1)	15(1)	2(1)	7(1)	2(1)
C(15)	19(1)	17(1)	19(1)	-1(1)	6(1)	-1(1)
C(15A)	14(1)	15(1)	14(1)	-2(1)	2(1)	2(1)
N(16)	15(1)	14(1)	13(1)	-1(1)	3(1)	-1(1)
C(17)	15(1)	14(1)	16(1)	1(1)	4(1)	-2(1)
C(17A)	18(1)	13(1)	14(1)	2(1)	2(1)	-2(1)
O(3)	36(1)	30(1)	28(1)	6(1)	19(1)	7(1)
C(18)	31(1)	29(1)	29(1)	-1(1)	12(1)	4(1)

Tabla A11. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para el trímero de ácido antranílico (**105**).

	x	y	z	U (eq)
H(1)	12004	5569	4034	22
H(2)	12860	6398	5402	24
H(3)	11322	7112	6258	24
H(4)	8940	7034	5740	21
H(6)	5789	7730	2948	21
H(7)	3438	8067	2414	25
H(8)	1857	6692	2167	26
H(9)	2618	4973	2417	23
H(10)	4743(18)	3928(14)	3476(10)	19
H(12)	5366	3334	817	22
H(13)	6157	4118	-388	25
H(14)	7647	5549	-134	25
H(15)	8408	6165	1340	21
H(3A)	6374(19)	6617(17)	5101(12)	35
H(18A)	5137	8175	5720	43
H(18B)	4491	7723	4757	43
H(18C)	6016	8172	4939	43

Tabla A12. Enlaces de hidrógeno para el trímero de ácido antranílico (**105**) [\AA y $^\circ$].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	\angle (DHA)
N(10)-H(10)...O(3)#1	0.894(9)	1.981(10)	2.8713(16)	173.7(17)
O(3)-H(3A)...N(5)	0.853(10)	1.970(10)	2.8206(16)	175(2)

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

XI. Publicaciones

α -Glucosidase and PTP-1B Inhibitors from *Malbranchea dendritica*

Daniela Rebollar-Ramos, Berenice Ovalle-Magallanes, Juan Francisco Palacios-Espinosa, Martha Lydia Macías-Rubalcava, Huzefa A. Raja, Martín González-Andrade, and Rachel Mata*



Cite This: *ACS Omega* 2021, 6, 22969–22981



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

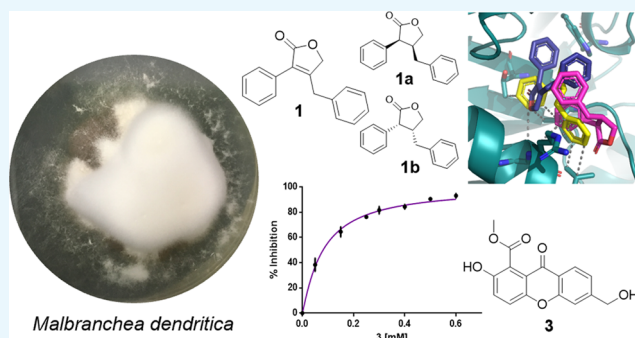


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: An extract from a PDB static culture of *Malbranchea dendritica* exhibited α -glucosidase and PTP-1B inhibitory activities. Fractionation of the active extract led to the isolation of gymnoascolide A (**1**), a γ -butenolide, and xanthenes sydowinin A (**2**), sydowinin B (**3**), and AGI-B4 (**4**), as well as orcinol (**5**). Compound **1** exhibited important inhibitory activity against yeast α -glucosidase ($IC_{50} = 0.556 \pm 0.009$ mM) in comparison to acarbose ($IC_{50} = 0.403 \pm 0.010$ mM). Kinetic analysis revealed that **1** is a mixed-type inhibitor. Furthermore, compound **1** significantly reduced the postprandial peak in mice during a sucrose tolerance test at the doses of 5.16 and 10 mg/kg. Compound **1** was reduced with Pd/C to yield a mixture of enantiomers **1a** and **1b**; the mixture showed similar activity against α -glucosidase ($IC_{50} = 0.396 \pm 0.003$ mM) and kinetic behavior as the parent compound but might possess better drug-likeness properties according to SwissADME and Osiris Property Explorer tools. Docking analysis with yeast α -glucosidase (pdb: 3A4A) and the C-terminal subunit of human maltase-glucoamylase (pdb: 3TOP) predicted that **1**, **1a**, and **1b** bind to an allosteric site of the enzymes. Compounds **1**–**5** were evaluated against PTP-1B, but only xanthone **3** moderately inhibited in a noncompetitive fashion the enzyme with an IC_{50} of 0.081 ± 0.004 mM. This result was consistent with that of docking analysis, which revealed that **3** might bind to an allosteric site of the enzyme. From the inactive barley-based semisolid culture of *M. dendritica*, the natural pigment erythroglauin (**6**) and the nucleosides deoxyadenosine (**7**), adenosine (**8**), thymidine (**9**), and uridine (**10**) were also isolated and identified.



INTRODUCTION

In 2019, the International Diabetes Federation (IDF) estimated that more than 450 million people suffered from type 2 diabetes mellitus (T2DM), causing more than 4.2 million deaths that year.¹ Thus, T2DM represents a significant global health problem with a significant negative economic impact.

The treatment of T2DM includes a healthy lifestyle and the use of various drugs and insulin.² Nevertheless, there is a need for new, more efficient therapies targeting different or known proteins involved in glucose absorption or signaling cascades implicated in this complex disease. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B), a negative modulator of insulin and leptin signaling, is a highly validated pharmacological target against insulin resistance and obesity.³ PTP-1B plays a critical role in the control of glucose and energy homeostasis. Thus, many research programs are looking for new selective inhibitors of PTP-1B. Regarding α -glucosidases (AGs), these enzymes hydrolyze larger carbohydrate molecules to glucose; their inhibition can delay the liberation of glucose from dietary carbohydrates, retarding glucose absorption and lowering the postprandial blood glucose peak. In combination with first-choice drugs, AGs reduced the incidence of cardiovascular complications.⁴

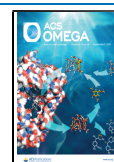
Based on the above considerations, we have established a systematic program to discover new AG and PTP-1B inhibitors from fungi of the genus *Malbranchea*. Thus, *Malbranchea flavorosea* Sigler & Carmichael yielded a few polyketides and dipeptides with AG inhibitory activity, *in vitro* and *in vivo*.^{5,6} *Malbranchea circinata* Sigler & Carmichael produced peptides, glycosylated anthraquinones, and tetralones with inhibitory properties against AG and PTP-1B; the peptide malbrancheamide was also active during an oral sucrose tolerance test (OSTT) in mice.⁷ Finally, *Malbranchea albolutea* Sigler & Carmichael biosynthesizes ardeemin derivatives with potent PTP-1B inhibitory effects.⁸

Malbranchea dendritica Sigler & Carmichael is a fungus isolated from soil worldwide.⁹ From the chemical and pharmacological point of view, this species has not been investigated. However, other *Malbranchea* species, in addition to those indicated above, biosynthesize different types of

Received: July 13, 2021

Accepted: August 12, 2021

Published: August 25, 2021



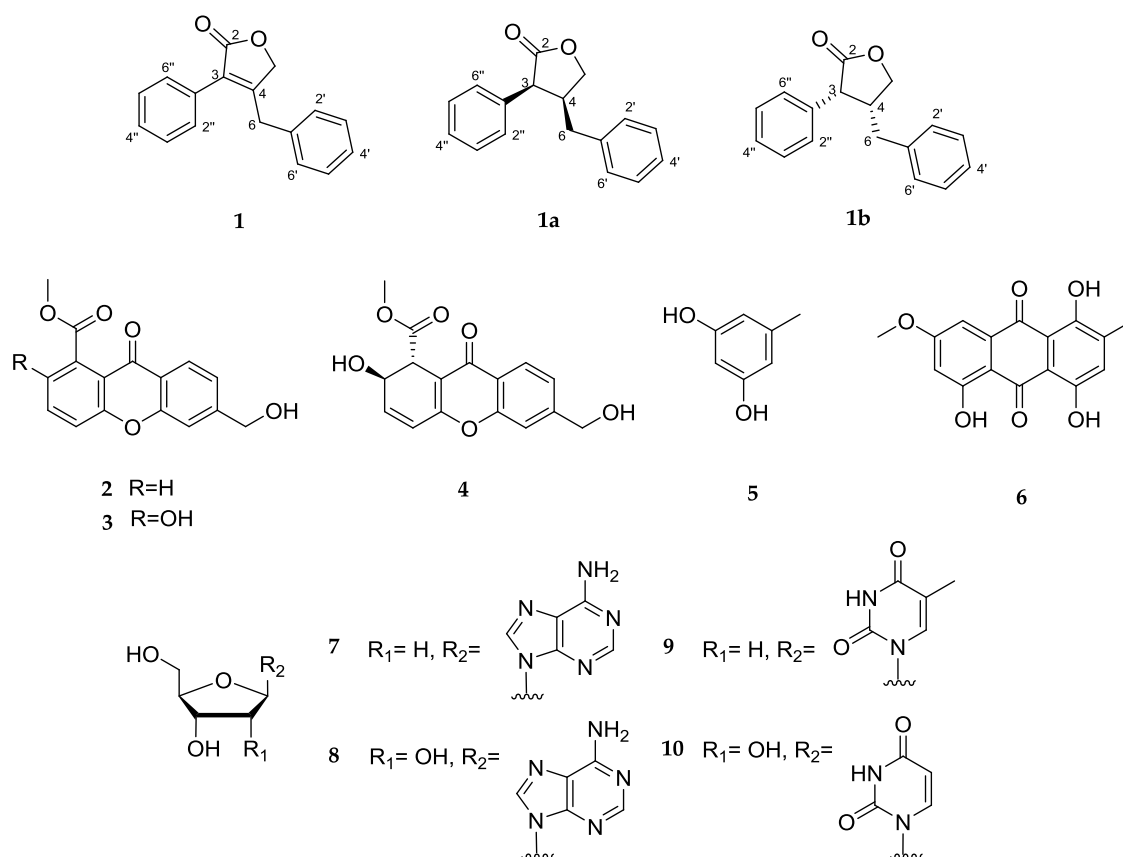


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–10 isolated from the fungus *M. dendritica* and derivatives.

bioactive compounds, including peptides,^{10–13} sesquiterpenoids,^{14,15} polyketides,^{5,6} benzoquinones and hydroquinones,^{16,17} triterpenoids,¹⁸ anthrasteroids,¹⁹ aromatic compounds,^{20,21} and pyrrole alkaloids.²²

Herein, we report a few PTP-1B and AG inhibitors from *M. dendritica* obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, strain 34527), including their activities, kinetic behavior, drug-likeness, and other *in silico* properties. The identity of the fungus was also confirmed using molecular sequencing.

RESULTS AND DISCUSSION

Fungal Strain and Identification. The identity of the type strain of *M. dendritica* ATCC 34527 (UAMH 2731, CBS2731, DPG141) was confirmed using molecular sequencing of the ITS rDNA (ITS1, 5.8S, and ITS2) using the primer combination of ITS1F and ITS4.^{23,24} Results of the BLAST search and maximum likelihood analysis with IQ-Tree (Figure S1) confirm that strain ATCC 34527 is *M. dendritica* (Onygenales; Onygenaceae; Ascomycota).

Isolation of Compounds 1–10. A CHCl₃–MeOH extract from a potato dextrose broth (PDB) static culture of *M. dendritica* showed activity against yeast AG and PTP-1B, with an inhibition of 76 and 30% at 1000 ppm, respectively. Sephadex purification of the active extract led to two major fractions (F1 and F2). F1 yielded pure compound 1, identified by nuclear magnetic resonance (NMR) and spectrometric analyses (Figures S2 and S3 and Table S1), as gymnoascolide A, a vasodilating γ -butenolide previously isolated from *Malbranchea filamentosa*^{20,21} and *Gymnoascus reessii* Baran.²⁵ The second fraction (F2) was subjected to high-performance

liquid chromatography (HPLC) analysis, which resulted in the isolation of the xanthones sydowinin A (2), sydowinin B (3),²⁶ AGI-B4 (4),²⁷ and the polyketide orcinol (5).²⁸ Compounds 2–4 have been isolated from *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom and Church,^{26,29} *Engyodontium album* (Limber) de Hoog,³⁰ *Neosartorya fischeri* (Wehmer) Malloch & Cain,³¹ and *Arthrinium* sp.,³² and compound 5 from *Trichoderma atroviride* Karsten sensu Bissett³³ and *Aspergillus sclerotiorum* G.A. Huber.³⁴ Their spectral properties agreed with those previously reported (Figures S4–S11 and Tables S2–S5).

From the inactive barley-based solid culture of *M. dendritica*, the natural pigment erythroglaucin (6)²⁰ and the nucleosides deoxyadenosine (7), adenosine (8), thymidine (9), and uridine (10) were isolated and identified by comparison of their NMR data (Figures S12–S19 and Tables S6–S9) with those in the literature;³¹ in addition, thymidine (9) was identified by X-ray diffraction analysis (Figure S20). All isolated compounds are shown in Figure 1. This type of finding is common since the variation of the culture conditions led to the production of different metabolites.

Evaluation of Compounds 1–5 against Yeast AG. Compounds 1–5 were evaluated against yeast AG using a spectrophotometric assay,^{6,7} but only 1 exhibited an important inhibitory activity (IC₅₀ = 0.556 ± 0.009 mM) comparable to that achieved by acarbose (IC₅₀ = 0.403 ± 0.010 mM). Kinetic experiments were performed to determine the type of inhibition of 1 against yeast AG. Thus, substrate saturation curves at different concentrations of 1 were performed to obtain a double reciprocal (Lineweaver–Burk) plot (Figure 2), as described in the Experimental Section. This

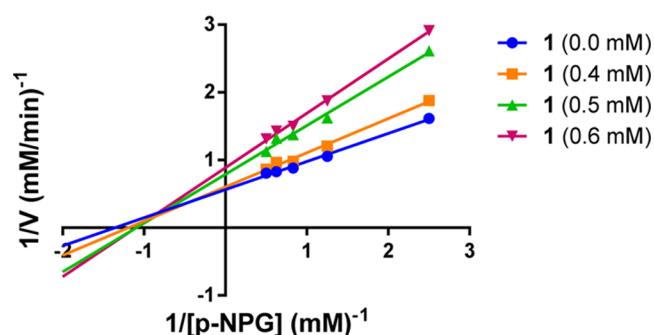


Figure 2. Lineweaver–Burk plot of yeast AG inhibition at different concentrations of gymnoascolide A (1).

plot showed a typical mixed-type inhibition, with the interception of the lines in the superior left quadrant; a difference in both the slope and y -intercept was observed, and when the inhibitor concentration increased, V_{\max} decreased and K_m increased.³⁵ Calculated parameters V_{\max} , K_m , and K_i were 1.720 mM/min, 0.6426 mM, and 0.7433 mM, respectively. The nonlinear regression ($r^2 = 0.9546$) for the Michaelis–Menten (Figure S21) reinforced the mixed type of inhibition.

In Vivo Evaluation of 1 during an Oral Sucrose Tolerance Test. Compound 1 was also evaluated during an oral sucrose tolerance test (OSTT) in CD-1 normoglycemic mice (Figure 3), since yeast AG inhibition does not always correlate well with AG mammal inhibition. The OSTT monitors a reduction in glucose absorption associated with AG inhibition by measuring blood glucose after sucrose administration with and without the inhibitor.³⁶ During this experiment, compound 1 induced an important reduction of the postprandial peak at the doses of 5.16 and 10 mg/kg, and the antihyperglycemic effect lasted during the experiment. This effect was similar to that observed for acarbose (5 mg/kg), a well-known AG inhibitor used as a positive control.

Compound 1 was further analyzed for its antidiabetic potential during an oral glucose tolerance test (OGTT)³⁷ (3.16–10 mg/kg, p.o.) in normal mice, but only at the dose of 5.62 mg/kg, the postprandial peak decreased similarly to metformin (200 mg/kg). Thus, compound 1 might also improve insulin sensitivity (Figure S22).

Drug-Likeness, Pharmacokinetics, Medicinal Chemistry Friendliness, and Toxicity of Compounds 1, 1a, and 1b. Considering the good activity shown by compound 1 in the OSTT along with its antihypertensive potential,²⁰ the drug-likeness of this lactone was analyzed using SwissADME³⁸ and Osiris Property Explorer³⁹ free software.

The physicochemical properties of 1 were predicted, and the results are summarized in Figure S23 as a bioavailability radar plot. In the radar graphic, the pink area represents the optimal range for each property of a good drug, and the red line represents the values of the six calculated properties affecting its oral bioavailability. According to the results of Figure 4, compound 1 has good properties in terms of lipophilicity, size, polarity, insolubility, and flexibility but showed a large fraction of unsaturation.

The pharmacokinetic analysis predicted that compound 1 has a high chance of passively permeating the gastrointestinal (g.i.) and the blood–brain (BBB) barriers. In addition, compound 1 was not a substrate of the permeability glycoprotein (P-gp), a multidrug resistance protein that actively ejects xenobiotics out of cells. These results were graphically represented using the BOILED-Egg model (Figure S24). The predicted results also revealed that 1 has higher opportunities to be a CYP450 inhibitor of the isoforms CYP1A2, CYP2C19, and CYP2D6 (Figure S23), which might indicate adverse drug interactions with drugs that are substrates of this isoenzymes.

On the other hand, medicinal chemistry analysis, showed that compound 1 might be a good drug candidate because the results showed no pan-assay interference structural fragments (PAINS),⁴⁰ Brenk alerts,⁴¹ or lead-likeness violations.⁴² Furthermore, its synthetic accessibility is very good. Compound 1 also showed an orally bioavailable score of 0.55 and followed five drug-likeness rules, namely, Lipinski,⁴³ Egan,⁴⁴ Veber,⁴⁵ Muegge,⁴⁶ and Ghose.⁴⁷

The toxicity risk assessment was estimated using the Osiris Property Explorer and the results anticipated no mutagenicity, tumorigenicity, or irritating or reproductive effects (Figure S25). Further, during the *in vivo* studies with compound 1, no behavioral changes or irritating effects were observed in the mice.

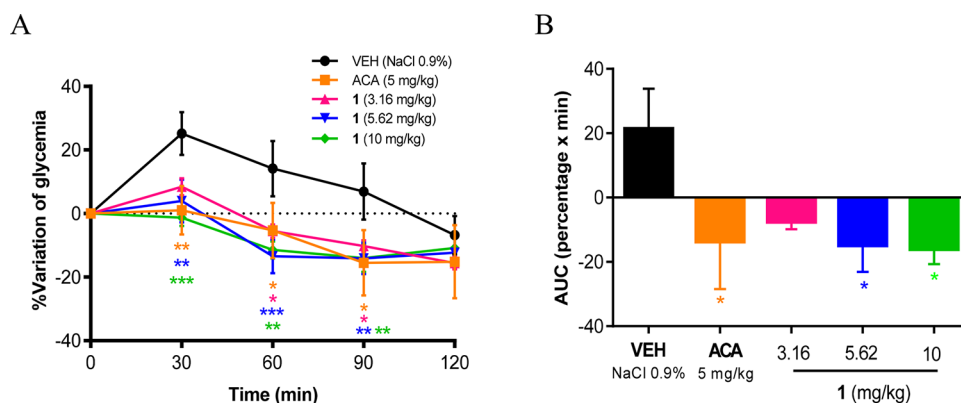


Figure 3. (A) Effect of compound 1 (3.16–10 mg/kg, p.o.) on blood glucose levels in normoglycemic mice during an OSTT. (B) Area under the curve (AUC) obtained from temporal curves. VEH: vehicle and ACA: acarbose. Each point or bar represents the mean \pm SEM for six mice in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ represent significantly different two-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparison with respect to the vehicle control at the same time (panel A) or ANOVA followed by Dunnett's test for comparison with respect to the vehicle control (panel B).

