



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA PROTEÍNA TIROSINA  
FOSFATASA 1B DE LA ESPECIE FÚNGICA *Malbranchea Albolutea*  
(ONYGENACEAE), DE UTILIDAD POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE  
AGENTES ANTIDIABÉTICOS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Miriam Díaz Rojas

Dra. Rachel Mata Essayag

Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, UNAM, Ciudad de México, 24 de abril del 2023.



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**TEMA DE TESIS**

NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA PROTEÍNA TIROSINA  
FOSFATASA 1B DE LA ESPECIE FÚNGICA *Malbranchea Albolutea*  
(ONYGENACEAE), DE UTILIDAD POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE  
AGENTES ANTIDIABÉTICOS

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. Miriam Díaz Rojas**

**TUTORA**

**Dra. Rachel Mata Essayag**

Facultad de Química UNAM



Ciudad de México, 24 de abril del 2023

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Dra. Adela Rodríguez Romero

VOCAL: Dra. Alejandra Hernández Santoyo

VOCAL: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

VOCAL: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SECRETARIO: Dr. Martín Gonzáles Andrade

## LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO DE TESIS:

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

## CONGRESO:

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

## PUBLICACIONES:

- Díaz-Rojas, M., Raja, H., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Mata, R., 2021. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry* 184. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112664>
- Pérez-Vásquez, A., Díaz-Rojas, M., Castillejos-Ramírez, E. V., Pérez-Esquivel, A., Montaña-Cruz, Y., Rivero-Cruz, I., Torres-Colín, R., González-Andrade, M., Rodríguez-Sotres, R., Gutiérrez-González, J.A., Madariaga-Mazón, A., Mata, R., 2022. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of compounds from *Justicia spicigera* (Acanthaceae). *Phytochemistry* 203. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113410>



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por toda mi formación científica y social.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo de investigación (CY011226; No. De Becario: 604010), y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, 203523).

A la Dra. Rachel Mata por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por toda la ayuda, paciencia, consejos y por no dejarme desistir. Muchísimas Gracias.

A las doctoras Isabel Rivero y Araceli Pérez, por brindarme sus conocimientos y su apoyo.

A los doctores Martín Gonzales Andrade, Rodrigo Aguayo Ortiz y Rogelio Rodríguez Sotres por todo el apoyo brindado para realizar la segunda parte del proyecto.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. Adela Rodríguez Romero y Dr. José Rivera Chávez, por las revisiones semestre a semestre y el apoyo que me brindaron para enriquecieron mi proyecto de doctorado.

A la Dra. Laura Flores Bocanegra por los espectros de dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear de los compuestos aislados de *M. albolutea*.

Finalmente, a los miembros del jurado, por sus valiosas correcciones y comentarios.



## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABLAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
1. ANTECEDENTES .....	17
1.1 Diabetes mellitus (DM).....	17
1.2 Diabetes mellitus Tipo 1 .....	19
1.3 Diabetes mellitus Tipo 2 (DMT2).....	19
1.4 Tipos de diabetes mellitus con menor tasa de incidencia .....	22
1.5 Tratamientos farmacológicos para la DM .....	22
1.6 Tratamientos novedoso de la DMT2 .....	2
1.7 Generalidades de las Proteínas tirosinas fosfatasas (PTP).....	3
1.7.1 Proteína tirosina fosfatasa 1B .....	4
1.7.2 Inhibición en la PTP1B .....	9
1.8 Antecedentes sobre <i>Malbranchea albolutea</i> .....	11
1.8.1 Compuestos asilados de la especie <i>Malbranchea</i> .....	13
2. HIPÓTESIS .....	17
3. OBJETIVOS .....	17
3.1 Objetivo General .....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	19
Procedimientos generales.....	19
4.1 Estudio de <i>Malbranchea albolutea</i> .....	20
4.1.1 Material Fúngico .....	20
4.1.1.1 Condiciones de crecimiento, extracción y aislamiento.....	21
4.1.1.2 Preparación cultivos a pequeña escala .....	21
4.1.1.3 Preparación del extracto orgánico a partir de los cultivos.....	21
4.1.2 Fraccionamiento de FrMALb MeOH-CH <sub>3</sub> CN y obtención de los compuestos puros .....	22
4.1.3 Ensayos enzimáticos.....	23
4.1.3.1 Estudios de cinética enzimática .....	24
4.1.4 Estudios de acoplamiento y dinámica molecular.....	25