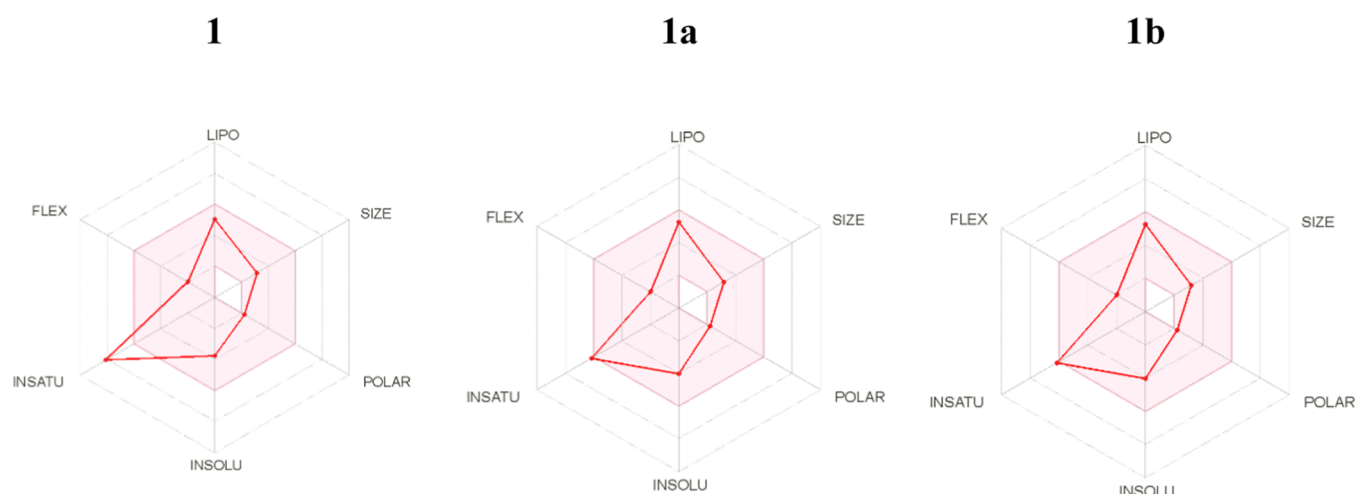


Figure 4. Bioavailability radar plot of compounds **1**, **1a**, and **1b** using the free web tool SwissADME.

To improve the medicinal chemistry properties of **1**, we decided to eliminate one unsaturation from its α,β -unsaturated lactone. Experimentally it can be achieved by catalytic hydrogenation using Pd/C. With the syn addition of hydrogen during this reaction, which takes place on the catalyst's surface, only two products, namely, **1a** and **1b**, might be obtained. Thus, **1a** and **1b** were subjected to the same theoretic analyses as **1**, and the results are summarized in the Supporting Information (Figures S26 and S27).

In general, **1a** and **1b** showed excellent pharmacokinetic and drug-likeness profiles. The bioavailability radar plots of both compounds showed no outliers (Figure 4), projecting better bioavailability than the parent compound **1**. Regarding the medicinal chemistry properties, a slight variation of XLOGP3 was foreseen, but the consensus log *P* remained less than 3.5. The Osiris Property Explorer also predicted no mutagenicity, tumorigenicity, or irritating or reproductive effects for compounds **1a** and **1b** (Figure S28).

Semisynthesis of Compounds 1a and 1b. To obtain a derivative less unsaturated, compound **1** was catalytically (Pd/C) reduced according to the procedure summarized in the Experimental Section. The reaction was monitored by GC–MS analysis (Figure S29), which revealed that the reaction yielded an enantiomeric mixture (8:2) of **1a** and **1b**, consistent with the syn addition of hydrogen to the double bond. The small value of the optical rotation $[\alpha]_D^{20} = -4$ ($c = 1$, MeOH) shows an enantiomeric excess of one of the two possible enantiomers. The enantiomeric mixture showed an exact mass of 253.12207 $[M + H]^+$ consistent with a molecular formula of $C_{17}H_{17}O_2$ and was clearly identified by NMR analysis (Table 1 and Figures S30 and S31). The main differences with the NMR of gymnoascolide A (**1**) were the absence of the signals for the double bond δ_C 159.8 (C-4) and 127.6 (C-3); instead, signals for two methines at C-3 and C-4 in δ_H/δ_C 4.06/50.3 and 3.08/34.7, respectively, were observed (Table 1), and the carbonyl carbon (δ_C 177.2) chemical shift was paramagnetically shifted due to the elimination of the double bond.

To determine which of the two enantiomers predominated in the mixture, the ECD of the 3*S*,4*S* (**1a**) and the 3*R*,4*R* (**1b**) enantiomers were calculated using a DFT B3LYP level of theory and compared with the experimental spectrum. Figure 5 depicts the comparison of three spectra; the sign and shape of the Cotton effects of the experimental spectrum is consistent

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR Data of Compound **1a/1b** in CDCl_3

position	δ_C	δ_H^a (J in Hz)
2	177.2	
3	50.3	4.06 d (8.2)
4	34.7	3.08 m
5	70.3	4.14 d (5.3, 9.3) 4.26 d (6.4, 9.3)
6	42.7	2.45 dd (4.8, 14.1) 2.20 dd (11.4, 14.1)
1'	138.6	
2', 6'	129.0	7.02 br d (7.1)
3', 5'	128.8	7.26 m
4'	126.8	7.20 m
1''	133.5	
3'', 5''	128.8	7.26 m
4''	128.0	7.34 m
2'', 6''	129.4	7.39 m

^aAssigned with HSQC. Most aromatic protons are in the range of δ_H 7.2–7.39.

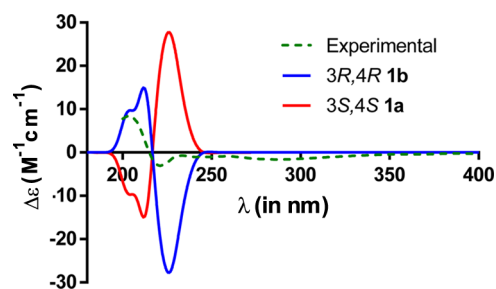


Figure 5. Comparison of the experimental ECD spectrum of the mixture **1a/1b** (green dotted line) with calculated spectra for the enantiomers 3*S*,4*S* (red) and 3*R*,4*R* (blue).

with a predominance of the 3*R*,4*R* (**1b**) enantiomer in the mixture.

Evaluation of Compound 1a/1b against the Activity of Yeast AG. The unsaturated enantiomeric mixture **1a/1b** was evaluated against yeast AG, and the IC_{50} obtained was 0.396 ± 0.003 mM. This result shows a slight improvement in bioactivity compared to the parent compound. Kinetic experiments were also performed and compound **1a/1b**

retained the mixed-type inhibition as **1** (Figure 6). Calculated parameters V_{\max} , K_m , and K_i were 1.447 mM/min, 0.5361 mM,

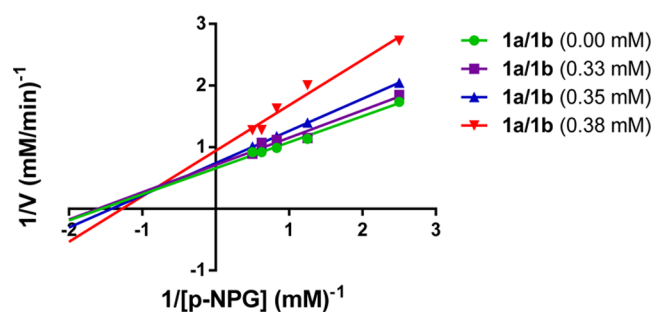


Figure 6. Lineweaver–Burk plot of yeast AG inhibition at different concentrations of compound **1a/1b**.

and 0.6984 mM, respectively. The Michaelis–Menten graph (nonlinear regression for the mixed-type inhibition $r^2 = 0.9397$) is shown in Figure S32.

Docking Studies of 1, 1a, and 1b. Docking analysis of compound **1** and its analogs **1a** and **1b** was performed using two different enzymes: yeast isomaltase (pdb: 3A4A) considering that kinetic analyses were performed with this enzyme, and the C-terminal subunit of human maltase-glucoamylase (pdb: 3TOP) bearing in mind the *in vivo* results. The results are shown in Figures 7 and 8 and Tables 2 and 3, which include the type of interactions, binding amino acids, binding energies, and calculated inhibition constants. In all cases, the compounds bind to the noncatalytic site of the enzymes.

For yeast AG, the three compounds **1**, **1a**, and **1b** bind to an allosteric site⁴⁸ with almost identical binding energies (Table 2), and this information supports the kinetics experiments carried out with this enzyme *in vitro*. In the case of the C-terminal subunit of human maltase-glucoamylase, compound **1**

attached to a different site from that of its derivatives **1a** and **1b**; in each case the binding site was different to the catalytic region, and the binding energies were slightly better than that of acarbose used as the positive control (Table 3).

The type of interactions **1**, **1a**, and **1b** displayed with all enzymes were predominantly hydrophobic. However, in the case of the maltase-glucoamylase enzyme, π stacking and salt bridge interactions were also observed (Figures 7 and 8 and Tables 2 and 3). The interactions of acarbose are shown in Figures S33 and S34.

PTP-1B Inhibitory Activity. Compounds **1–5** were evaluated against PTP-1B, but only compound **3** moderately inhibited the enzyme with an IC_{50} of 0.081 ± 0.004 mM; ursolic acid (UA) was used as the positive control ($IC_{50} = 0.006 \pm 0.0002$ mM). Kinetic analysis revealed that xanthone **3** inhibited PTP-1B in a noncompetitive fashion (the interception of the lines was observed at the x -axis); the estimated K_i was 0.02745 mM (Figure 9). Accordingly, a decrease in V_{\max} (1.308 mM/min) but no change in the K_m parameter (1.360 mM) was observed. Furthermore, the r^2 value (0.9978) estimated in the nonlinear regression analysis of the Michaelis–Menten graph (Figure S35) endorsed a non-competitive type of inhibition.

Docking and Molecular Dynamics Studies of Compound 3. Docking analysis of compound **3** was performed with a human recombinant PTP-1B (pdb: 1T49). As shown in Figure 10, **3** might bind in a well-known allosteric site^{49,50} and could display hydrophobic, H bonds and π -stacking interactions with the amino acids in the site (Table 4). The positive control, ursolic acid also binds to the allosteric site, and interactions of this compound are shown in Figure S36.

The molecular dynamics (MD) results are also summarized in Table 4 and Figure 11. The complex of compound **3**-enzyme resulted in a negative ΔG value. The calculated RMSD for the complex of **3**, UA, and PTP-1B (Figure 12) indicated that they remain stable throughout the simulation time.

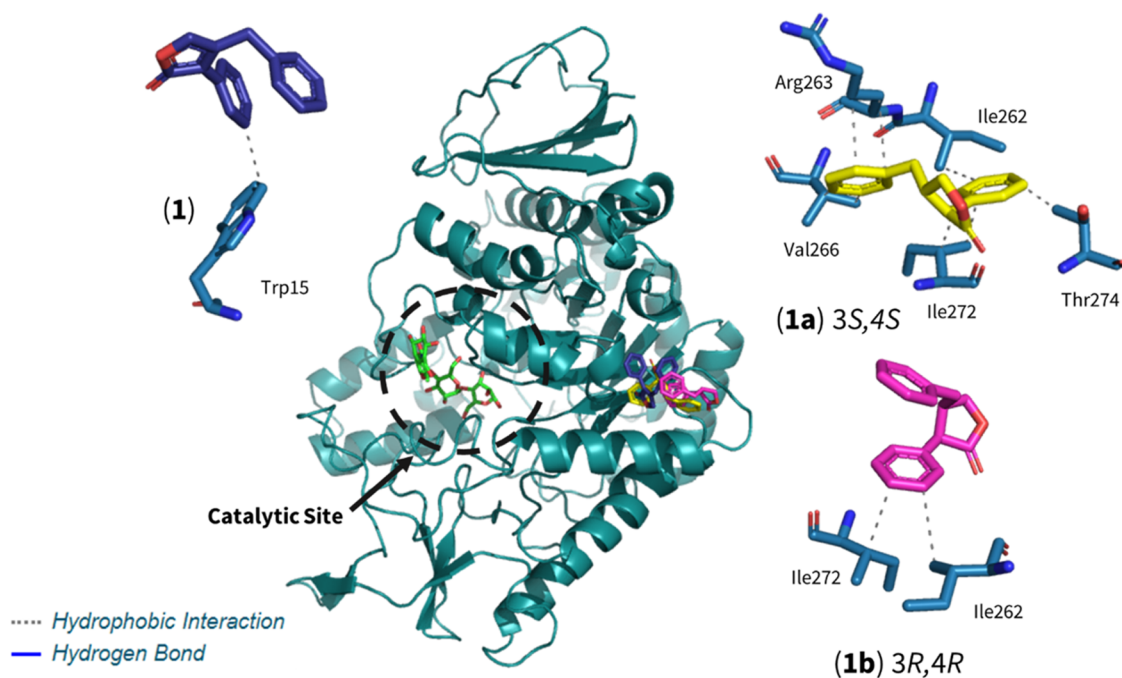


Figure 7. Structural models of the binding sites of the yeast AG-ligand complexes (pdb: 3A4A). In the center, the protein α -glucosidase is shown in light blue cartoon, and compounds are shown in blue sticks (**1**), yellow sticks (**1a**, 3S,4S), magenta sticks (**1b**, 3R,4R), and green sticks (acarbose).

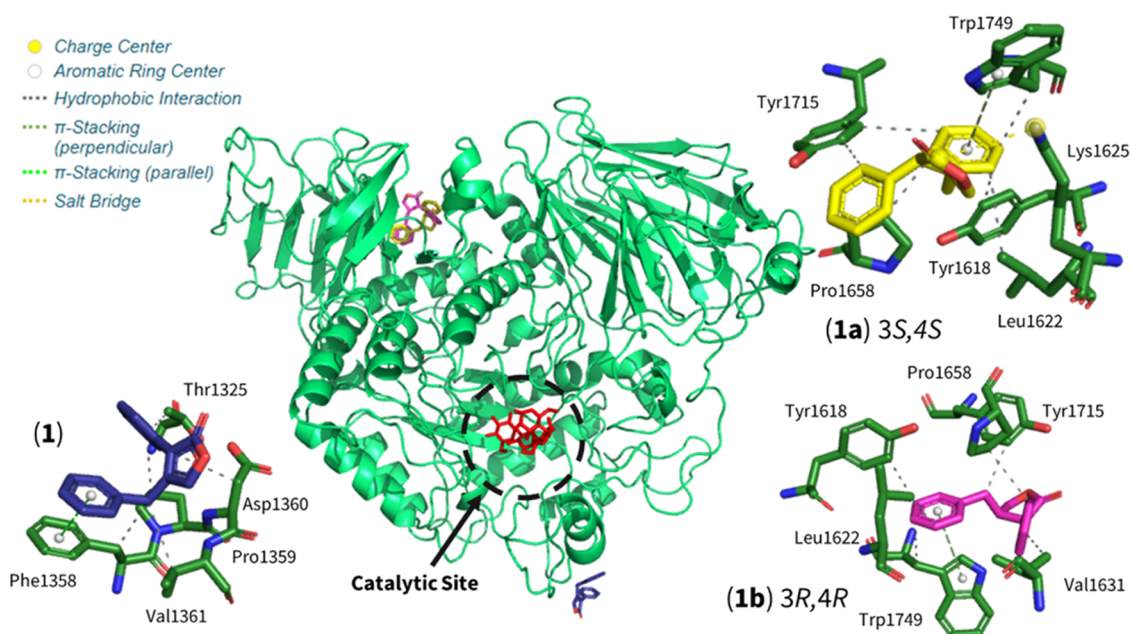


Figure 8. Structural models of the binding sites of the C-terminal subunit of human maltase-glucoamylase (pdb: 3TOP). In the center, the protein α -glucosidase is shown in green cartoon and compounds are shown in blue sticks (1), yellow sticks (1a, 3S,4S), magenta sticks (1b, 3R,4R), and red sticks (acarbose).

Table 2. Docking Analysis Results from Compounds 1, 1a, 1b, and Acarbose in Yeast AG (pdb: 3A4A)

compound	K_i (μM)	EB (kcal/mol)	interacting residues
1	32.53	-6.1	Trp15 ^a
1b (3R,4R)	38.54	-6.0	Ile262 ^a , Ile272 ^a
1a (3S,4S)	9.94	-6.8	Ile262 ^a , Arg263 ^a , Val266 ^a , Ile272 ^a , Thr274 ^a
acarbose	0.78	-8.3	Tyr155 ^c , Glu274 ^c , Gln276 ^c , His277 ^c , Asp304 ^c , Thr307 ^c , Arg312 ^c , Arg439 ^b

^aHydrophobic interaction. ^bHydrogen bond. ^cSalt bridge.

Table 3. Docking Analysis Results from Compounds 1, 1a, 1b, and Acarbose in the C-Terminal Subunit of Human Maltase-Glucoamylase (pdb: 3TOP)

compound	K_i (mM)	EB (kcal/mol)	interacting residues
1	54.08	-5.8	Thr1325 ^a , Phe1358 ^{a,b} , Pro1359 ^a , Asp1360 ^a , Val1361 ^a
1b (3R,4R)	16.52	-6.5	Tyr1618 ^a , Leu1622 ^a , Val1631 ^a , Pro1658 ^a , Tyr1715 ^a , Trp1749 ^{a,b}
1a (3S,4S)	5.98	-7.1	Tyr1618 ^a , Leu1622 ^a , Lys1625 ^c , Pro1658 ^a , Tyr1715 ^{a,b} , Trp1749 ^{a,b}
acarbose	23.18	-6.3	Trp1355 ^a , Phe1559 ^a , Asp1157 ^d , Lys1460 ^d , Arg1510 ^d , Asp1526 ^d , His1584 ^d , Thr1528 ^d

^aHydrophobic interaction. ^b π -Stacking. ^cSalt bridge. ^dHydrogen bond.

These findings are consistent with the *in vitro* assays. Thus, compound 3 binds to the allosteric site of the enzyme in a noncompetitive fashion. Therefore, the formation of the complex and the formation of the complex between 3 and PTP-1B could result in the inhibition of the enzyme.

Drug-Likeness, Pharmacokinetics, Medicinal Chemistry Friendliness, and Toxicity of Compounds 1–10.

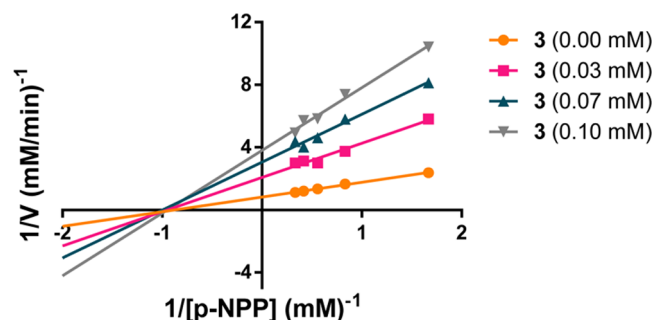


Figure 9. Lineweaver–Burk plot of PTP-1B inhibition at different concentrations of the substrate of sydowinin B (3).

Compound 3 was also subjected to bioinformatic analyses with SwissADME³⁸ and Osiris Property Explorer³⁹ free software.

The predicted physicochemical properties depicted in the bioavailability radar plot (Figure S37) showed an outlier at the unsaturation parameter. The pharmacokinetic calculations projected were favorable since 3 was not a substrate of P-gp and could not pass through the BBB but it was permeable to g.i. membranes (Figure S38). In addition, this compound would not inhibit any CYP450 isoforms. Xanthone 3 followed the five drug-likeness rules and showed no PAINS or lead-likeness violations; however, a Brenk alert was found because of its polycyclic backbone.

Finally, the Osiris Property Explorer was used to evaluate the toxicity risk for compound 3 and the results showed no mutagenicity or tumorigenicity effects, but a slight alert for irritating and reproductive effects (Figure S36) were foreseen.

CONCLUSIONS

In summary, gymnascolide A (1) demonstrated *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* α -glucosidase inhibitory activity; its reduced derivatives 1a and 1b showed comparable *in vitro* activity as AG inhibitors, and according to their predicted drug-likeness

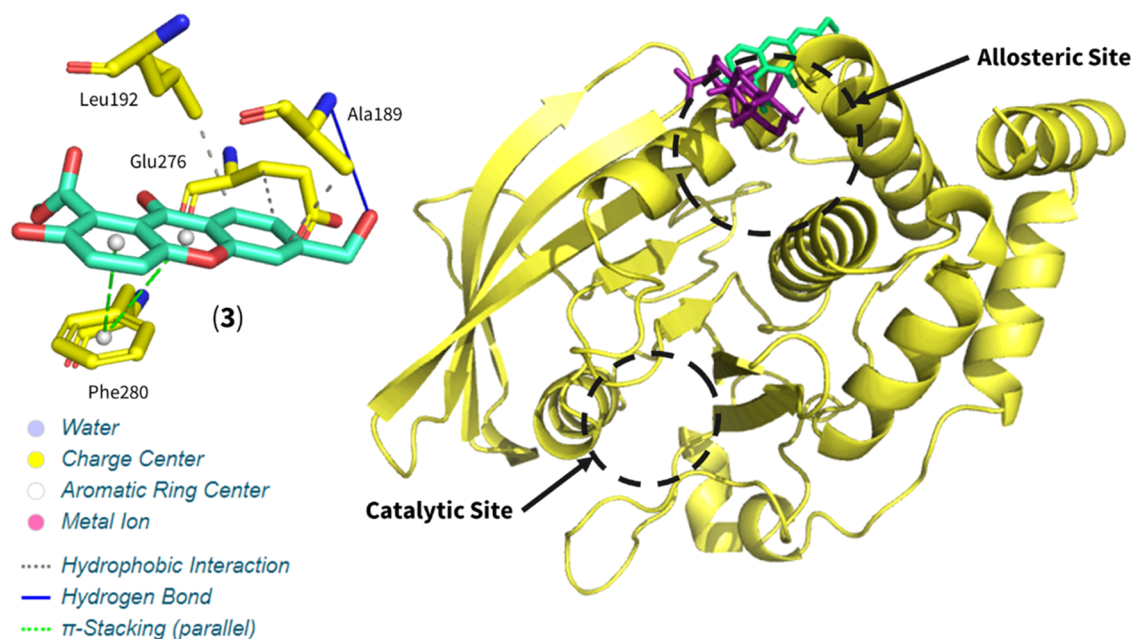


Figure 10. Structural models of the binding sites of PTP-1B-ligand complexes (pdb: 1T49). The protein is shown in yellow cartoon, compound 3 in blue sticks, and positive control (UA) in purple sticks.

Table 4. Docking and Molecular Dynamics Analysis Results from Compound 3 and UA in PTP-1B (pdb: 1T49)

compound	K_i (μM)	EB (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	interacting residues
3	4.26	-7.3	-29.58 ± 3.71	Ala189 ^{a,b} , Leu192 ^a , Phe280 ^c , Glu276 ^a
UA	27.47	-6.2	-24.99 ± 2.61	Phe196 ^a , Phe280 ^a , Ile281 ^a

^aHydrophobic interaction. ^bHydrogen bond. ^c π -Stacking.

and medicinal chemistry properties, they could be better lead compounds for the development of new drugs. Compound 1 might also favor insulin sensitivity of resistance according to an OGTT in mice. However, further investigation *in vivo* is required to demonstrate these hypotheses. Its vasodilating effect demonstrated by other authors might be useful in diabetic patients with cardiovascular complications. The xanthone sydowinin B (3) showed significant inhibitory activity against the enzyme PTP-1B; nevertheless, its predicted toxicological properties ruled out a further detailed investigation on this compound. As other *Malbranchea* species, *M.*

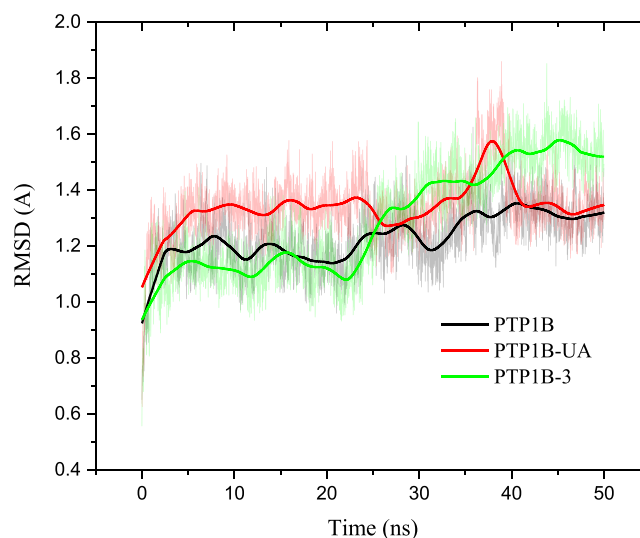


Figure 12. RMSD as a function of time of the PTP-1B-3 and PTP-1B-UA complexes.

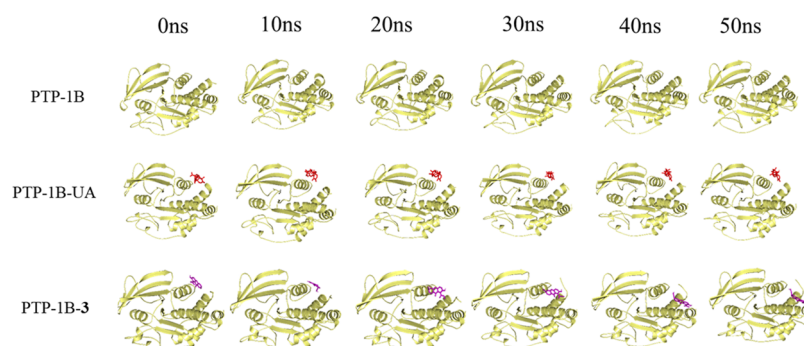


Figure 11. Structural models for molecular dynamics at the allosteric site of PTP-1B for compound 3 and UA.

dendritica demonstrated to be a good source of potential antidiabetic drugs.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. NMR spectra, including bidimensional, were recorded in CD₃OD, CDCl₃, or DMSO-*d*₆ solution on a Bruker Avance III HD or Bruker BioSpin (Billerica, MA) spectrometer at either 700 or 400 MHz (¹H) and 175 or 100 MHz (¹³C), using TMS as an internal standard. High-resolution mass spectra, HRMS (ESI-TOF⁺), were acquired with a JEOL AccuTOF JMS-T100LC (Peabody, MA) spectrometer. Optical rotation was obtained with an Anton Paar MCP 150 polarimeter. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) determinations were made using an Agilent 5975C system equipped with a 30 m DB-5MS capillary column (0.25 mm i.d.; 0.25 mm). Preparative HPLC was carried out with a Waters instrument (Milford, MA) equipped with a 2535 pump and a 2998 photodiode array detector, using an XBridge Prep Shield RP-C18 (19.0 × 250 mm², 5 mm particle size) packed column, and different gradient systems of MeCN and 0.1% aqueous formic acid, at a flow rate of 17.06 mL/min. Control of equipment, data acquisition and processing, and management of chromatographic information were performed using the Empower 3 software package. Column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) or Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.). Thin-layer chromatographic (TLC) analyses were performed on silica gel 60 F254 plates (Merck) and visualized using a Ce₂(SO₄)₃ (10%) solution in H₂SO₄.

Fungal Strain and Identification. *M. dendritica* (strain no. 34527) was obtained from ATCC (Manassas, VA). The lyophilized fungus was resuspended with sterile water and left overnight. Next, Potato Dextrose Agar (PDA) plates were inoculated with the suspended fungi and were continuously subcultured for preservation. The identity of the fungus was confirmed using molecular sequencing. Detailed methods for PCR amplification and sequencing were outlined previously.⁵¹ A BLAST search with the fungi type and reference material database in NCBI GenBank using the ITS region suggested that ATCC 34527 displayed ≥99% sequence similarity with *M. dendritica* UAMH 2731 REFSEQ₁ NR_111141 (AY177310).⁵² To place the strain ATCC 34527 in a phylogenetic framework, we downloaded all types and other sequences from various closely related *Malbranchea* and *Auxarthron* spp.^{53–55} and performed a Maximum Likelihood analysis using methods detailed recently.⁸ ModelFinder⁵⁶ predicted TIM3e+I+G4 as the best fitting substitution model according to the Akaike Information Criterion.⁵⁷ The trimmed nucleotide alignment after removing ambiguous nucleotide positions with GBlocks^{58,59} was then used to run the Maximum Likelihood analysis using IQ-Tree implemented using the program PhyloSuite with 5000 Ultrafast bootstrapping.^{60–62} Only Ultrafast bootstrap values ≥95% for the clades were considered strongly supported. The BLAST search and Maximum Likelihood analysis with IQ-Tree (Figure S1) confirm that strain ATCC 34527 is *M. dendritica*. A new sequence data information was added to NCBI GenBank for the type strain with the accession number MZ486089.

Fermentation, Extraction, and Isolation of Compounds. *M. dendritica* was cultured in two different media, potato dextrose broth (PDB) and semisolid barley medium. First, the microorganism was cultured for 2 weeks in PDA

plates; next, small cubes of solid agar were used as the seed for PDB media cultures (100 mL). These preinocula were cultured for 1 week and served as the seed for the medium-scale culture. In the first case, 6 L of PDB were inoculated and cultured in static conditions. On the other hand, the solid culture was carried out in Fernbach flasks containing barley media (100 g/200 mL of water).

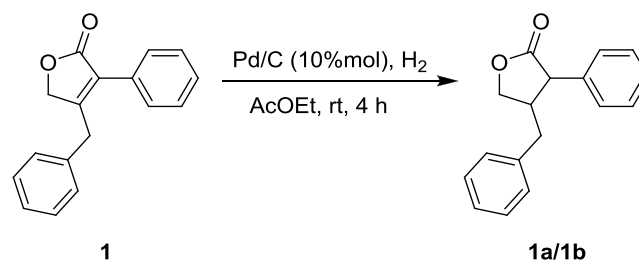
For the liquid medium, the fungus was grown for 28 days and then it was exhaustively extracted with CHCl₃–MeOH (8:2); the resulting extract was evaporated *in vacuo*. The extract was resuspended in MeOH–MeCN (1:1) and partitioned with *n*-hexane (6 × 200 mL).

Defatted liquid medium extract (200 mg) was then fractionated with Sephadex CC using a mobile phase of CH₂Cl₂–MeOH (2:8); this resulted in two major fractions, F1 which resulted in pure compound **1** (60 mg) and the rest of the fractions were gathered in F2. F2 was then fractionated with preparative RP-HPLC using a gradient of MeCN–0.1% aqueous formic acid (30:70 to 85:15 in 20 min) to yield **2** (1 mg, *t*_R 11.0 min), **3** (4 mg, *t*_R 8.5 min), **4** (2 mg, *t*_R 5.5 min), and **5** (2 mg, *t*_R 13.5 min).

The solid medium culture was grown for 28 days and then it was macerated for 12 h with EtOAc, and at the end of that time, the solvent was evaporated to give the resulting extract. The total solid medium extract was then resuspended with MeCN–MeOH (1:1) and partitioned with *n*-hexane, and at this stage, compound **6** (5 mg) precipitated spontaneously. The defatted solid medium extract (900 mg) was then fractionated in silica gel CC using a gradient of *n*-hexane–CHCl₃–acetone, to yield 11 primary fractions. Fraction 8 (30 mg) was then eluted in a preparative TLC, with a mobile phase of EtOAc–MeOH (85:15) to yield compounds **7** (2 mg), **8** (1.5 mg), **9** (3 mg), and **10** (1.5 mg).

Synthesis of Compound 1a/1b. A mixture of compound **1** (0.17 mmol) in EtOAc (1 mL) and Pd/C (10 mol %) was stirred under an atmospheric pressure of hydrogen for 20 h. The solution was then filtered and washed exhaustively with EtOAc, resulting in 34 mg of the crude reaction product.⁶³ The crude product was then purified by silica gel chromatography CH₂Cl₂–Hex (9:1), to yield 30 mg of compound **1a/1b** (82% yield) (Scheme 1).

Scheme 1. Reduction of Compound 1



Dihydrogymnoascolide A (**1a/1b**): a colorless glassy solid; [α]_D²⁰ = –4 (*c* = 1, MeOH); UV λ _{max} (log ϵ) 206.9 (4.85) nm; IR (FTIR) ν _{max}: 3356, 1766, 1450, 1170, 697 cm^{–1}; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), see Table 1. HRESIMS *m/z* 253.12207 [M + H]⁺, calcd. for C₁₇H₁₇O₂ 253.12285 Δ ppm = 3.1.

α -Glucosidase Activity Assay. The enzymatic assay was carried out using our previously reported method.^{6,7} Briefly, the fungal extract, compounds **1** and **1a/1b**, and the positive

control (acarbose) were dissolved in MeOH or phosphate buffer solution (100 mM, pH = 7.0). Aliquots of 0–10 μL of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20 μL of 1 U/mL α -glucosidase from yeast AG enzyme solution. After incubation, 10 μL of *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*-NPG 5 mM) was added and further incubated for 20 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, and at the end of this time the absorbance was measured at 415 nm. The inhibitory activity was determined as a percentage compared to the blank according to the following equation

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

where $\% \alpha$ -GHY is the percentage of inhibition, A_{415c} is the corrected absorbance of the samples under testing ($A_{415\text{end}} - A_{415\text{initial}}$), and A_{415b} is the absorbance of the blank ($A_{415\text{endblank}} - A_{415\text{initialblank}}$). All assays were performed in triplicate. The IC_{50} was calculated by regression analysis, using the following equation

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

where A_{100} is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC_{50} is the concentration required to inhibit the activity of the enzyme by 50% \pm SD, and s is the cooperative degree.⁶⁴

α -Glucosidase Kinetic Studies. Kinetic analyses were performed for compounds **1** and **1a/1b**. The assay was carried out using different concentrations of yeast AG inhibitors (0.4, 0.5, and 0.6 mM for compound **1** and 0.33, 0.35, and 0.38 mM for **1a/1b**) with different concentrations of the substrate (0.4–2 mM *p*-NPG). The results of these substrate saturation curves can be transformed into a double reciprocal (Lineweaver–Burk) plot. The equation for this plot is the following

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{\text{max}}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

The slope for this equation is K_m/V_{max} , the point at which the linear regression line intersects the y -axis is numerically equivalent to $1/V_{\text{max}}$, and the point at which it intersects the x -axis is $-1/K_m$. Thus, a Lineweaver–Burk plot provides identifiable x - and y -intercepts where the kinetic parameters V_{max} and K_m can be obtained.³⁵ The changes in slope and axis intercepts are characteristic for each type of inhibitor. Kinetic parameters (V_{max} , K_m , K_i) were obtained by the nonlinear regression fit analysis using GraphPad Prism version 6 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com).

In Vivo Oral Sucrose and Glucose Tolerance Tests.

CD-1 male mice, aged 4 weeks, were obtained from Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (approved protocol 182). Animals were kept under controlled temperature (25 $^{\circ}\text{C}$), and a 12 h light/dark cycle, and water and food pellets (Lab Diet 5001 Rodent diet) were provided ad libitum. The experimental animal protocol followed the recommendations of the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and was in conformity with the International Ethical Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. The Ethical Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological

Testing, Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/403/20), approved the protocol on February 5, 2020.

Mice were fasted 4 h before experimental handling, and they were separated into 5 groups (I–V) of 8 animals each. All groups were administered p.o.; the treatments were given as follows, group I, the vehicle solution (VEH, saline solution with 1% tween 80); group II, the positive control (acarbose, ACA, 5 mg/kg in the case of OSTT or metformin, MET, 200 mg/kg in the case of OGTT), and groups III–V, compound **1** at three different doses: 3.16, 5.62, and 10 mg/kg. Thirty minutes after the administration of the treatment, an oral sucrose (1.5 g/kg) or glucose (1 g/kg) load was given to all groups. Blood glucose levels were determined at 30, 60, 90, and 120 min after the administration of the carbohydrate. The percentage of glycemic variation (%) was determined with respect to the basal level as follows

$$\% \text{ variation of glycemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100\%$$

where G_i is the basal glycemia and G_t is the different glycemia values after treatment administration.

Statistical Analysis. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean. Statistical significance differences were ascertained by means of one or two-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparison with respect to the vehicle control. GraphPad Prism software (version 6) was used for statistical analysis.

Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP-1B) Activity Assay. A recombinant human protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) was used.⁸ The fungal extract, isolated compounds, and positive control (ursolic acid) were dissolved in DMSO or tris buffer solution (100 mM pH = 6.8). Aliquots of 0–10 μL of testing materials (triplicated) were incubated for 5 min with 20 μL of 1.56 mg/mL PTP-1B enzyme solution. After incubation, 10 μL of *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP, 3 mM) was added and further incubated for 20 min at room temperature; the absorbance was measured at 415 nm. The inhibitory activity was determined as follows

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

where $\% \text{PTP-1B}$ is the percentage of inhibition, A_{415c} is the corrected absorbance of the samples under testing ($A_{415\text{end}} - A_{415\text{initial}}$), and A_{415b} is the absorbance of the blank ($A_{415\text{endblank}} - A_{415\text{initialblank}}$). All assays were performed in triplicate. The IC_{50} was calculated by regression analysis, using the following equation

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

where A_{100} is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC_{50} is the concentration required to inhibit the enzyme activity by 50% \pm SD, and s is the cooperative degree.⁶⁴

PTP-1B Kinetic Studies. Kinetic analysis was performed for compound **3**. The assay was carried out using different concentrations of the inhibitor (0.03, 0.07, and 0.1 mM) with varying concentrations of *p*-NPP (0.6–3 mM). Kinetic parameters (V_{max} , K_m , K_i) were obtained by the nonlinear regression fit analysis using GraphPad Prism version 6 for

Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, www.graphpad.com).