4.1.5 Predicciones ADMET de los compuestos estudiados.....	28
4.2 Descubrimiento de nuevos inhibidores de la PTP1B a partir de una pequeña quimioteca de productos naturales de laboratorio 124 del Departamento de Farmacia .....	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1 Estudio de <i>Malbranchea albolutea</i> .....	30
5.1.1 Identificación del Material fúngico .....	30
5.1.2 Extracción y aislamiento de los productos identificados en el extracto orgánico de <i>M. albolutea</i> (FrMAIb) .....	30
5.1.2.1 Aislamiento y caracterización de Alboluteinas A-C (40–42) .....	32
5.1.2.2 Caracterización Alboluteina B (41).....	35
5.1.2.3 Caracterización 1- <i>H</i> -Indol-3-carbaldehído (43) de las FrMAIb7 y 8.....	39
5.1.2.4 Aislamiento del ácido antranílico (44) de la FrMAIb9-18.....	41
5.1.3 Ensayos enzimáticos.....	41
5.1.4 Resultados de acoplamiento y dinámica molecular.....	43
5.1.5 Predicciones ADMET de los productos aislados de <i>M. albolutea</i> .....	47
5.2 Resultados nuevos inhibidores de la PTP1B a partir de una pequeña quimioteca de productos naturales de laboratorio 124 del Departamento de Farmacia .....	52
5.2.1 Evaluación enzimática y determinación del espacio químico.....	52
5.2.2 Estudios de cinética enzimática .....	55
5.2.3 Estudios de acoplamiento molecular .....	57
5.2.4 Predicción de propiedades ADMET .....	61
5.2.5 Similitud de los inhibidores de la PTP1B .....	66
6. CONCLUSIONES .....	69
8. PERSPECTIVAS .....	70
9. BIBLOGRAFÍA.....	71
10. APÉNDICE .....	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa conceptual de las formas más comunes de diabetes mellitus (IDF, 2021; NIH, 2016a; WHO, 2017).....	18
<b>Figura 2.</b> Panorama mundial de la DM. En verde se presenta la región de América del Norte y el Caribe, para el 2021 se estimó que vivían 51 millones de diabéticos (IDF, 2021). .....	21
<b>Figura 3.</b> Esquemática de fármacos antidiabéticos usados en el tratamiento de la DMT2, se presentan los órganos o tejidos donde realizan su acción; péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4), transportador de glucosa dependiente de sodio 2 (SGLT2) (ADA, 2022; Bello-Chavolla et al., 2017; Buse et al., 2022; IDF, 2021; Jara Albarrán et al., 2010). .....	23
<b>Figura 4.</b> Aminoácidos que integran la cavidad catalítica de la PTP1B y su interacción con un derivado de 2-arilsulfonilaminobenzotiazoles, en anaranjado se indica la triada catalítica encargada del proceso de desfosforilación, imagen tomada de (Navarrete-Vazquez et al., 2009).....	4
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción que involucran a la PTP1B, receptor de insulina y receptor de leptina, imagen tomada de (Qian et al., 2016). .....	5
<b>Figura 6.</b> (A) Cambio conformacional en el asa WPD antes (morado) y después (verde) de la unión del sustrato (Wiesmann et al., 2004). (B) Secuencia de reacciones en sitio catalítico de la PTP1B (Qian et al., 2016). .....	6
<b>Figura 7.</b> Diagrama de cintas correspondiente al dominio catalítico de la PTP1B (PDB: 2HNP), se señalan las zonas con los aminoácidos que intervienen en la eliminación de los residuos de fosfato. Imagen creada en Chimera (Pettersen et al., 2004). .....	7
<b>Figura 8.</b> Diagrama de cintas para el modelo depositado en AlphaFold correspondiente a la PTP1B <sub>1-435</sub> (Q9PT91), en amarillo se presentan las hebras β, morado las hélices α, en cian asas o regiones intrínsecamente desestructuradas; en esferas se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos encargados de la reacción de desfosforilación. Imagen creada en Chimera (Pettersen et al., 2004).8	8
<b>Figura 9.</b> Ejemplos de Inhibidores alostéricos de la PTP1B.....	10
<b>Figura 10.</b> Derecha, <i>M. albolutea</i> , hifas segmentadas para la formación de arthroconidios; izquierda, <i>A. alboluteum</i> ascosporas (Sigler et al., 2002; Sigler L., 1976). .....	12
<b>Figura 11.</b> Compuestos con actividad biológica reportados en diversas especies del género <i>Malbranchea</i> . .....	16
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico de FrMALb. HPLC-PDA-ELSD. Columna XBridge Shield RP-C <sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 mm); fase móvil compuesta por ácido fórmico al 0.1% (A) y CH <sub>3</sub> CN (B): 0 min 15% B, 8 min 100% B, 9.5 min 100% B, 10 min 15% B, 12 min 15% B; flujo: 1 mL/min; vol. inyección: 10 μL. ....	22
<b>Figura 13.</b> Fraccionamiento del extracto orgánico de <i>M. albolutea</i> .....	23
<b>Figura 14.</b> De izquierda a derecha se presentan las Colonia de <i>M. albolutea</i> en medio PDA con 7 días de crecimiento y los cultivos en arroz con 21 días de crecimiento. ....	31
<b>Figura 15.</b> Cromatograma correspondiente al extracto FrMALb registrado en un barrido de λ entre 210–300 nm, gradiente: CH <sub>3</sub> CN (B) y H <sub>2</sub> O ácida (A), 15 % B-100 % B en 5 min, flujo 0.5 mL/min, vol. de inyección 5 μL. En la imagen se presenta el valor de m/z para algunos los picos de interés.....	31
<b>Figura 16.</b> Alboluteina A ( <b>40</b> ) y C ( <b>42</b> ) aisladas del extracto FrMalb (MeOH/CH <sub>3</sub> CN) de <i>M. albolutea</i> . ....	33