ECD Calculations. Minimum energy structures from the two compounds **1a** and **1b** were built using Spartan' 08 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA). Conformational analysis was carried out with the Monte Carlo search protocol under MMFF molecular mechanics approximation. Conformers with relative energy under 5 kcal/mol were submitted to Gaussian 09 program (Gaussian Inc., Wallingford, CT) calculation for geometry optimization using the DFT B3LYP/DGTZVP level of theory and default model for MeOH as the solvent. The same DFT method in MeOH was employed for ECD calculations using the DFT-minimized conformers. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength (R) in dipole velocity (R_{vel}) and dipole length (R_{len}) forms were simulated into an ECD curve. The calculated and weighted ECD curves were all generated using SpecDis 1.71.⁶⁵

Docking Protocol. Docking analysis was done using α -glucosidase yeast AG (pdb: 3A4A), the C-terminal subunit of human maltase-glucoamylase (pdb: 3TOP), and PTP-1B from *Homo sapiens* (pdb: IT49). Structures **1**, **1a**, **1b**, and **3** were constructed and minimized using Spartan software. AutoDockTools 1.5.4 (<http://mglttools.scripps.edu/>) was used to prepare the pdb files of both enzymes and compounds. Polar hydrogen atoms and the Kollman united-atom partial charges were added to the protein structures, while Gasteiger–Marsili charges and rotatable groups were automatically assigned to the structures of the ligands. First, a blind docking was carried out with AutoDock4 version 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>), and the grid box was set at $126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA}$ in the x , y , and z dimensions with a spacing of 0.5 \AA ; default parameters for the Lamarckian genetic algorithm were also used. For the docking refinement, a smaller grid was utilized with dimensions of $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$ with a spacing of 0.375 \AA , centered at the previously identified ligands' binding site. Conformational states were evaluated with AutoDockTools using cluster analysis. The visualization of the best conformational states was achieved using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) and Protein–Ligand Interaction Profiler (PLIP) software.⁶⁶

Molecular Dynamics Simulation. All of the structural complexes were validated with the pdb4amber script previously starting the preparation to generate suitable topologies from the LEaP module of AMBER 19.^{67,68} In each case, the structure and complex were subjected to the following procedure: hydrogens and other absent atoms were added using the LEaP module with the leaprc.protein.ff19SB parameter set; K^+ counter ions were also included to neutralize the system. The complexes were solvated in an octahedral box of explicit TIP3P model water molecules localizing the box limits at 12 \AA from the protein surface. Molecular dynamics (MD) simulations were performed at 1 atm and 315 K, maintained with the Berendsen barostat and thermostat, using periodic boundary conditions and particle mesh Ewald sums (grid spacing of 1 \AA) for treating long-range electrostatic interactions with a 10 \AA cutoff for computing direct interactions. The SHAKE algorithm was used to satisfy bond constraints, allowing the employment of a 2 fs time step for the integration of Newton's equations as recommended in the Amber package.^{68,69} Amber leaprc.protein.ff19SB force field⁷⁰ parameters were used for all residues. All calculations were made using a graphic processing unit (GPU)-accelerated MD engine in AMBER (pmemd.cuda), a program package that

runs entirely on CUDA-enabled GPUs.⁷¹ The protocol consisted of performing a minimization of the initial structure, followed by 50 ps heating and pressure equilibration at 315 K and 1.0 atm pressure, respectively. Finally, the system is equilibrated with 500 ps before starting the production of MD. The production of the MD consisted of 50 ns for each complex. Frames were saved at 10 ps intervals for subsequent analysis. All analyses were done using the CPPTRAJ⁷² part of AMBER 19 utilities and OriginPro 9.1. The calculations of RMSD were made considering the C, CA, and N. The charts were built with OriginPro 2018 SR1, and the trends were adjusted with the function processing smooth (method lowest span). VMD and PyMOL were used to visualize and create the images from the MD.

Bioinformatics Studies of Bioactive Compounds Using the SwissADME Tool and Osiris Property Explorer Software. Pharmacokinetic and drug-likeness properties of the active molecules were analyzed with the SwissADME online server (<http://www.swissadme.ch/>).³⁸ Physicochemical properties of compounds were collected and represented with the bioavailability radar, where the pink area embodies the optimal range of each property as plotted: lipophilicity (LIPO): $-0.7 < \text{XLOGP3} < +5.0$; SIZE: $150 \text{ g/mol} < \text{MW} < 500 \text{ g/mol}$; POLAR (polarity): $20 \text{ \AA}^2 < \text{topological surface area (TPSA)} < 130 \text{ \AA}^2$; INSOLU (insolubility): $0 < \log S (\text{ESOL}) < 6$; INSATU (insaturation): $0.25 < \text{fraction of Csp3} < 1$; and FLEX (flexibility): $0 < \text{number of rotatable bonds} < 9$. Compounds with an optimal drug-likeness must have the red lines inside the pink area.

Passive human gastrointestinal absorption (g.i.), blood–brain barrier (BBB) permeation, susceptibility for permeability glycoprotein (P-gp) capacity, and interaction of molecules with five major isoforms of the human cytochromes P450 were predicted for bioactive compounds. Permeability information was summarized using the BOILED-Egg construction model, which was obtained via SwissADME software.

Medicinal chemistry properties such as pan-assay interference compounds (PAINS), Brenk alerts, lead likeness, and synthetic accessibility were also predicted using the software.

Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) free software was used to predict mutagenicity, tumorigenicity, and irritative and reproductive effects of the bioactive compounds. The toxicity risk alerts obtained from the software must be taken into consideration because the absence of risk alerts does not mean a completely free of any toxic effect, but a risk alert also cannot be a fully reliable toxicity prediction.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c03708>.

The phylogenetic tree for *M. dendritica*; NMR spectra of compounds **1–10** and **1a/1b**; ORTEP graph of compound **9**; Michaelis–Menten graphs for **1**, **1a/1b** and **3**; OGTT graph of compound **1**; physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological predicted properties of compounds **1**, **1a**, **1b**, and **3**; GC–MS resulting chromatogram of the product of the catalytic reduction of compound **1**; and data concerning the docking analysis of acarbose and UA (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Rachel Mata – Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; orcid.org/0000-0002-2861-2768; Email: rachel@unam.mx

Authors

Daniela Rebollar-Ramos – Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

Berenice Ovalle-Magallanes – Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

Juan Francisco Palacios-Espinosa – Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Ciudad de México 04960, Mexico

Martha Lydia Macías-Rubalcava – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; orcid.org/0000-0001-9650-0920

Huzefa A. Raja – Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, North Carolina 27412, United States; orcid.org/0000-0002-0824-9463

Martín González-Andrade – Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.1c03708>

Author Contributions

This work was taken for the Ph.D. Thesis of D.R.-R. submitted to Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320 awarded to R.M. D.R.-R. (768720) acknowledges the fellowship from CONACyT to pursue graduate studies. The authors are deeply grateful to Dr. Juventino García-Alejandro and Diego A. Roa, for providing the means to pursue the reduction of compound 1. The authors also acknowledge the support of Drs. Esperanza Carcache de Blanco and Gerardo D. Anaya-Eugenio from the College of Pharmacy, The Ohio State University, United States for their valuable support for recording the ^1H and ^{13}C NMR, and ECD spectra of compound 1a/1b, as well as its optical rotation. The authors also recognize the valuable support of I. Rivero and A. Pérez-Vásquez from Facultad de Química. The authors are grateful to Dr. Beatriz Quiroz García, Dr. Ma. del Carmen García-González, and MSc. Simón Hernández-Ortega from Instituto de Química for recording some of the NMR spectra, MS spectra, and for X-ray analysis of compound 9, respectively. The authors are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system (LANCAD-UNAM-DGTIC-313).

■ REFERENCES

- (1) International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019.
- (2) Upadhyay, J.; Polyzos, S. A.; Perakakis, N.; Thakkar, B.; Paschou, S. A.; Katsiki, N.; Underwood, P.; Park, K.-H.; Seufert, J.; Kang, E. S.; Sternthal, E.; Karagiannis, A.; Mantzoros, C. S. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update. *Metabolism* **2018**, *78*, 13–42.
- (3) Kerru, N.; Singh-Pillay, A.; Awolade, P.; Singh, P. Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *152*, 436–488.
- (4) Chan, C.-W.; Yu, C.-L.; Lin, J.-C.; Hsieh, Y.-C.; Lin, C.-C.; Hung, C.-Y.; Li, C. H.; Liao, Y.-C.; Lo, C.-P.; Huang, J.-L.; Lin, C.-H.; Wu, T.-J. Glitazones and alpha-glucosidase inhibitors as the second-line oral anti-diabetic agents added to metformin reduce cardiovascular risk in Type 2 diabetes patients: a nationwide cohort observational study. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, No. 20.
- (5) Verastegui-Omaña, B.; Rebollar-Ramos, D.; Pérez-Vásquez, A.; Martínez, A. L.; Madariaga-Mazón, A.; Flores-Bocanegra, L.; Mata, R. α -Glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea*. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 190–195.
- (6) Rebollar-Ramos, D.; Macías-Rubalcava, M. L.; Figueroa, M.; Raja, H. A.; González-Andrade, M.; Mata, R. Additional α -Glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea* (Leotiomycetes, Ascomycota). *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 862–871.
- (7) Rangel-Grimaldo, M.; Macías-Rubalcava, M. L.; González-Andrade, M.; Raja, H. A.; Figueroa, M.; Mata, R. α -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 675–683.
- (8) Díaz-Rojas, M.; Raja, H. A.; González-Andrade, M.; Rivera-Chávez, J.; Rangel-Grimaldo, M.; Rivero-Cruz, I.; Mata, R. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry* **2021**, *184*, No. 112664.
- (9) Sigler, L.; Carmichael, J. W. Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon* **1976**, *4*, 349–488.
- (10) Martínez-Luis, S.; Rodríguez, R.; Acevedo, L.; González, M. C.; Lira-Rocha, A.; Mata, R. Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1817–1822.
- (11) Figueroa, M.; González, M. C.; Mata, R. Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 709–714.
- (12) Watts, K. R.; Loveridge, S. T.; Tenney, K.; Media, J.; Valeriotte, F. A.; Crews, P. Utilizing DART mass spectrometry to pinpoint halogenated metabolites from a marine invertebrate-derived fungus. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6201–6208.
- (13) Madariaga-Mazón, A.; Hernández-Abreu, O.; Estrada-Soto, S.; Mata, R. insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67*, 551–558.
- (14) Martínez-Luis, S.; González, M. C.; Ulloa, M.; Mata, R. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1012–1016.
- (15) Wakana, D.; Hosoe, T.; Wachi, H.; Itabashi, T.; Fukushima, K.; Yaguchi, T.; Kawai, K.-I. The cytotoxic and antifungal activities of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 217–219.
- (16) Schlegel, B.; Hanel, F.; Gollmick, F. A.; Saluz, H.-P.; Gräfe, U. New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 917–922.
- (17) Schlegel, B.; Härtl, A.; Gollmick, F. A.; Gräfe, U. 7-Methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 792–794.
- (18) Wakana, D.; Hosoe, T.; Itabashi, T.; Okada, H.; Fukushima, K.; Kawai, K.-I. Structures of new triterpene glycosides, malbrancheosides A-D, from *Malbranchea filamentosa*. *Heterocycles* **2008**, *75*, 1109–1122.
- (19) Wakana, D.; Itabashi, T.; Kawai, K.-I.; Yaguchi, T.; Fukushima, K.; Goda, Y.; Hosoe, T. Cytotoxic anthrasteroid glycosides,

- malsterosides A-C, from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 585–588.
- (20) Hosoe, T.; Iizuka, T.; Komai, S.-I.; Wakana, D.; Itabashi, T.; Nozawa, K.; Fukushima, K.; Kawai, K.-I. 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2776–2779.
- (21) Wakana, D.; Hosoe, T.; Itabashi, T.; Fukushima, K.; Kawai, K.-I. 2008. Two new furanone glycosides, malfilamentosides A and B, from *Malbranchea filamentosa*. *Mycotoxins* **2008**, *58*, 1–6.
- (22) Yang, Y.-L.; Liao, W.-Y.; Liu, W.-Y.; Liaw, C.-C.; Shen, C.-N.; Huang, Z.-Y.; Wu, S.-H. Discovery of new natural products by intact-cell mass spectrometry and LC-SPE-NMR: malbranpyrroles, novel polyketides from thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea*. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 11573–11580.
- (23) White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. H.; Taylor, J. W. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*; Elsevier: San Diego, 1990; pp 315–322.
- (24) Gardes, M.; Bruns, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **1993**, *2*, 113–118.
- (25) Clark, B.; Capon, R. J.; Lacey, E.; Tennant, S.; Gill, J. H.; Bulheller, B.; Bringmann, G. Gymnoascolides A-C: aromatic butenolides from an Australian isolate of the soil ascomycete *Gymnoascus reessii*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1226–1230.
- (26) Hamasaki, T.; Sato, Y.; Hatsuda, Y. Structure of sydowinin A, sydowinin B, and sydowinol, metabolites from *Aspergillus sydowi*. *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 2341–2345.
- (27) Kim, H. S.; Park, I. Y.; Park, Y. J.; Lee, J. H.; Hong, Y. S.; Lee, J. J. A novel dihydroxanthone, AGI-B4 with inhibition of VEGF-induced endothelial cell growth. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 669–672.
- (28) Bunbamrung, N.; Intaraudom, C.; Supothina, S.; Komwijit, S.; Pittayakhajonwut, P. Antibacterial and anti-phytopathogenic substances from the insect pathogenic fungus *Gibellula* sp. BCC36964. *Phytochem. Lett.* **2015**, *12*, 142–147.
- (29) Wang, W.; Gao, M.; Luo, Z.; Liao, Y.; Zhang, B.; Ke, W.; Shao, Z.; Li, F.; Chen, J. Secondary metabolites isolated from the deep sea-derived fungus *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 3077–3082.
- (30) Yao, Q.; Wang, J.; Zhang, X.; Nong, X.; Xu, X.; Qi, S. Cytotoxic polyketides from the deep-sea-derived fungus *Engyodontium album* DFFSCS021. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, S902–S915.
- (31) Tan, Q.-W.; Ouyang, M.-A.; Shen, S.; Li, W. Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Neosartorya fischeri*. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 1402–1407.
- (32) Bao, J.; He, F.; Yu, J. H.; Zhai, H.; Cheng, Z. Q.; Jiang, C. S.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Chen, G.; Zhang, H. New chromones from a marine-derived fungus, *Arthrinium* sp., and their biological activity. *Molecules* **2018**, *23*, No. 1982.
- (33) Tang, X. X.; Liu, S. Z.; Sun, Y. Y.; He, F. M.; Xu, G. X.; Fang, M. J.; Zhen, W.; Qiu, Y. K. New cyclopentenoneacrylic acid derivatives from a marine-derived fungus *Trichoderma atroviride* H548. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *11*, 1–8.
- (34) Ma, L.-Y.; Zhang, H.-B.; Kang, H.-H.; Zhong, M.-J.; Liu, D.-S.; Ren, H.; Liu, W. Z. New butenolides and cyclopentenones from saline soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum*. *Molecules* **2019**, *24*, No. 2642.
- (35) Engelking, L. R. Chapter 6 – Enzyme Kinetics. In *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 3rd ed.; Engelking, L. R., Ed.; Academic Press: San Diego, 2015; pp 32–38.
- (36) Muller, G. Chapter K: Antidiabetic Activity. In *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, 3rd ed.; Vogel, H. G., Ed.; Springer: New York, 2008; pp 1327–1607.
- (37) Benedé-Ubieto, R.; Estévez-Vázquez, O.; Ramadori, P.; Cubero, F. J.; Nevzorova, Y. A. Guidelines and considerations for metabolic tolerance tests in mice. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2020**, *13*, 439–450.
- (38) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, No. 42717.
- (39) Sander, T. OSIRIS Property Explorer. <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> (accessed June 20, 2021).
- (40) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.
- (41) Brenk, R.; Schipani, A.; James, D.; Krasowski, A.; Gilbert, I. H.; Frearson, J.; Wyatt, P. G. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 435–444.
- (42) Teague, S. J.; Davis, A. M.; Leeson, P. D.; Oprea, T. The design of leadlike combinatorial libraries. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 3743–3748.
- (43) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 4–17.
- (44) Egan, W. J.; Merz, K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3867–3877.
- (45) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- (46) Muegge, I.; Heald, S. L.; Brittelli, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1841–1846.
- (47) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. I. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68.
- (48) Ur Rehman, N.; Halim, S. A.; Al-Azri, M.; Khan, M.; Khan, A.; Rafiq, K.; Al-Rawahi, A.; Csuk, R.; Al-Harrasi, A. Triterpenic acids as non-competitive α -glucosidase inhibitors from *Boswellia elongata* with structure-activity relationship: in vitro and in silico studies. *Biomolecules* **2020**, *10*, No. 751.
- (49) Li, S.; Zhang, J.; Lu, S.; Huang, W.; Geng, L.; Shen, Q.; Zhang, J. The mechanism of allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *PLoS One* **2014**, *9*, No. e97668.
- (50) Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randal, M.; McDowell, R. S.; Hansen, S. K. allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 730–737.
- (51) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 756–770.
- (52) Schoch, C. L.; Robbertse, B.; Robert, V.; Vu, D.; Cardinali, G.; Irinyi, L.; Meyer, W.; Nilsson, R. H.; Hughes, K.; Miller, A. N.; Kirk, P. M.; Abarenkov, K.; Aime, M. C.; Ariyawansa, H. A.; Bidartondo, M.; Boekhout, T.; Buyck, B.; Cai, Q.; Chen, J.; Crespo, A.; Crous, P. W.; Damm, U.; De Beer, Z. W.; Dentinger, B. T.; Divakar, P. K.; Duenas, M.; Feau, N.; Fliiegerova, K.; Garcia, M. A.; Ge, Z. W.; Griffith, G. W.; Groenewald, J. Z.; Groenewald, M.; Grube, M.; Gryzenhout, M.; Gueidan, C.; Guo, L.; Hambleton, S.; Hamelin, R.; Hansen, K.; Hofstetter, V.; Hong, S. B.; Houbbraken, J.; Hyde, K. D.; Inderbitzin, P.; Johnston, P. R.; Karunarathna, S. C.; Koljalg, U.; Kovacs, G. M.; Kraichak, E.; Krizsan, K.; Kurtzman, C. P.; Larsson, K. H.; Leavitt, S.; Letcher, P. M.; Liimatainen, K.; Liu, J. K.; Lodge, D. J.; Luangsa-ard, J. J.; Lumbsch, H. T.; Maharachchikumbura, S. S.; Manamgoda, D.; Martin, M. P.; Minnis, A. M.; Moncalvo, J. M.; Mule, G.; Nakasone, K. K.; Niskanen, T.; Olariaga, I.; Papp, T.; Peltovits, T.; Pino-Bodas, R.; Powell, M. J.; Raja, H. A.; Redecker, D.; Sarmiento-Ramirez, J. M.; Seifert, K. A.; Shrestha, B.; Stenroos, S.; Stielow, B.; Suh, S. O.; Tanaka, K.; Tedersoo, L.; Telleria, M. T.; Udayanga, D.; Untereiner, W. A.; Dieguez Uribeondo, J.; Subbarao, K. V.; Vagvolgyi, C.; Visagie, C.; Voigt, K.; Walker, D. M.; Weir, B. S.; Weiss, M.; Wijayawardene, N. N.; Wingfield, M. J.; Xu, J. P.; Yang, Z. L.; Zhang, N.; Zhuang, W. Y.; Federhen, S. Finding needles in

haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for fungi. *Database* **2014**, 2014, No. bau061.

(53) Sigler, L.; Hambleton, S.; Flis, A. L.; Pare, J. A. Auxarthron teleomorphs for *Malbranchea filamentosa* and *Malbranchea albolutea* and relationships within Auxarthron. *Stud. Mycol.* **2002**, *47*, 111–122.

(54) Sarrocco, S.; Diqattro, S.; Baroncelli, R.; Cimmino, A.; Evidente, A.; Vannacci, G.; Doveri, F. A polyphasic contribution to the knowledge of Auxarthron (Onygenaceae). *Mycol. Prog.* **2015**, *14*, No. 112.

(55) Hubka, V.; Dobiasova, S.; Lyskova, P.; Mallatova, N.; Chlebkova, J.; Skorepova, M.; Kubatova, A.; Dobias, R.; Chudickova, M.; Kolarik, M. *Auxarthron ostraviense* sp. nov., and *A. umbrinum* associated with non-dermatophytic onychomycosis. *Med. Mycol.* **2013**, *51*, 614–624.

(56) Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B. Q.; Wong, T. K.; von Haeseler, A.; Jermini, L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 587–589.

(57) Posada, D.; Buckley, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* **2004**, *53*, 793–808.

(58) Talavera, G.; Castresana, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* **2007**, *56*, 564–577.

(59) Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 540–552.

(60) Zhang, D.; Gao, F.; Jakovlić, I.; Zou, H.; Zhang, J.; Li, W. X.; Wang, G. T. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Mol. Ecol. Resour.* **2020**, *20*, 348–355.

(61) Minh, B. Q.; Nguyen, M. A. T.; von Haeseler, A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 1188–1195.

(62) Nguyen, L.-T.; Schmidt, H. A.; von Haeseler, A.; Minh, B. Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274.

(63) Deangelis, A.; Dmitrenko, O.; Fox, J. M. Rh-Catalyzed intermolecular reactions of cyclic α -diazocarbonyl compounds with selectivity over tertiary C-H bond migration. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11035–11043.

(64) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 2001; pp 1–397.

(65) Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Pescitelli, G. *SpecDis*, version 1.71; JIMDO: Berlin, Germany, <http://specdis-software.jimdo.com>, 2017.

(66) Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V. J.; Adasme, M. F.; Schroeder, M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W443–W447.

(67) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.

(68) Case, D. A.; Darden, T.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B. P.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Götz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Kollman, P. *Amber 12*; University of California: San Francisco, 2012.

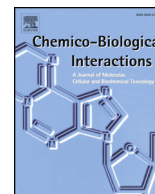
(69) Walker, R. C.; Crowley, M. F.; Case, D. A. The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in Amber. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1019–1031.

(70) Tian, C.; Kasavajhala, K.; Belfon, K. A. A.; Raguetta, L.; Huang, H.; Migués, A. N.; Bickel, J.; Wang, Y.; Pincay, J.; Wu, Q.; Simmerling, C. ff19SB: Amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 528–552.

(71) Salomon-Ferrer, R.; Götz, A. W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R. C. Routine microsecond molecular dynamics simulations

with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh ewald. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3878–3888.

(72) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095.



Apoptotic activity of xanthoquinodin JBIR-99, from *Parengyodontium album* MEXU 30054, in PC-3 human prostate cancer cells

Gerardo D. Anaya-Eugenio^{a,b}, Daniela Rebollar-Ramos^c, Maria del Carmen González^d, Huzefa Raja^e, Rachel Mata^c, Esperanza J. Carcache de Blanco^{a,b,*}

^a Division of Pharmacy Practice and Science, College of Pharmacy, The Ohio State University, Columbus, OH, 43210, United States

^b Division of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, The Ohio State University, Columbus, OH, 43210, United States

^c Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

^d Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

^e Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, NC, 27402, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Apoptosis
Fungi
Cytotoxicity
Mitochondria
NF-κB

ABSTRACT

Natural products are a valuable source of anticancer agents, with many naturally derived compounds currently used in clinical and preclinical treatments. This study aims to investigate the antiproliferative activity and potential mechanism of action of the xanthoquinodin JBIR-99, isolated from fungi *Parengyodontium album* MEXU 30,054 and identified by single-crystal X-ray crystallography. Cytotoxicity of xanthoquinodin was evaluated in a panel of human cancer cell lines and CCD-112-CoN normal colon cells, using the sulforhodamine B assay. PC-3 prostate cancer cells were used in biochemical assays including cell cycle, mitochondrial transmembrane potential (MTP), reactive oxygen species (ROS) and caspase activity. Expression levels of apoptosis-pathway-related proteins were analyzed by Western blot. The *in vivo* toxicity of xanthoquinodin was determined using a zebrafish model. Xanthoquinodin showed cytotoxicity in all cancer cell lines but demonstrated relative selective potency against PC-3 cells with an IC_{50} 1.7 μ M. In CCD-112-CoN cells, xanthoquinodin was non-cytotoxic at 100 μ M. In PC-3 cells, the compound induced loss of MTP, production of ROS, and cell cycle arrest in S phase. The expression and activity of caspase-3 was increased, which correlates with the upregulation of Cyt c, Bax, nuclear factor kappa-B (NF-κB) (p65) and IKKβ, and downregulation of poly ADP ribose polymerase (PARP-1) and Bcl-2. Lastly, xanthoquinodin did not cause any visible developmental toxicity in zebrafish at 50 μ M. These results demonstrate xanthoquinodin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells by activation of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. In addition, the non-toxic effect *in vivo* indicates that xanthoquinodin could be a useful lead in the development of a novel, anti-cancer agent that is selective for prostate cancer.

1. Introduction

Prostate cancer is the most common malignancy in men and the second leading cause of cancer-related deaths [1,2]. According to the American Cancer Society, for 2019 in the United States an estimated 174,650 new cases and 31,620 deaths are caused by prostate cancer [2]. There are more than twenty drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) for prostate cancer treatment. However, in many cases cancer becomes resistant to chemotherapy; thus, there is still a lack of effective treatment [3]. PC-3 human prostate cancer cell line is considered an androgen-independent cancer cell line. One of the most aggressive prostate adenocarcinomas are androgen-independent, making PC-3 cell line a good model for the discovery of new compounds

with potential anticancer activity for the treatment of prostate cancer [4].

Natural products are a valuable source of anticancer agents, with many naturally derived compounds currently used in clinical treatment and others under preclinical evaluation [5]. Around fifteen compounds of fungal origin have been studied in different clinical trials. Between them; plinabulin (analogue of halimide) and PX-866 (analogue of wortmannin) showed the best activity and safety profile regarding toxicity, encouraging further studies and optimization. Presently, PX-866 is under Phase II trials [6].

Despite the fact that several fungal isolates have shown anti-cancer properties, there are no current approved fungi-derived anti-cancer drugs [7]. In view of these considerations, we have investigated

* Corresponding author. College of Pharmacy, The Ohio State University, Lloyd M. Parks Hall 500 W. 12th Avenue, Columbus, OH, 43210, USA.
E-mail address: carcache-de-blan.1@osu.edu (E.J. Carcache de Blanco).

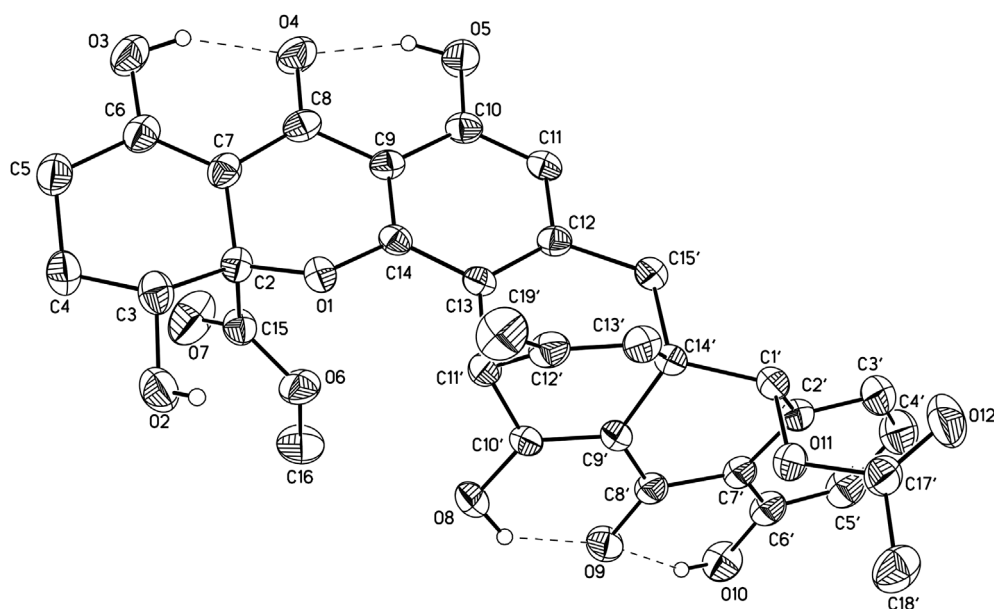


Fig. 1. ORTEP representation of the X-ray crystal structure of xanthoquinodin JBIR-99.

Parengyodontium album, formerly *Engyodontium album* [8], a fungus found in different kinds of habitats, including marine sediments [9–11]. *P. album* biosynthesizes cytotoxic chromones [11], benzoate and phenyl acetate derivatives [9], as well as anthraquinone-xanthone polyketides including compound JBIR-99 with previously shown antimicrobial properties and cytotoxic effects against cervical carcinoma (HeLa) and malignant pleural mesothelioma (ACC-MESO-1) cell lines [12,13].

Herein, the antiproliferative activity of the xanthoquinodin JBIR-99 from *P. album* MEXU 30,054, isolated from a sandy soil sample collected in Acapulco, Mexico, was demonstrated. The effect was analyzed in a panel of human cancer cell lines, with relative selectivity in PC-3 prostate cells. Furthermore, in this preliminary study we report that the antiproliferative mechanism of action of compound xanthoquinodin is caused by the activation of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Staurosporine, cycloheximide, daunomycin, paclitaxel, sulforhodamine B, propidium iodide (PI), 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), NaHCO₃, all organic solvents used (analytical grade) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Rocaglamide was purchased from Enzo Life Sciences Inc. (Farmingdale, New York, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute's medium (RPMI-1640), Eagle's Minimum Essential medium (EMEM), essential amino acids solution, sodium pyruvate and antibiotic-antimycotic were purchased from Gibco (Rockville, MD, USA). Tumor necrosis factor- α (TNF α), SuperSignal™ west Femto kit and Bradford protein assay kit were obtained from Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA). The mitochondrial transmembrane potential (MTP) assay kit, containing JC-1, was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA). SDS-PAGE Bis-Tris gel, SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Standard Ladder and RNase were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). PhosphoSafe™ extraction reagent was obtained from Novagen (Madison, WI, USA). Caspase-Glo 3/7® kit was purchased from Promega corporation (Madison, WI, USA). The rabbit (*anti*-NF- κ Bp50, *anti*-NF- κ Bp65, *anti*-IKK α , *anti*-IKK β , *anti*-caspase-3, *anti*-caspase-7, *anti*-Bax, *anti*-cytochrome c, and *anti*- β -actin) and mouse (*anti*-Bcl-2, and *anti*- β -actin) polyclonal or monoclonal primary antibodies were

purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). Anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

2.2. Fungal strain collection and identification

The MEXU 30054 strain *Parengyodontium album* was isolated from a sandy soil sample collected from the Pacific Ocean Coast at N16°50'42" and W99°54'26" in the intertidal zone of a beach located in Tlacopanocha, Acapulco, Mexico. The strain was deposited at the fungal collection of Herbario Nacional de México, Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico City). The fungal strain was identified on the basis of morphological characteristics and Maximum Likelihood analysis of the internal transcribed spacers (ITS) region. For the identification of strain used in this study, the ITS region was sequenced. Amplicons and sequences for the ITS1–5.8S–ITS2 region were generated using primers ITS5 and ITS4. Sanger sequencing and phylogenetic analysis were the methods used for DNA extraction and PCR, and they were detailed previously [14–17].

2.3. Extraction and isolation of compound xanthoquinodin JBIR-99

Parengyodontium album MEXU 30054 was cultured on potato dextrose agar (PDA) plates. Agar plugs were inoculated in potato dextrose broth (PDB) and were cultured for 7 days at room temperature under agitation conditions. Next, the broths were transferred to solid media containing 100 g of rice and 200 mL of water (4 × 100 g). After 30 days of fungal growth, the culture was exhaustively extracted with CHCl₃–MeOH (8:2) and concentrated *in vacuo*. The organic extract (800 mg) was suspended in MeCN–MeOH (1:1), then partitioned with *n*-hexane (3 × 50 mL). From the defatted fraction spontaneously crystallized compound xanthoquinodin, which upon recrystallization with CH₂Cl₂–MeOH–MeCN (1:1:1) yielded 190 mg of pure xanthoquinodin JBIR-99. Single crystal X-ray (Fig. 1) analysis allowed to establish unequivocally the structure of xanthoquinodin, including the absolute configuration at the stereogenic centers [12,13]. The ORTEP representation is depicted in Fig. 1. Crystallographic data of xanthoquinodin have been deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) with the accession number CCDC 1910121. These data are available, free of charge, from the CCDC via <http://www.ccdc.cam>.

ac.uk/data_request/cif (Tables S1–S6). A yellow crystal having approximate dimensions of $0.341 \times 0.089 \times 0.053 \text{ mm}^3$ was mounted on a glass fiber. The measurements were made on a Bruker D8 Venture diffractometer spectrometer with Cu K α radiation ($\lambda = 1.54,178 \text{ \AA}$) at 296 K. The structure was solved by the SHELXS-2013 method and refined using full-matrix least-squares on F^2 . Crystal data for xanthoquinodin JBIR-99: $\text{C}_{66}\text{H}_{56}\text{NO}_{24}$, MW 1299.14, orthorhombic, space group $P2_12_12_1$ with unit cell parameters $a = 7.9424 (2) \text{ \AA}$, $b = 15.0840 (3) \text{ \AA}$, $c = 25.7179 (6) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $Z = 2$, $T = 296 (2) \text{ K}$, volume $3081.09 (12) \text{ \AA}^3$, $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.910 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 1354$, density (calcd) 1.400 Mg/m^3 . Intensity data were collected in the range of $3.397\text{--}68.318^\circ$ using a ω scan; 22,861 reflections collected, 5627 independent reflections [$R(\text{int}) = 0.1141$] were considered, observed, and used in the calculations. The final R_1 indices were 0.0516 [$I > 2\sigma(I)$]. The final wR_2 values were 0.1347 [$I > 2\sigma(I)$], with a data-restraints-parameters ratio of 5627/6/469. The final R_1 values were 0.0581 (all data). The final wR_2 values were 0.1412 (all data). The absolute structure parameter was 0.04 [13]. Spectroscopic data are consistent with those previously reported and are included in appendix A, supplementary data.

2.4. Sample preparation

Xanthoquinodin compound and controls paclitaxel, rocaglamide, ellipticine and staurosporine were dissolved in 100% DMSO with a final stock solution concentration of 10 or 4 mg/mL, then the stocks were stored at -20°C until use. After several dilutions, the final concentration of DMSO was 0.2% for cell-based assays, 0.03% for Western blot and zebrafish assays. In the case of xanthoquinodin, the concentrations were 0.05, 0.2, 0.5, 2, 5, 20 and 50 μM . These concentrations were selected based on the IC_{50} value of xanthoquinodin in PC-3 cells.

2.5. Cell culture

HT-29 (colon), MDA-MB-231 (breast), MCF-7 (breast), PC3 (prostate), DU-145 (prostate), HeLa (cervical) cancer cells, and CCD-112CoN normal colon cells were obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA. Cells were either cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute's medium (RPMI-1640), or Eagle's Minimum Essential medium (EMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 10% antibiotic-antimycotic. Sodium pyruvate, essential amino acids solution, and sodium bicarbonate were added to EMEM. Cells were grown as a monolayer in T75 tissue culture flasks and kept at 37°C with 5% of CO_2 .

2.6. Cytotoxicity assays

The antiproliferative activity of xanthoquinodin JBIR-99 was evaluated in normal and cancerous human cell lines using a sulforhodamine B (SRB) assay [18]. The principle of the assay is based on SRB staining as a result of SRB complexing with amino acid residues from the protein content of adherent or suspension cells. Cells were seeded in a 96-well plate (5×10^4 cells/well) then cells were allowed to attach overnight to be treated with the compound at various concentrations (3×10^{-4} –30 μM). Each cell suspension was incubated at 37°C in 5% CO_2 for 72 h. Then, cells were fixed with 100 μL of 20% trichloroacetic acid, washed with tap water, and dried at room temperature. Cells were stained with SRB (0.4%), and unbound dye removed with 1% acetic acid. After drying, bound dye was solubilized with Tris-base (10 mM) and absorbance was read at 515 nm using a FLUOstar Optima plate reader (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA). Paclitaxel or ellipticine were used as positive controls. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated by non-linear regression analysis using TableCurve 2Dv4 (System Software Inc., San Jose, CA, USA).

2.7. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was carried out as previously reported [19]. Briefly, PC-3 cells were seeded on 6-cm plates and treated with compound xanthoquinodin (0.5–50 μM) or paclitaxel (0.01 μM) for 24 h. Cells were then washed with PBS and treated with trypsin, harvested, centrifuged, and re-suspended in cold water. Cells were fixed using ethanol (70%), washed, and re-suspended in PBS. RNase (20 $\mu\text{g/mL}$) was then added prior to incubation for 1 h at 37°C . Cells were stained with propidium iodide (PI, 1.0 $\mu\text{g/mL}$) and protected from light until analysis using a BD FACS Calibur cytometer at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 617 nm. The cellular DNA profile was analyzed using the software WinMDI version 2.8 (BD, USA).

2.8. Reactive oxygen species (ROS) assay

This assay was performed in accordance with a previously reported procedure [20]. Prostate PC-3 cancer cells were seeded in a 96-well black plate and treated for 5 h with either xanthoquinodin (0.5–50 μM), vitamin C (0.5–50 μM), daunomycin (4 μM), or negative control (0.2% DMSO, final concentration). After incubation at 37°C , 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA, 10 μM) was administered to detect intracellular ROS. Fluorescence was recorded using a Fluostar Optima fluorescence plate reader, with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 530 nm. All treatments were performed in triplicate and data are representative of two independent experiments.

2.9. Mitochondrial transmembrane potential (MTP) assay

Cancer cells were used to determine the effect of xanthoquinodin on MTP following a previously published protocol [20]. Briefly, cells were seeded in black, 96-well plates. After incubation at 37°C in 5% CO_2 , cells were treated for 5 h with either xanthoquinodin (0.05–50 μM), staurosporine (8 μM), or negative control (0.2% DMSO, final concentration). Then, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1 staining solution) was added, and incubation was conducted 25 min under the same conditions as described above. Finally, 100 μL of PBS buffer was added, and fluorescence analysis was carried out using a FLUOstar Optima plate reader. In healthy cells, JC-1 forms aggregates that fluoresce intensely. These aggregates were detected at an excitation and emission wavelength of 535 nm and 595 nm, respectively. In unhealthy (apoptotic) cells, JC-1 exists as monomers that are detectable at an excitation and emission wavelength of 485 nm and 535 nm, respectively.