<b>Figura 17.</b> Comparación del espectro experimental de DCE correspondiente al compuesto <b>40</b> (punteado negro) con el calculado para los enantiómeros 5aS,8R,15bR,16aR (verde) y 5aR,8S,15bS,16aS (anaranjado). .....	34
<b>Figura 18.</b> Comparación del espectro experimental de DCE correspondiente al compuesto <b>42</b> (punteado negro) con el calculado para los enantiómeros 5aR,8R,15bS,16aR (anaranjado) y 5aS,8S,15bR,16aS (verde). .....	35
<b>Figura 19. (A)</b> Estructura propuesta para la alboluteina B; <b>(B)</b> Comparación del espectro experimental de DCE para el compuesto <b>41</b> (líneas punteadas) con los enantiómeros propuestos 5aS,8S,15bR,16aR (anaranjado) y 5aR,8R,15bS,16aS (azul).....	39
<b>Figura 20.</b> Representación ORTEP obtenida por difracción de rayos X del compuesto <b>43</b> . .....	39
<b>Figura 21.</b> Dominios enzimáticos ArdA y ArdB, propuestos para la biosíntesis de alboluteinas en analogía con la propuesta de Haynes y colaboradores. Pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), Adenosín trifosfato (ATP). Imagen creada en BioRender y ChemDraw.....	41
<b>Figura 22.</b> Curvas de % de I en función de la concentración de los compuestos; cada punto representa tres replicas. Debajo del título se encuentran los valores de $CI_{50}$ . .....	42
<b>Figura 23.</b> Gráficos de la cinética de inhibición correspondiente a la alboluteina C ( <b>42</b> ). <b>(A)</b> Curvas usando las ecuaciones de inhibición no competitiva; <b>(B)</b> Representación gráfica de los parámetros cinéticos; <b>(C)</b> Rectas de dobles recíprocos. ....	43
<b>Figura 24.</b> Interacciones en dos dimensiones entre las alboluteinas A-C, el AU y la PTP1B. En el centro de color naranja se presenta el diagrama de cintas de la PTP1B <sub>1-298</sub> (1T49), en líneas rojas ( <b>40</b> ), verdes ( <b>41</b> ), azules ( <b>42</b> ) y magenta AU; imágenes creadas en PyMOL y Maestro.....	45
<b>Figura 25.</b> Interacciones en dos dimensiones entre las alboluteinas A-C, el AU y la PTP1B. En el centro de color naranja se presenta el diagrama de cintas de la PTP-1B <sub>1-400</sub> (Q9PT91), en líneas color cian ( <b>40</b> ), verdes ( <b>41</b> ), magenta ( <b>42</b> ) y azul AU; imágenes creadas en PyMOL y Maestro. ....	46
<b>Figura 26. (A)</b> RMSD en función del tiempo para los complejos formados PTP1B-alboluteinas y AU; <b>(B)</b> Modelos estructurales entre la PTP1B-alboluteina C durante 100 ns de dinámica molecular...	48
<b>Figura 27.</b> Radar de biodisponibilidad de las alboluteinas A-C, AU y M, representa del rango óptimo (en rosa) para cada propiedad presentada en los ejes; en el centro el modelo de huevo hervido usado para la predicción de permeabilidad GI y BHE; en azul los sustratos de la P-gp, en rojo los compuestos que no serían sustratos de P-gp. Imagen creada por SwissADME. ....	50
<b>Figura 28. (A)</b> Compuesto derivado de la alboluteina B ( <b>41a</b> ), se eliminaron los fragmentos problemáticos (residuo de isopreno y el grupo acetilo); <b>(B)</b> . Radar de biodisponibilidad de <b>41a</b> ....	51
<b>Figura 29. (A)</b> Gráfica de las diferentes fingerprints probadas para la representación de las moléculas en función de la distribución acumulada a partir del coeficiente de Tanimoto; <b>(B)</b> Representación 3D del espacio químico, los puntos grises representan los compuestos depositados en la base de datos BIOFACQUIM, y los puntos negros los 47 inhibidores de la PTP1B. ....	53
<b>Figura 30.</b> Compuestos hit con un valor de $pIC_{50}$ similar al ácido ursólico (AU, 4.66). Debajo del número de identificación para cada compuesto se presenta su valor de $pIC_{50}$ .....	54
<b>Figura 31.</b> Gráficas de Lineweaver-Burk para los compuestos 1L, 3L y 6L.....	56
<b>Figura 33.</b> Interacciones previstas entre ligandos y PTP1B (código AlphaFold: Q9PT91). En el centro, la proteína se muestra en azul (diagrama de listones), el sitio activo en esferas amarillas y los compuestos en líneas: <b>1L</b> en rojo, <b>3L</b> en verde y AU en naranja; Imágenes creadas en PyMOL y Maestro.....	59