2.10. Western blot analysis

PC-3 cells in DMEM medium were treated with xanthoquinodin at varying concentrations (0.05–50 μM) for 15 h. Rocaglamide (3 μM) and DMSO (0.03%, final concentration) were used as controls. Then, cells were lysed using PhosphoSafe™ extraction reagent and the protein concentration was determined using the BCA method. For each lysed sample, 20 μg were separated in Nu-PAGE 10% SDS-PAGE Bis-Tris gel by electrophoresis using SDS-PAGE. Proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) and blocked with 3% bovine serum albumin (BSA). The membranes were incubated with the corresponding primary antibodies overnight and with secondary antibodies for 1 h. Proteins were detected using chemiluminescent substrate Supersignal Femto kit and band densities were analyzed using ImageJ 1.52a [21].

2.11. Caspase-3/-7 activity

Caspase-3 and -7 activities were measured in PC-3 (1×10^4 cells/well) prostate cancer cells using a Caspase-Glo 3/7® kit. After 15 h of treatment in a white 96-well plate with either xanthoquinodin

(0.2–20 μM), paclitaxel (0.01 μM), or DMSO/water. Caspase-Glo 3/7[®] reagent was added to cells, and then were incubated for 2 h [22]. Luminescence was measured using a FLUOstar Optima plate reader.

2.12. Zebrafish toxicity

Zebrafish (*Danio rerio*) were provided by the Department of Neuroscience at The Ohio State University. Experiments were completed under an approved animal protocol (Ohio State University IACUC protocol number 2004A00000006, entitled “Vertebrate Model for Natural Product Drug Discovery”; PI: Esperanza J. Carcache de Blanco). Briefly, fish embryos were housed in an automated fish housing system at 28 °C with a 14 h/10 h light/dark cycle. Embryos at 24 h post fertilization (hpf) were treated with either xanthoquinodin (50 μM), cycloheximide (50 μM), or vehicle (0.03% DMSO) for 24 h [23]. Zebrafish were then observed under an Axiovert 40 CFL Zeiss microscope (magnifier Zeiss CP-Achromat 5x/0.12), and pictures were taken using a ProgRes C10 plus camera.

2.13. Statistical analysis

Experimental results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM), and all measurements and analyses were carried out in triplicate of two or three independent experiments. TableCurve 2D 4v (System Software Inc., San Jose, CA, USA) was used for statistical evaluations to obtain IC₅₀ values. The statistical significance differences were ascertained by either ANOVA and post-hoc Dunnett's test, or an unpaired Student's T-test using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, California, USA). A value of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ indicated significant differences between groups against to the controls.

3. Results

3.1. Cytotoxic activity of xanthoquinodin JBIR-99 in cancer and normal cells

In an ongoing effort to identify bioactive secondary metabolites from fungal sources, the antiproliferative effects of xanthoquinodin

JBIR-99 (Figs. 1 and 2A) isolated from *Parengyodontium album* were evaluated against colon (HT-29), cervical (HeLa), prostate (PC-3 and DU-145) and breast (MCF-7 and MDA-MB-231) cancer cell lines using the SRB assay. The results showed that xanthoquinodin displayed cytotoxic effects in a concentration-dependent manner with the following IC₅₀ values: 10.5, 15.5, 1.7, 12.6, 11.3 and 6.8 μM , respectively. However, xanthoquinodin proved non-cytotoxic at 100 μM in normal human colon cells (CCD-112-CoN) (Table 1). These results indicate that after 72 h of treatment, xanthoquinodin has potent relative selective cytotoxic activity against PC-3 prostate cancer cells (Fig. 2B). As seen in Fig. 2C, xanthoquinodin decreased the number and proliferation of the cells. Thus, these results suggest the hypothesis that xanthoquinodin could induce apoptotic cell death in PC-3 cancer cells.

3.2. Xanthoquinodin JBIR-99 induces cell cycle arrest in PC-3 prostate cells

To explore whether xanthoquinodin regulates cell cycle distribution, PC-3 cells were treated for 24 h with either xanthoquinodin (0.5–50 μM), paclitaxel (0.01 μM), or negative control. DNA distribution in treated cells was analyzed by fluorescence-activated cell flow cytometry. In untreated cells, the distribution percent of cells in sub-G₁, G₁, S, and G₂ was 3.7 \pm 0.3, 43 \pm 2.1, 15.8 \pm 2.1 and 37.3 \pm 0.03, respectively. The distribution percent for PC-3 cells treated with xanthoquinodin at 50 μM was 2.9 \pm 0.9, 42.9 \pm 0.4, 36.1 \pm 3.2 and 17.9 \pm 2.8, respectively. In case of paclitaxel (0.01 μM) used as positive control, the distribution was 10.5 \pm 0.8, 20.5 \pm 3.1, 11 \pm 5.3 and 57.8 \pm 9.3, respectively. These results demonstrate that xanthoquinodin induced a significant cell cycle arrest in S-phase ($p < 0.01$) and a subsequent decrease in G₂-phase distribution ($p < 0.05$) compared to the control (Fig. 3).

3.3. Xanthoquinodin JBIR-99 induces loss of MTP in PC-3 prostate cells

The mitochondrial integrity was evaluated using the mitochondrial trans-membrane potential (MTP) assay during initiation of apoptosis. The fluorescent (JC-1) dye was administered to PC-3 cells treated with xanthoquinodin to determine the loss of MTP. The fluorescent intensity ratio of J-aggregates to monomers in control cells was considered as 100% mitochondrial integrity. Fig. 4 shows that xanthoquinodin

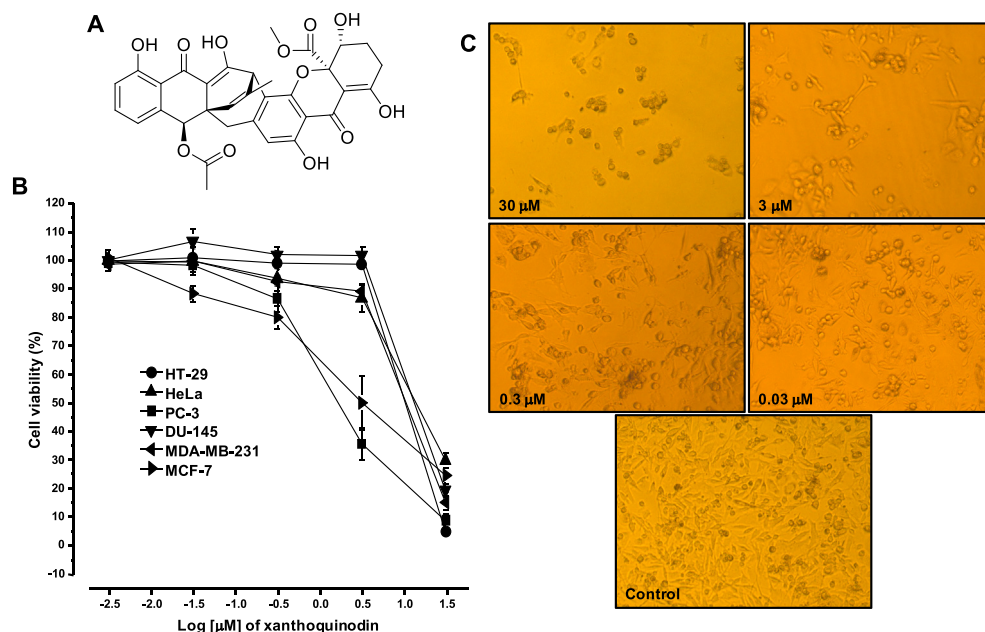


Fig. 2. (A) Structure of xanthoquinodin JBIR-99. (B) Cytotoxic activity of xanthoquinodin in PC-3 prostate cancer cells. (C) Microscopic view (magnifier Zeiss CP-Achromat 5x/0.12) of PC-3 cells after 72 h of treatment.

Table 1Cytotoxic activity of xanthoquinodin JBIR-99 isolated from *Parengyodontium album* MEXU30054.

Compound	HT-29	HeLa	PC-3	DU-145	MDA-MB-231	MCF-7	CCD-112CoN
Xanthoquinodin	10.5	15.5	1.7	12.6	11.3	6.8	> 100
Paclitaxel ^a	0.001	0.005	0.005	0.003	0.01		23
Ellipticin ^a						0.8	

IC₅₀ values are the concentration (μM) required for 50% inhibition of cell viability after 72 h incubation for a given test compound and were calculated using nonlinear regression analysis with measurements performed in triplicate and representative of three independent experiments, where the values generally agreed within 10%. ^aPositive control.

induced loss of MTP in a concentration-dependent manner ($p \leq 0.05$) as well as staurosporine ($8 \mu\text{M}$, $p \leq 0.05$) used as positive control. The effective concentration estimated to trigger 50% of loss of MTP (EC₅₀) calculated was $16.3 \mu\text{M}$.

3.4. Xanthoquinodin JBIR-99 regulates intrinsic apoptotic-protein expression in PC-3 prostate cells

To evaluate the involvement of some apoptosis-related protein expression, Western blot analysis was conducted on PC-3 cells after 15 h of treatment with xanthoquinodin. Fig. 5A and D illustrates that xanthoquinodin at $50 \mu\text{M}$ and rocaglamide ($3 \mu\text{M}$, positive control) down-regulated expression levels of Bcl-2 and PARP-1 ($p < 0.05$) respect to the control treatment. However, the treatment with xanthoquinodin ($50 \mu\text{M}$, $p \leq 0.05$) induced a significant increment on protein expression of Bax and cytochrome c (Cyt c) as rocaglamide did ($p \leq 0.05$). These results correlate the apoptotic effect of xanthoquinodin with the downregulation of PARP-1 and Bcl-2 and upregulation of Bax and Cyt c.

3.5. Xanthoquinodin JBIR-99 induces ROS generation in PC-3 prostate cells

Oxidative stress, such as ROS have been involved in regulation of apoptosis. To investigate the intracellular effects of xanthoquinodin in ROS overgeneration, a fluorescence assay was implemented. Fig. 6 shows that after 5 h of treatment with $50 \mu\text{M}$ of xanthoquinodin and daunomycin ($4 \mu\text{M}$, positive control), a significant increase in the overgeneration of ROS was observed when compared to the control

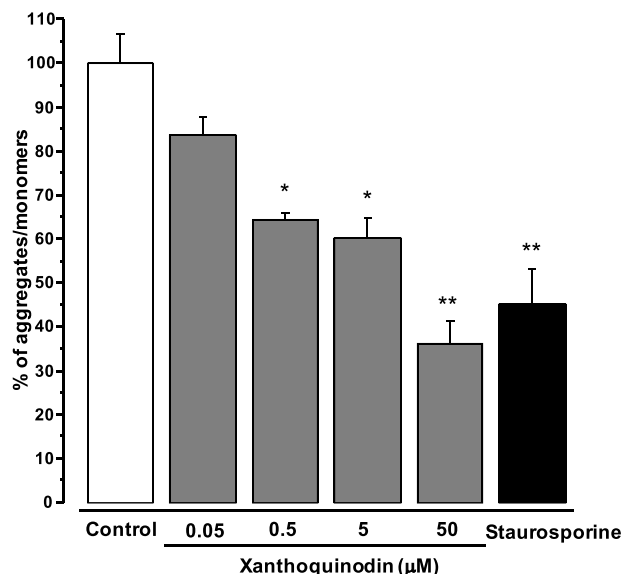


Fig. 4. Effect of xanthoquinodin JBIR-99 on the mitochondrial outer membrane potential ($\Delta\Psi_M$). Cells were treated with xanthoquinodin (0–50 μM) or staurosporine ($8 \mu\text{M}$) for 5 h. Data are expressed as the means \pm SEM ($n = 3$) of the ratio of red to green fluorescence (aggregates/monomers) and analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's multiple-comparison test compared to control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

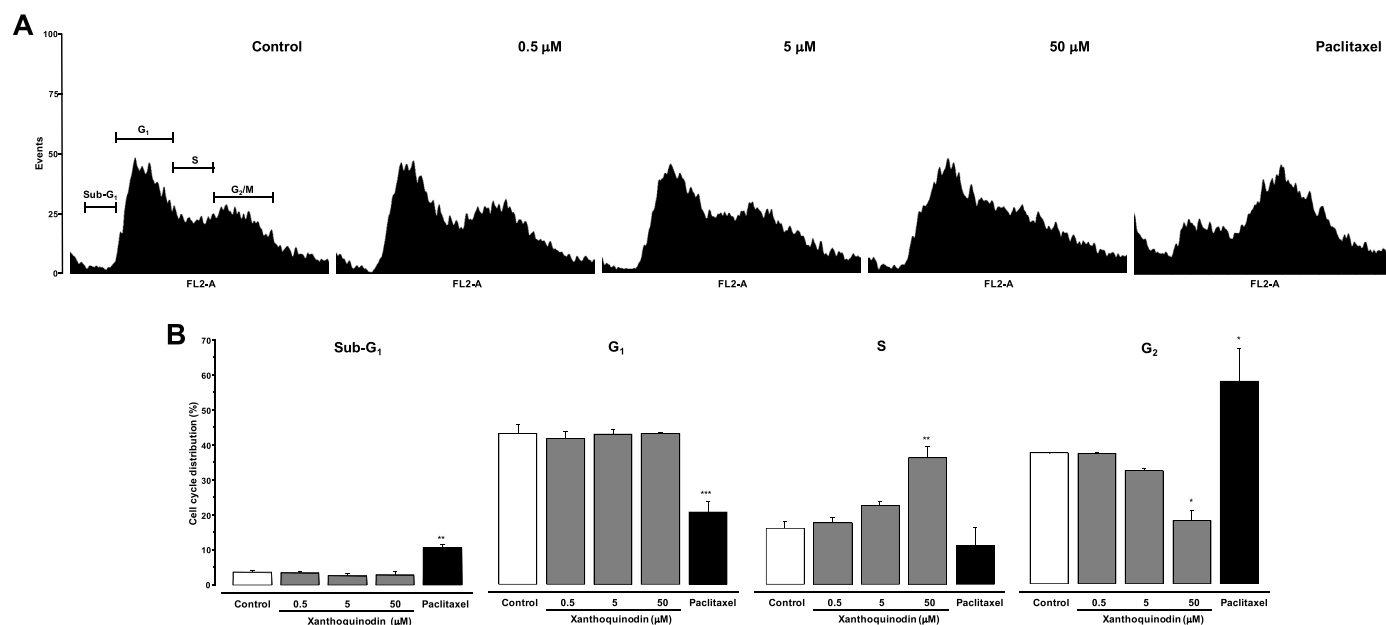


Fig. 3. (A) Effect of xanthoquinodin JBIR-99 on cell cycle distribution in PC-3 prostate cancer cells. Cells were treated for 24 h with xanthoquinodin (0–50 μM) and then stained with PI, followed by flow cytometry. (B) Data represent percentage of cell distribution in each cell cycle phase. Paclitaxel ($0.01 \mu\text{M}$) was used as positive control. The results are expressed as the means \pm SEM of two independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ for significant differences against control treatment.

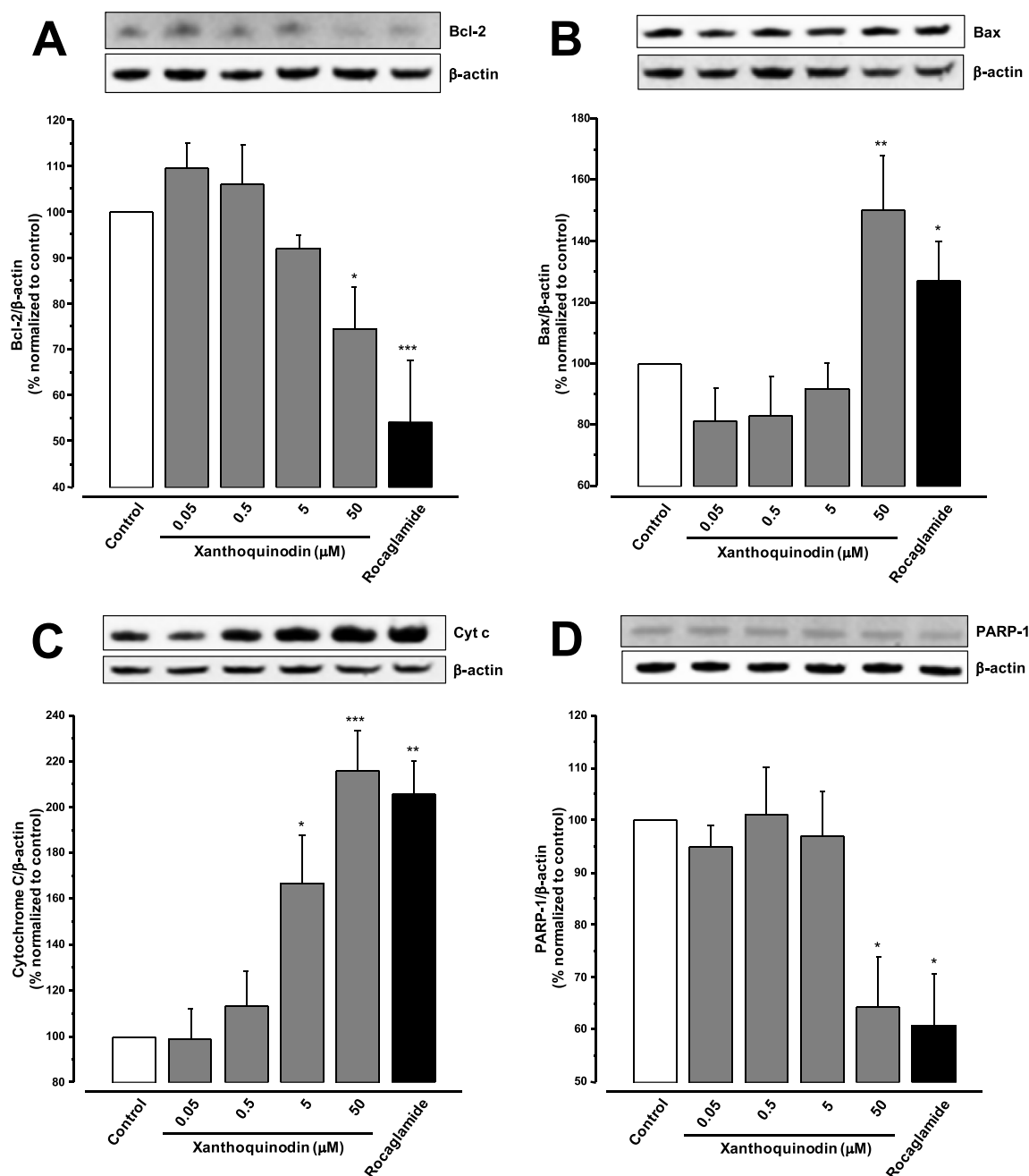


Fig. 5. Effects of xanthoquinodin JBIR-99 on intrinsic-apoptosis induction pathway in PC-3 prostate cancer cells, A) Bcl-2, (B) Bax, (C) Cyt c and (D) PARP-1 protein levels. Cells were treated with xanthoquinodin (0–50 μ M) for 15 h and the protein concentration was determined for Western blot analysis. Rocaglamide was used as positive control (3 μ M). Data are expressed as the means \pm SEM (n = 3) and analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's multiple-comparison test (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.01) of three independent assays.

(p < 0.05), in contrast with vitamin C (50 μ M), which reduced the ROS production (p < 0.01) in PC-3 prostate cells.

Then, a co-treatment with xanthoquinodin (50 μ M) and vitamin C (50 μ M) was performed. The results showed that the ROS overproduction induced by xanthoquinodin was attenuated by vitamin C (Fig. 6).

3.6. Xanthoquinodin JBIR-99 induces upregulation and activity of caspases 3 and 7 in PC-3 prostate cancer cells

To evaluate the effects of xanthoquinodin on caspase activity, a luminescence assay caspase 3/7^{GLO} was used. The results in Fig. 7A reveal that after treatment of PC-3 cells with varying concentrations of

xanthoquinodin (0–20 μ M), xanthoquinodin induced caspase enzyme activity in a concentration-dependent manner (p \leq 0.05). To further characterize the effects of xanthoquinodin on the caspase pathway, expression levels of caspases-3 and -7 were examined using Western blot analysis. The results showed that xanthoquinodin significantly increased protein expression of caspase-3 (p < 0.05) with no significant effect on caspase-7 levels (Fig. 7B).

3.7. Xanthoquinodin JBIR-99 induces upregulation of NF- κ B complex in PC-3 prostate cells

To continue with the elucidation of the mechanism of action, xanthoquinodin was probed by examining its effect on NF- κ B complex in

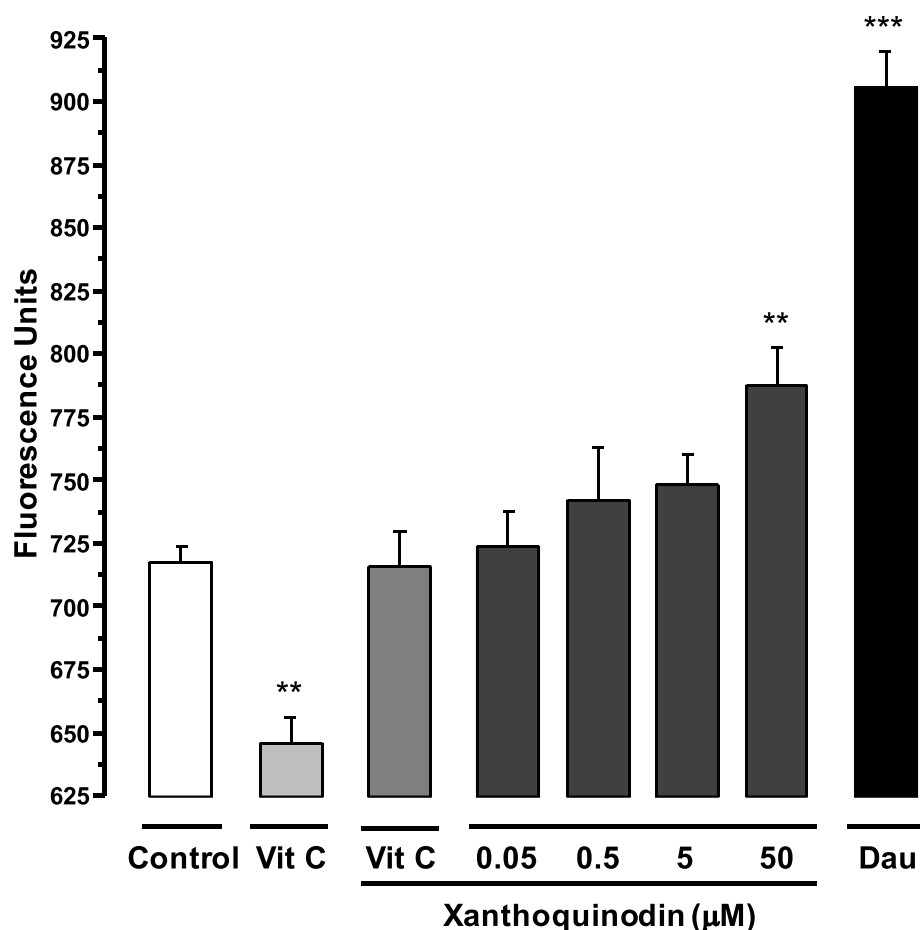


Fig. 6. Evaluation of ROS inducing effect of xanthoquinodin JBIR-99 on PC-3 prostate cancer cells. Daunomycin (4 μM) and vitamin C (Vit C, 50 μM) were used as controls. Co-treatment between xanthoquinodin and Vit C was performed at 50 μM for both. Data are expressed as the means \pm SEM ($n = 3$) and analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's multiple-comparison test compared to a control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

PC-3 cells. Western blot analysis was used to detect the expression of NF- κB (p50 and p65) and IKK (α and β). The analysis showed that at concentrations of 5 and 50 μM , xanthoquinodin increased the expression levels of NF- κB p65 ($p \leq 0.05$ and 0.001, respectively) with no significant effect on NF- κB p50 levels (Fig. 8A). Furthermore, xanthoquinodin (at 5 and 50 μM) selectively upregulated expression of IKK β ($p \leq 0.05$ and 0.001, respectively) without modifying IKK α levels (Fig. 8B). These results indicate that xanthoquinodin activates the NF- κB pathway which may contribute to its cytotoxic activity.

3.8. Xanthoquinodin JBIR-99 demonstrated non-toxicity in zebrafish

A zebrafish (*Danio rerio*) model was used to test *in vivo* potential toxicity of xanthoquinodin. Zebrafish embryos at 24 h post fertilization (hpf) were treated for 24 h with either xanthoquinodin (50 μM), cycloheximide (positive control, 50 μM), or 0.03% DMSO (negative control). As shown in Fig. 9, xanthoquinodin did not produce any visible developmental abnormalities, including those of the brain, vasculature, heart, gut, trunk, or tail in the zebrafish. In contrast, cycloheximide caused developmental delay when compared to the control. The data collected from this experiment is the result of initial screening with a single dose that could be used in future advanced toxicity studies.

4. Discussion

In accordance with above described studies, this investigation demonstrated antiproliferative activity of the xanthoquinodin in many human cancer cell lines, with high selectivity against PC-3 prostate cancer cells. The results obtained in this study suggest that xanthoquinodin activated both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, which caused cell cycle arrest in S phase (Fig. 10). The molecular

mechanism by which xanthoquinodin induced intrinsic apoptosis was through ROS production, loss of MTP, and an increase of caspase-executors activity. Xanthoquinodin also activated the extrinsic apoptosis pathway through activation of the NF- κB complex.

Programmed cell death (apoptosis) is a process that normally occurs in cells during development and aging, and its function is to maintain homeostatic cell populations in tissues. This process is executed in an organized, well-preserved molecular pathway [24, 25]. Xanthoquinodin showed anti-proliferative activity in PC-3 cells, causing morphological changes indicative of a possible apoptotic event including cell shrinkage.

The cell cycle is a conserved process by which eukaryotic cells replicate themselves [26]. The failure to control any step of the cell cycle process can lead to catastrophic effects, including uncontrolled cellular growth resulting in cancer [27]. Given the importance of the cell cycle in the proper functioning of the cell, pharmaceutical agents that target a specific phase of the cycle have emerged as an attractive option in cancer chemotherapy. Xanthoquinodin induced cell cycle arrest in the S-phase followed by apoptosis towards PC-3 cells. Several anticancer agents induce cell cycle intervention in the S-phase, including 5-fluorouracil, gemcitabine, methotrexate, and irinotecan [28]. Many molecules control progression through S-phase, such as cyclin-CDK complexes, Polo-like kinase 1 (PLK1), Checkpoint kinase 1 (CHK1), and Aurora kinases (Aurora A and Aurora B) [29,30]. The activation of CDK-complex by cdc25 phosphatase family mediates the process to S-phase to G₂-phase, but, when DNA is damaged CHK1 is activated and inhibits cdc25 phosphatase, therefore S-phase arrest is induced. Thus, compounds that induce cell cycle arrests in S-phase enhance sensibility to cell death by DNA damage [31]. Therefore, it is suggested that xanthoquinodin is involved in cell cycle regulation in PC-3 cells, preventing proliferation and inducing apoptosis. Hence, further

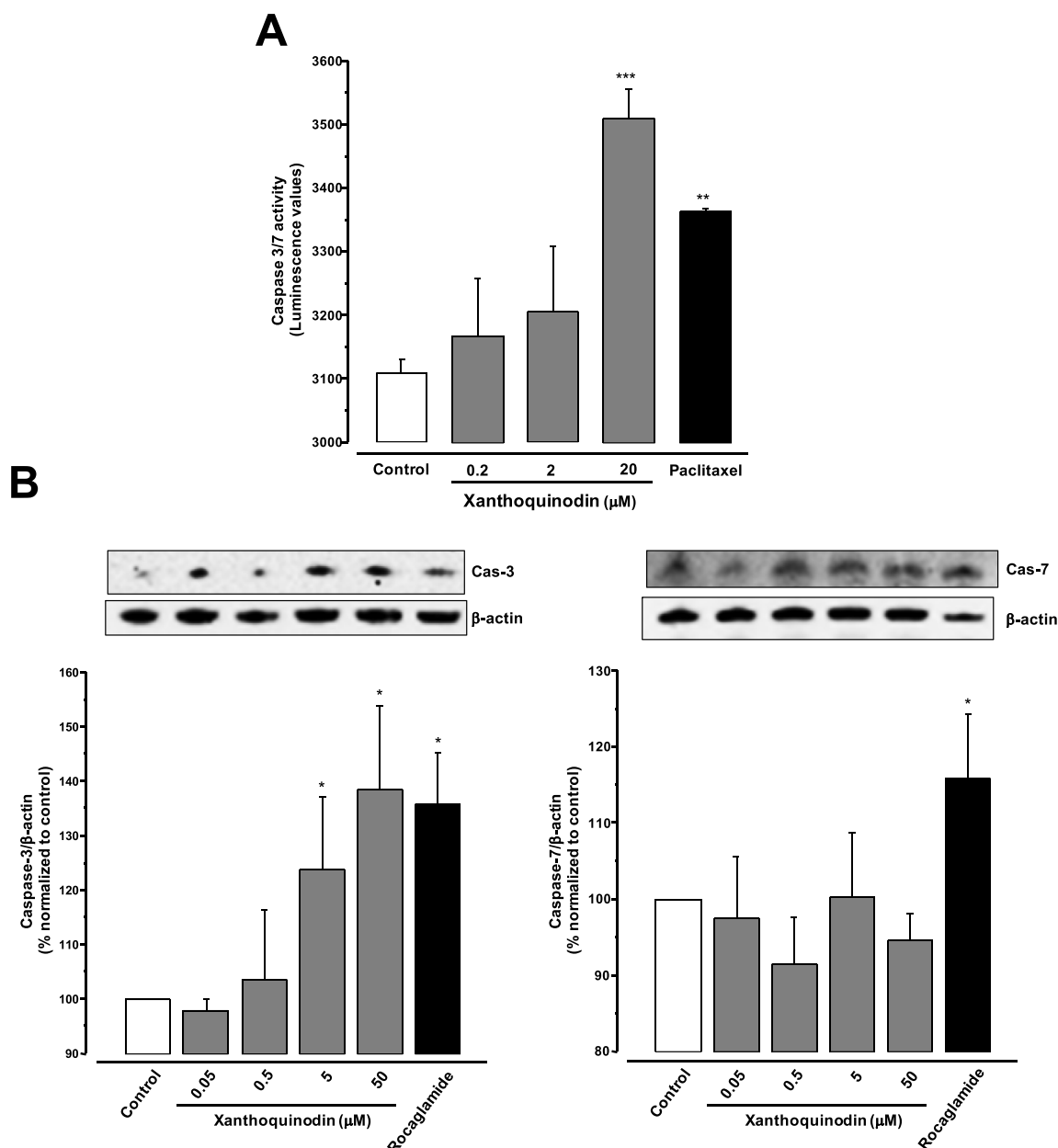


Fig. 7. Effects of xanthoquinodin JBIR-99 on caspase pathway in PC-3 prostate cancer cells. (A) Effects of xanthoquinodin (0–20 μM) on activity of caspase 3 and 7 after 15 h of treatment. (B) Effects of xanthoquinodin (0–50 μM) on the protein expression of caspase 3 and 7 after 15 h of treatment. Rocaglamide was used as positive control (3 μM). Data are expressed as the means \pm SEM ($n = 3$) and analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's multiple-comparison test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$) of three independent assays.

experiments are necessary to determine potential interactions of xanthoquinodin with any of these molecules involved in the regulation of the progression through S phase.

Apoptosis can be activated by intrinsic or extrinsic pathways. Intrinsic apoptosis induced by mitochondrial pathway, is controlled by mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) [32]. MOMP is mainly triggered by proapoptotic members of the B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family and the mitochondrial permeability transition (MPT) following the opening of the permeability transition pore complex [33]. MOMP results in the release of various cell death modulators, such as cytochrome *c* (Cyt *c*), apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G, Smac/DIABLO, and Omi/HtrA₂ from the mitochondrial intermembrane space [34]. Depending on which modulators are released, caspase-dependent or caspase-independent apoptosis can be induced. In the current study, xanthoquinodin induced a loss of membrane permeabilization, and increased the protein expression of Cyt *c*. Thus, these results

suggest that xanthoquinodin could be activating the intrinsic pathway.

The Bcl-2 family can be divided into antiapoptotic proteins, such as Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Bcl-Rambo, Bcl-L10, and Bcl-G, and proapoptotic proteins like Bax, Bak, and Bok [37]. It has been found that Bcl-2 proteins play an important role in the resistance of cancer cells to chemotherapy or radiation therapy. Bcl-2 promotes cell proliferation by preventing normal cell turnover [36]. This is achieved by inhibiting the release of the pro-apoptotic modulators Cyt *c* and AIF from the mitochondria [37]. The inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 proteins could restore the apoptotic process in tumor cells. In this regard, molecules with Bcl-2 inhibitory activity may represent a new class of therapeutic agents for cancer treatment [38]. In apoptosis process, the proteins Bax and Bak are inserted into the mitochondrial outer membrane and together form a pore, which allow the release of Cyt *c* from mitochondria to cytosol and directly activate caspase-3 [39]. In this study, the treatment with xanthoquinodin reduced Bcl-2, and

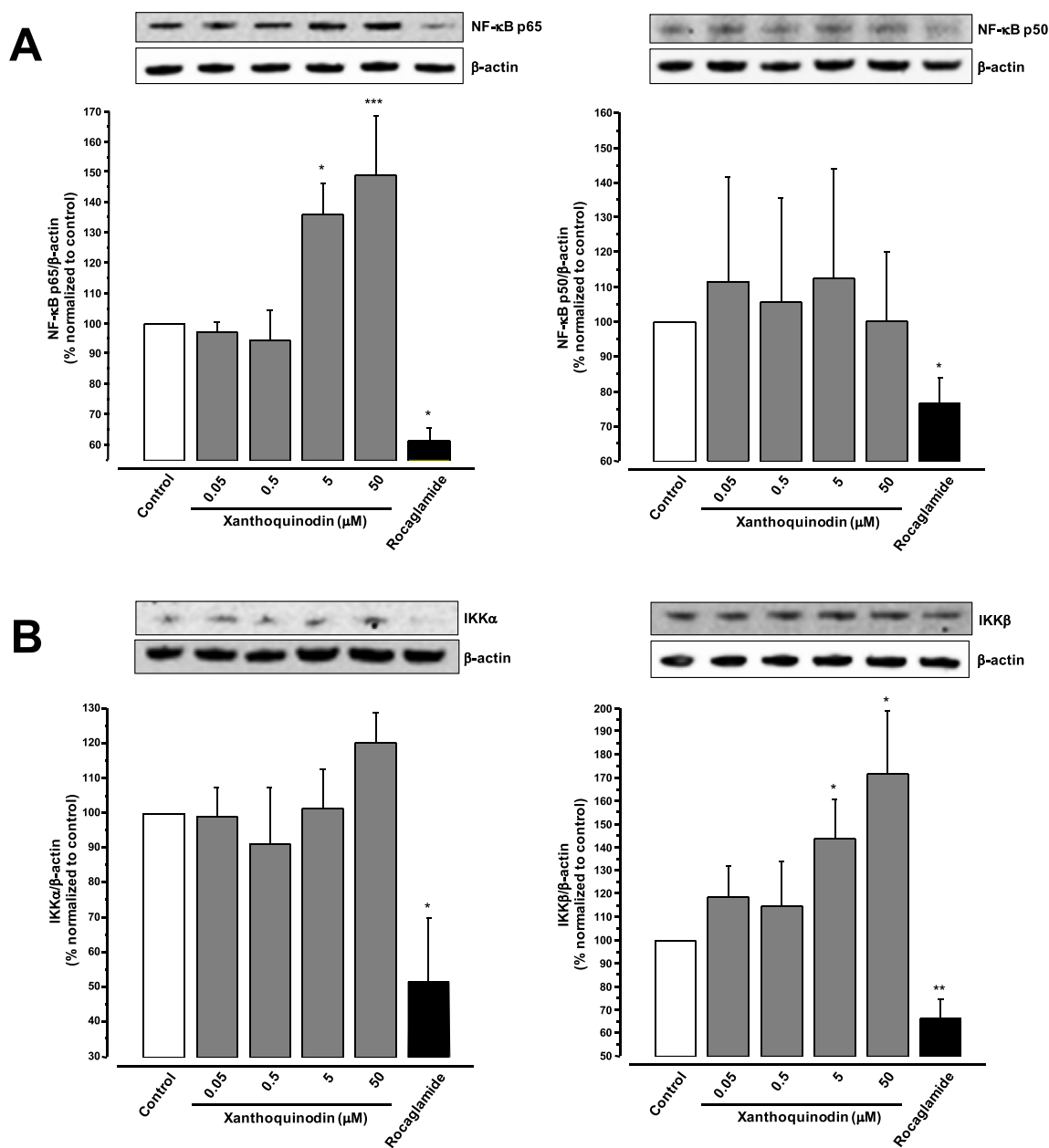


Fig. 8. Effects of xanthoquinodin JBIR-99 on the NF-κB signaling pathway in PC-3 prostate cancer cells. (A) Effects of xanthoquinodin on the protein expression of NF-κB p50 and p65. (B) Effects of xanthoquinodin on protein levels of IKK α and β. Cells were treated with xanthoquinodin (0–50 μM) for 15 h. Rocaglamide was used as the positive control (3 μM). Data are expressed as the means ± SEM ($n = 3$) and analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's multiple-comparison test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) of three independent assays.

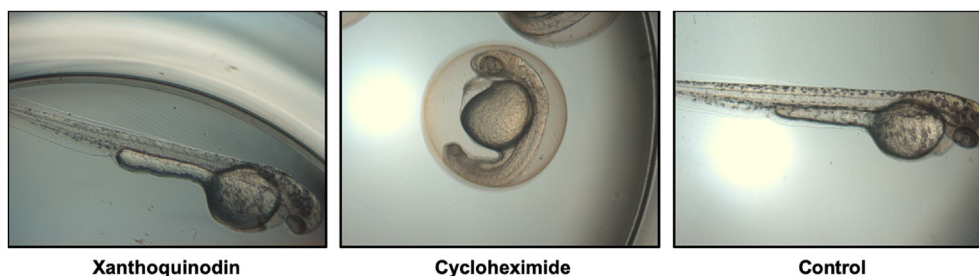


Fig. 9. Toxicity of xanthoquinodin JBIR-99 in zebrafish (*Danio rerio*) model. Animals were treated for 24 h at 50 μM with xanthoquinodin, or cycloheximide as the positive control, with an untreated control also used.