<b>Figura 34.</b> Interacciones entre PTP1B (código AlphaFold: Q9PT91) y los isómeros conformacionales de E/Z vermeholtina ( <b>6L</b> ). En el centro, la proteína se muestra en cian (diagrama de cintas); los residuos de la cavidad II están representados en esferas amarillas; los residuos de la cavidad I están en esferas rosas; isómeros de <b>6L</b> en líneas: verde ( <b>6a1L</b> ), rosa ( <b>6a2L</b> ), gris ( <b>6b1L</b> ), morado ( <b>6b2L</b> ), cian ( <b>6a1L</b> ), amarillo ( <b>6a2L</b> ), salmón ( <b>6b1L</b> ) y naranja ( <b>6b2L</b> ); Imágenes creadas en PyMOL y Maestro. ....	60
<b>Figura 35.</b> Representación visual del rango óptimo para cada propiedad presentada en ejes.....	63
<b>Figura 36.</b> Modelo de huevo hervido para predicción de absorción a nivel GI y BBB utilizando SwissADME.....	64
<b>Figura 37.</b> Representación gráfica de algunas de las propiedades toxicológicas estimadas para los compuestos <b>1L–11L</b> . Gráfico de correlación de compuestos según su DL <sub>50</sub> estimada y clase de toxicidad. El tamaño del marcador indica la probabilidad de que un compuesto sea inhibidor de P-gp. El color del marcador se refiere a la puntuación de toxicidad los valores >1 indican subestructuras tóxicas. La forma del marcador indica mutagenicidad alta (círculo), baja (cuadrado) o ninguna (triángulo). Finalmente, el color de fondo del marcador correlaciona la probabilidad de ser una estructura PAINS. ....	65
<b>Figura 38.</b> Representación gráfica de algunas de las propiedades toxicológicas estimadas para los compuestos <b>1L–11L</b> . Gráfico de correlación de compuestos según su DL <sub>50</sub> estimada y clase de toxicidad. El tamaño del marcador indica la permeabilidad de las células CACO-2, relacionada con la absorción in vivo. El color del marcador se refiere a un efecto tumorigénico. El color de fondo del marcador indica teratogenicidad. ....	66
<b>Figura 39.</b> Mapas SAS, similitud estructural en función de la actividad. Debajo del nombre de los ejes se encuentran las ecuaciones usadas para obtener el $\Delta A$ y Tc para cada par de compuestos: i valores o fragmentos asociados al AU; j: valores o fragmentos asociados a un inhibidor de la PTP1B; k, fragmentos compartidos entre j e i.....	67
<b>Figura 40.</b> (A) Mapa SAS, en paréntesis se encuentran el número de pares de compuestos que integran cada zona; (B) Scaffold hops identificados, los valores de similitud y diferencia de actividad de cada compuesto con respecto al AU se muestran debajo de las estructuras .....	67
<b>Figura 41.</b> Activity cliffs identificados en la región ZIV del mapa SAS. Los pares se representan con una línea gris, se resalta en amarillo el valor de similitud molecular. ....	68