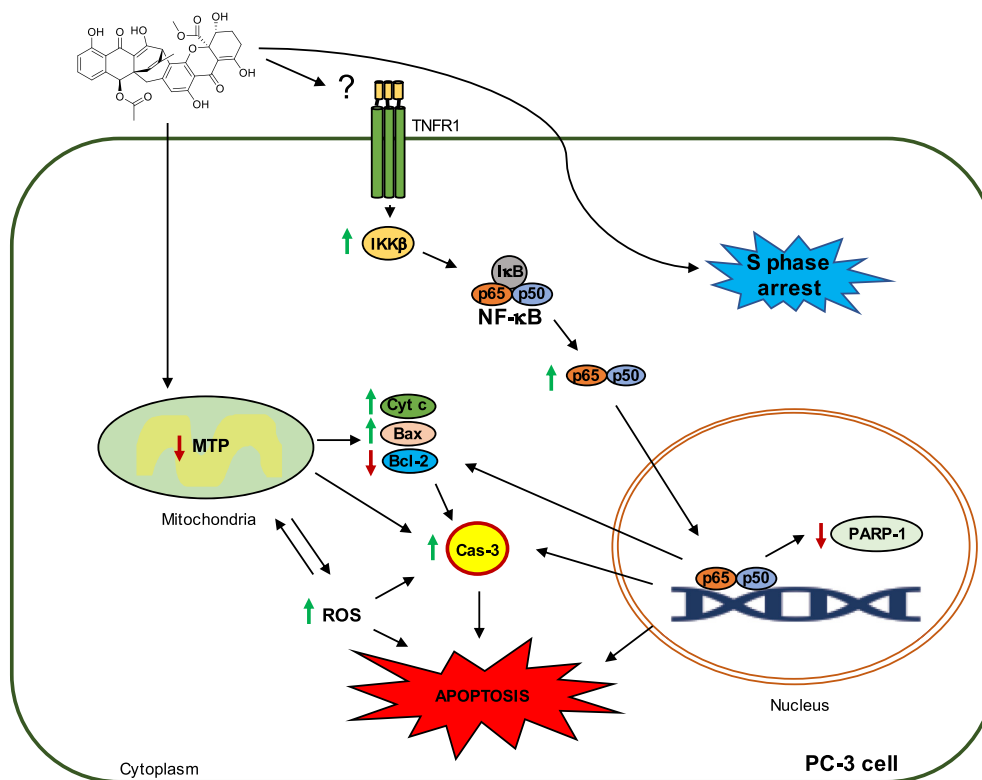


Fig. 10. Diagram of proposed molecular mechanism of action involved in PC-3 cells-apoptosis-induced by xanthoquinodin JBIR-99 isolated from *Parengyodontium album* MEXU30054.

increased Bax and Cyt *c* protein expression levels. Based on this information xanthoquinodin could be triggering intrinsic apoptosis.

Beyond the release of cell death modulators, MOMP also causes inhibition of the respiratory chain and increased production of reactive oxygen species (ROS) [40]. ROS are considered to be essential for the regulation of normal cellular developmental processes, such as cell cycle progression, proliferation, differentiation, migration and cell death. Nonetheless, excess cellular levels of ROS result in damage to proteins, nucleic acids, lipids, membranes, and organelles, which can ultimately lead to activation of apoptosis [41]. Since the production of excessive levels of ROS can induce apoptosis, the concentrations of ROS in response to treatment with xanthoquinodin were evaluated in PC-3 cells. Treatment with xanthoquinodin resulted in a significant increase in the levels of ROS. ROS can elicit apoptosis by activating various kinases/pathways involved in the provocation of either cell death or cell survival, such as nuclear factor kappa-light-chain B (NF- κ B) [42]. Additionally, excess mitochondrial levels of ROS provoke the loss of MTP and opening of Bax and Bak channels, which ultimately results in the release of Cyt *c* [43]. Importantly, the ROS overproduction induced by xanthoquinodin was inhibited in the co-treatment with vitamin C, which is an antioxidant that stop the propagation of the increase of oxygen concentrations and apoptosis [44]. These findings suggest that xanthoquinodin could be directly correlated to changes in the redox-state of cell elements.

ROS can also cause direct damage to nuclear and mitochondrial DNA. Poly-(ADP-ribose) polymerases-1 (PARP-1) is a nuclear chromatin-bound enzyme, which main role is to repair DNA damage and thus, maintaining genomic stability by catalyzing the polymerization of ADP-ribose units [45]. PARP-1 is activated by DNA damage, and it has been found to be overexpressed in various carcinomas [46]. Western blot analysis revealed that treatment with xanthoquinodin significantly reduced PARP-1 expression levels in PC-3 cells.

The release of Cyt *c* is essential for apoptosome formation. Once in the cytoplasm, Cyt *c* mediates the allosteric activation of apoptosis-

protease activating factor 1 (Apaf-1), and subsequent interaction with caspase-9. This apoptosome complex in turn induces the maturation and activation of executioner caspases, such as caspase-3 and caspase-7 [25,35,47]. The activation of caspases plays a major role in the execution of apoptosis. Caspase-dependent apoptotic pathways consist of upstream initiators like caspases-8, -10, -2 and -9 and downstream effectors such as caspases-3, -6 and -7 [47]. The present study demonstrated that xanthoquinodin induced an upregulation of Cyt *c* and activation and increase in protein expression of caspase-3, but not caspase-7. This suggests that xanthoquinodin activates the intrinsic apoptosis pathway via activation and upregulation of caspase-3, which is facilitated by the release of Cyt *c*.

The extrinsic apoptosis pathway is activated by external stimulation of the membrane death receptors (DRs). The cascade of signaling of these receptors induce caspase-8 activation to final apoptosis mediated by caspase 3 activation [48]. TNF receptor 1 (TNFR1), a member of the DRs, has an intracellular death domain (DD) which is responsible for the generation of the cytotoxic death signals, as well as for the activation of NF- κ B [49]. Dimers of NF- κ B proteins form distinct protein complexes, which upon induction, act as transcription factors for genes that regulate a large array of cellular processes, like inflammation, immunity, and cancer [50]. Members of this family include NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB, and c-Rel, all of which participate in various dimer combinations [48]. Stringent regulation of NF- κ B is essential for the integrity of cellular functions. In general, inactive NF- κ B proteins are bound to a family of inhibitory proteins (I κ B) in the cytoplasm [51]. The phosphorylation of I κ B by the I κ B kinase (IKK) complex induces ubiquitination and degradation of I κ B, which results in NF- κ B activation [51]. Release of NF- κ B dimers from the inhibitory complex are activated by rapid nuclear translocation, where they can interact with their target genes [51]. It is well known that the activation of NF- κ B is involved in the pathophysiology of cancer. Signaling cascades that trigger NF- κ B activation are diverse and can thus induce either apoptotic or anti-apoptotic pathways [52]. In this sense, NF- κ B may

activate the transcription of several genes involved in the suppression of cell death by both mitochondrial (intrinsic) and death receptor (extrinsic) pathways. Interestingly, treatment with compound xanthoquinodin caused an upregulation of NF- κ B p65 and the IKK β complex. It is generally accepted that NF- κ B activation is responsible for apoptosis resistance. However, many reports suggest that the activation of specific NF- κ B dimer combinations can mediate cell death [53]. In this context, in most cells the active NF- κ B dimer is p65/p50 [54]. Collet and colleagues demonstrated that the apoptotic activity of curcumin, an NF- κ B inhibitor, is potentiated by the overexpression of p65 [55]. On the other hand, the NF- κ B pro-apoptotic activity has been also attributed to the expression of some member of TNFR superfamily, including members such as CD95 (Fas), TRAIL-R1 (DR4), and TRAIL-R2 (DR5), or their respective cognate death ligands, such as tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). TRAIL is a member of the TNF ligand family that is able to selectively induce apoptosis in transformed cancer cells, but not in normal cells [56]. Further experiments are needed for xanthoquinodin to explore if the lack of *in vitro* cytotoxicity in normal human colon cells (CCD-112-CoN) and the *in vivo* zebrafish non-developmental toxicity are involved in TRAIL activation.

5. Conclusion

This study demonstrated antiproliferative activity of the xanthoquinodin JBIR-99, isolated from *Parengyodontium album*, in several human cancer cell lines, with selective cytotoxicity towards human prostate cancer (PC-3) cells. In contrast to its activity in cancer cell lines, xanthoquinodin did not exhibit cytotoxicity in normal human colon (CCD-112-CoN) cells and exhibited non-developmental toxicity in zebrafish. As part of a preliminary mechanistic study using PC-3 cells, xanthoquinodin induced apoptosis through both intrinsic and extrinsic pathways, which was demonstrated by morphological and biochemical changes. Xanthoquinodin also increased the expression levels of NF- κ B p65, with no significant effect on NF- κ B p50 levels. Furthermore, xanthoquinodin selectively upregulated expression of IKK β without modifying IKK α levels. These results indicate that xanthoquinodin activates the NF- κ B pathway which may correlate to its cytotoxic activity. Therefore, xanthoquinodin is an excellent lead for chemical and biological optimization, and for potential development of a novel anticancer agent that selectively targets prostate cancer.

Acknowledgement

Partial support for the research through a fellowship from CONACyT to pursue graduate studies that was awarded to D.R.R.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108798>.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] American Cancer Society, About prostate cancer, <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8793.00.pdf> March 2019.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, *C.A. Cancer J. Clin.* 69 (2019) 7–34 2019.
- [3] R.A. Madan, S.K. Pal, O. Sartor, W.L. Dahurt, Overcoming chemotherapy resistance in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 3892–3902.
- [4] S. Tai, Y. Sun, J.M. Squires, H. Zhang, W.K. Oh, C.Z. Liang, J. Huang, PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma, *The Prostate* 71 (2011) 1668–1679.
- [5] M.S. Blutler, A.A. Robertson, M.A. Cooper, Natural product and natural product derived drugs in clinical trials, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 1612–1661.
- [6] A. Kornienko, A. Evidente, M. Vurro, V. Mathieu, A. Cimmino, M. Evidente, W.A. van Otterlo, R. Dasari, F. Lefranc, R. Kiss, Toward a cancer drug of fungal origin, *Med. Res. Rev.* 35 (2015) 937–967.
- [7] A. Evidente, A. Kornienko, A. Cimmino, A. Andolfi, F. Lefranc, V. Mathieu, R. Kiss, Fungal metabolites with anticancer activity, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 617–627.
- [8] C.C. Tsang, J.F.W. Chan, W.M. Pong, J.H.K. Chen, A.H.Y. Ngan, M. Cheung, C.K.C. Lai, D.N.C. Tsang, S.K.P. Lau, P.C.Y. Woo, Cutaneous hyalohyphomycosis due to *Parengyodontium album* gen. et comb. nov, *Med. Mycol.* 54 (2016) 699–713.
- [9] W. Wang, R. Chen, Z. Luo, W. Wang, J. Chen, Two new benzoate derivatives and one new phenylacetate derivative from a marine-derived fungus *Engyodontium album*, *Nat. Prod. Res.* 31 (2017) 758–764.
- [10] L.H. Meng, H.Q. Chen, I. Form, B. Konuklugil, P. Proksch, B.G. Wang, New chromone, isocoumarin, and indole alkaloid derivatives from three sponge-derives fungal strains, *Nat. Prod. Commun.* 11 (2016) 1293–1296.
- [11] Q. Yao, J. Wang, X. Zhang, X. Nong, X. Xu, S. Qi, Cytotoxic polyketides from the deep-sea-derived fungus *Engyodontium album* DFFSCS021, *Mar. Drugs* 12 (2014) 5902–5915.
- [12] J. Ueda, M. Takagi, K. Shin-Ya, New xanthoquinodin-like compounds, JBIR-97, -98 and -99, obtained from the marine sponge-derived fungus *Tritarachium* sp. SpB081112MEF2, *J. Antibiot.* 63 (2010) 615–618.
- [13] B. Wu, J. Wiese, A. Wenzel-Storjohann, S. Malien, R. Schmaljohann, J.F. Imhoff, Engyodontochones, antibiotic polyketides from the marine fungus *Engyodontium album* strain LF069, *Chem. Eur. J.* 22 (2016) 7452–7462.
- [14] T.J. White, T. Bruns, S.H. Lee, J.W. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1990, pp. 315–322.
- [15] M. Gardes, T.J. White, J.A. Fortin, T.D. Bruns, J.W. Taylor, Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA, *Can. J. Bot.* 69 (1991) 180–190.
- [16] H.A. Raja, A.N. Miller, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 756–770.
- [17] C.-C. Tsang, J.F.W. Chan, W.-M. Pong, J.H. Chen, A.H. Ngan, M. Cheung, C.K. Lai, D.N. Tsang, S.K. Lau, P.C. Woo, Cutaneous hyalohyphomycosis due to *Parengyodontium album* gen. et comb. nov, *Med. Mycol.* 54 (2016) 699–713.
- [18] K. Likhitiwitayawuid, C.K. Angerhofer, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, N. Ruangrunsi, Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*, *J. Nat. Prod.* 53 (1993) 30–38.
- [19] J.A. Kim, E.K. Lau, L. Pan, E.J. Carcache de Blanco, NF- κ B inhibitors from *Brucea javanica* exhibiting intracellular effects on reactive oxygen species, *Anticancer Res.* 30 (2010) 3295–3300.
- [20] Y. Deng, M.J. Balunas, J.-A. Kim, D.D. Lantvit, Y.-W. Chin, H. Chai, S. Sugiarto, L.B.S. Kardono, H.H.S. Fong, J.M. Pezzuto, S.M. Swanson, E.J. Carcache de Blanco, A.D. Kinghorn, Bioactive 5,6-dihydro- α -pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*, *J. Nat. Prod.* 72 (2009) 1165–1169.
- [21] U. Muñoz-Acuña, J. Wittwer, S. Ayer, C. Pearce, N.H. Oberlies, E.J. Carcache de Blanco, Effects of (5z)-7-oxozeaenol on MDA-MB-231 breast cancer cells, *Anticancer Res.* 32 (2012) 2415–2422.
- [22] U.M. Acuña, Q. Shen, Y. Ren, D.D. Lantvit, J.A. Wittwer, A.D. Kinghorn, S.M. Swanson, E.J. Carcache de Blanco, Goyazensolide induces apoptosis in cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *Int. J. Cancer Res.* 9 (2013) 36–53.
- [23] Y. Li, W. Huang, S. Huang, J. Du, C. Huang, Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422 (2012) 85–90.
- [24] K. Saraste, Pulkki, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc. Res.* 45 (2000) 528–537.
- [25] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [26] Pucci, M. Kastan, A. Giordano, Cell cycle and apoptosis, *Neoplasia* 2 (2000) 291–299.
- [27] K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif* 36 (2003) 131–149.
- [28] J.J. Nair, J. van Staden, Cell cycle modulatory effects of *Amaryllidaceae* alkaloids, *Life Sci.* 213 (2018) 94–101.
- [29] R. Visconti, R.D. Monica, D. Grieco, Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35 (2016) 153.
- [30] T. Otto, P. Sicinski, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy, *Nature* 17 (2017) 93–115.
- [31] W.-H. Zhang, A. Poh, A.A. Fanous, A. Eastman, DNA damage-induced S phase arrest in human breast cancer depends on Chk1, but G2 arrest can occur independently of Chk1, Chk2 or MAPKAPK2, *Cell Cycle* 7 (2008) 1668–1677.
- [32] A.N. Hata, J.A. Engelman, A.C. Faber, The BCL2 Family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics, *Cancer Discov.* 5 (2015) 475–487.
- [33] A.R.D. Delbridge, A. Strasser, The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy, *Cell Death Differ.* 22 (2015) 1071–1080.
- [34] S. Fulda, K.-M. Debatin, Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, *Oncogene* 25 (2006) 4798–4811.
- [35] J. Kale, E.J. Osterlund, D.W. Andrews, BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 65–80.
- [36] O. Gul, H. Basaga, O. Kutuk, Apoptotic blocks and chemotherapy resistance: strategies to identify Bcl-2 protein signatures, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* 7 (2008) 27–34.
- [37] L. Galluzzi Garrido, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, G. Kroemer, Mechanisms of

- cytochrome c release from mitochondria, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1423–1433.
- [38] M.H. Naseri, M. Mahdavi, J. Davoodi, S.H. Tackallou, M. Goudarzvand, S.H. Neishabouri, Up regulation of Bax and down regulation of Bcl2 during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells, *Cancer Cell Int.* 15 (2015) 55.
- [39] D. Westphal, G. Dewson, P.E. Czabotar, R.M. Kluck, Molecular biology of Bax and Bak activation and action, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 521–531.
- [40] Y.S. Bae, H. Oh, S.G. Rhee, Y.D. Yoo, Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling, *Mol. Cells* 32 (2011) 491–509.
- [41] M. Schieber, N.S. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.* 24 (2014) R453–R462.
- [42] J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, Q. Ye, D. Wu, Y. Liu, W. Dong, ROS and ROS-mediated cellular signaling, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016) 4350965.
- [43] M. Redza-Dutordoir, D.A. Averill-Bates, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2016) 2977–2992.
- [44] A. Kawashima, A. Sekizawa, K. Koide, J. Hasegawa, K. Satoh, T. Arakaki, S. Takenaka, R. Matsuoka, Vitamin C induces the reduction of oxidative stress and paradoxically stimulates the apoptotic gene expression in extravillous trophoblasts derived from first-trimester tissue, *Reprod. Sci.* 22 (2015) 783–790.
- [45] A.R. Chaudhuri, A. Nussenzweig, The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 610–621.
- [46] L. Wang, C. Liang, F. Li, D. Guan, X. Wu, X. Fu, A. Lu, G. Zhang, PARP1 in carcinomas and PARP1 inhibitors as antineoplastic drugs, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2111.
- [47] L. Dorstyn, C.W. Akey, S. Kumar, New insights into apoptosome structure and function, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 1194–1208.
- [48] J. Seo, M.W. Kim, K.H. Bae, S.C. Lee, J. Song, E.W. Lee, The roles of ubiquitination in extrinsic cell death pathways and its implications for therapeutics, *Biochem. Pharmacol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.012>.
- [49] K. Heyninck, R. Beyaert, Crosstalk between NF- κ B-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex, *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 4 (2001) 259–265.
- [50] Y. Xia, S. Shen, I.M. Verma, NF- κ B, an active player in human cancers, *Cancer Immunol. Res.* 2 (2014) 823–830.
- [51] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.-C. Sun, NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct. Target. Ther.* 2 (2017) e17023.
- [52] J. Napetschnig, H. Wu, Molecular basis of NF- κ B signaling, *Annu. Rev. Biophys.* 42 (2013) 443–468.
- [53] X. Dolcet, D. Llobet, J. Pallares, X. Matias-Guiu, NF- κ B in development and progression of human cancer, *Virchows Arch.* 446 (2005) 475–482.
- [54] Z. Sun, R. Andersson, NF-kappa B activation and inhibition: a review, *Shock* 18 (2002) 99–106.
- [55] G.P. Collett, F.C. Campbell, Overexpression of p65/RelA potentiates curcumin-induced apoptosis in HCT116 human colon cancer cells, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1285–1291.
- [56] S. Shetty, B.A. Graham, J.G. Brown, X. Hu, N. Vegh-Yarema, G. Harding, J.T. Paul, S.B. Gibson, Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 5404–5416.