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos actuales de la DMT2 (Abbas et al., 2019; Buse et al., 2022; Kerru et al., 2018; Tsapas et al., 2020).....	1
<b>Tabla 2.</b> Fármacos en fase de desarrollo o en uso para el tratamiento de la DMT2 .....	2
<b>Tabla 3.</b> Regiones alostéricas con poco estudiadas en al PTP1B. ....	11
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de inhibición frente a la PTP1B de las fracciones provenientes del extracto de M. albolutea. ....	32
<b>Tabla 5.</b> Datos de RMN obtenidos para la muestra de alboluteina A ( <b>40</b> ), realizada en acetona-d6, <sup>1</sup> H (500 MHz) y <sup>13</sup> C (125 MHz). ....	36
<b>Tabla 6.</b> Datos de RMN obtenidos para la muestra de alboluteina C ( <b>42</b> ), realizada en acetona-d6, <sup>1</sup> H (500 MHz) y <sup>13</sup> C (125 MHz). ....	37
<b>Tabla 7.</b> Datos de RMN obtenidos para la muestra de alboluteina B ( <b>41</b> ), realizada en CDCl <sub>3</sub> , <sup>1</sup> H (700 MHz) y <sup>13</sup> C (175 MHz). ....	40
<b>Tabla 8.</b> Resumen de los resultados in vitro e in silico entre la PTP1B <sub>1-298</sub> y los compuestos aislados de M. albolutea. ....	45
<b>Tabla 9.</b> Resultados del acoplamiento molecular entre la PTP1B <sub>1-400</sub> y las alboluteinas A-C. ....	46
<b>Tabla 10.</b> Parámetros termodinámicos obtenidos después de la dinámica molecular entre las alboluteinas y la PTP1B. ....	47
<b>Tabla 11.</b> Propiedades fisicoquímicas predichas para una de las alboluteinas y el AU .....	51
<b>Tabla 12.</b> Resultados de las cinéticas de inhibición enzimáticos para los compuestos seleccionados .....	55
<b>Tabla 13.</b> Resultados de acoplamiento molecular entre la PTP1B y los compuestos <b>1</b> , <b>3</b> y <b>6</b> . ....	58



## LISTA DE ABREVIATURAS

Las abreviaturas de los aminoácidos se encuentran en forma del código de tres letras

One fungus one name	1FIN
Alfa glucosidasas	AGS
Acetato de etilo	AcOEt
American Type Culture Collection	ATCC
Basic Local Alignment Search Tool BLAST	
Concentración inhibitoria media	CI <sub>50</sub>
Cromatografía en columna abierta	CCA
Cromatografía en capa fina	CCF
Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia	CLUE
Dipeptidilpeptidasa 4	DPP4
Diabetes mellitus	DM
Diabetes mellitus tipo dos	DMT2
Dicroísmo circular electrónico	DCE
DL-ditiotreitol	DTT
Electrospray ionization	ESI
Infrarrojo	IR
Fosfato de <i>para</i> -nitrofenil	pNPP
<i>para</i> -nitrofenol	pNP
Proteínas Tirosina Fosfatasas	PTPs
Proteínas tirosina cinasas	PTPKs
Proteína tirosina fosfatasa 1B	PTP1B
Pain Assay Interference Substances	PAINS
Resonancia magnética nuclear	RMN
Enfermedad causada por el coronavirus SARS-Cov-2	COVID-19
Unidades de absorbancia	uA

## ABSTRACT

This work aimed to discover protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors (PTP1B) from natural products (NPs) to find new lead compounds for developing antidiabetic drugs. The first section of the manuscript described the isolation and identification of three undescribed ardeemins and sartoryglabrin analogs named alboluteins A-C (**41-42**), testing these compounds against PTP1B indicated their inhibitory activity with  $IC_{50}$ 's between 19 to 129 mM, the kinetic analysis revealed that albolutein C possess a non-competitive inhibition, furthermore docking studies of alboluteins A-C into the crystal structure of PTP1B (1T49) and the model built by the algorithm developed for AlfaFold (Q9PT91) revealed that all compounds prefer to bind at allosteric sites of the enzyme; respect to molecular dynamic studies indicated that the active compounds remained tied to the enzyme with decent binding energy.

Regarding the second section of the manuscript, using a small library screening from natural products (NPs) and the *h*PTP1B1-400, allowed identifying 47 NPs that inhibit the enzyme similar to ursolic acid (UA). Encoding the structural features of the database BIOFACQUIM and the 47 active NPs by PubChem fingerprints, this allows the 3D chemical space projection to demonstrate that the selected compounds are chemically diverse and cover most of the explored space.

The eleven most active products showed similar  $pIC_{50}$  values to UA (positive control,  $pIC_{50} = 4.66 \pm 0.004$ ), these compounds were canophyllol (**L1**), 5-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**L2**), 3,4-dimethoxy-2,5-phenanthrenediol (**L3**), masticadienonic acid (**L4**), 4',5,6-trihydroxy-3',7-dimethoxyflavone (**L5**), *E/Z*-vermelhotin (**L6**), tajixanthone hydrate (**L7**) quercetin-3-*O*-(6''-benzoyl)- $\beta$ -D-galactoside (**L8**), lichexanthone (**L9**), melianodiol (**L10**), and confusarin (**L11**). According to kinetic analysis, the inhibition mechanism for **L1** was non-competitive, **L3** mixed, whereas **L6** was competitive. The physicochemical, pharmacokinetic, pharmacodynamics, and toxicity profiles of **L1-L11** were predicted to assess their potential use in drug development. The SAS map, built using the Tanimoto similarity indexes and the absolute value of the PTP1B

inhibitory activity, allowed the identification of three scaffold hops (**L3**, **L5**, and **L6**) with comparable activity to UA.

## INTRODUCCIÓN

El sobrepeso, la falta de actividad física y la mala alimentación son algunos de los factores que predisponen a una persona para el desarrollo de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2). Esta enfermedad es considerada como un desorden metabólico que puede llevar a un deterioro permanente y gradual de la salud, y como la segunda pandemia de este siglo, detrás del COVID-19 (IDF, 2021; Klein et al., 2022; Ning et al., 2022). Existen evidencias demuestran su incesante aumento en nuestro país y muchas las podemos encontrar en los datos reportados en el censo poblacional realizado entre enero y agosto del 2020, donde la tercera causa de muerte, relacionada a problemas de salud, fue la DMT2 con un porcentaje de 14.6 %; solo por arriba de esta afección se encuentran las enfermedades de tipo cardiovascular (20.8 %) y COVID-19 (15.9 %) (INEGI, 2021). Asimismo, los problemas cardiovasculares y el padecimiento de la DMT2 estuvieron estrechamente relacionados al padecimiento de casos graves de COVID-19. Otras fuentes que confirman su creciente prevalencia a nivel mundial las encontramos en las estimaciones realizadas por la Federación Internacional de la Diabetes (FID), recopiladas en el Atlas de la Diabetes, en la edición publica en 2021, en la cual se reportan 536.6 millones de personas con diabetes, 6.7 millones de decesos y una marcada prevalencia entre la población de 20–79 años. En este mismo documento, México ocupa el séptimo lugar entre los diez países con mayor número de personas diagnosticadas, con 14.1 millones de enfermos (FID, 2021). Estas estimaciones, son prueba del problema que deben enfrentan los sistemas de salud a nivel mundial, ocasionado por el costo anual de los tratamientos, entre el 2020 y 2021 en el mundo se gastaron alrededor de 966 billones de dólares para el control de esta enfermedad y sus complicaciones (FID, 2021); cifra sin precedentes.

Todos estos datos apuntan a la necesidad de mejores campañas de prevención y el desarrollo de tratamientos farmacológicos que permitan un mejor control de la enfermedad. A fin de contribuir en este aspecto, este proyecto tiene como objetivo primordial el descubrimiento y/o identificación moléculas de origen natural que inhiban a la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), blanco promisorio para el tratamiento de la diabetes. Esta enzima pertenece a la familia de fosfatasas de tipo PTP, entre sus características se encuentran la

homología del sitio catalítico dentro de la familia y la capacidad de desactivar o activar sustratos mediante la eliminación o adición de un grupo fosfato en residuos de tirosina (Tyr).

La PTP1B está involucrada en la regulación de varios procesos metabólicos, y en el caso específico de la diabetes y la obesidad su regulación se encuentra dañada. Específicamente en la DMT2, la PTP1B se encuentra sobre expresada, lo que ocasiona que el receptor de insulina se encuentre desactivado, por lo tanto, el transporte de glucosa a las células es insuficiente. Si se regular la sobreexpresión de la PTP1B por medio de su inhibición, se mejorará la entrada de la glucosa a los tejidos. Por otro lado, un reto importante en la búsqueda de inhibidores de la PTP1B es el hallazgo de inhibidores alostéricos que presenten menos interacciones con enzimas de la misma familia.

En la sección **5.1** se describe el aislamiento y caracterización química de una serie de tripéptidos de *Malbranchea albolutea* Singler & Carmichael, que mostraron una actividad inhibitoria frente a la PTP1B de acuerdo con los resultados *in vitro* e *in silico*. El hallazgo más sobresaliente del estudio fue la identificación de una familia de moléculas capaces de inhibir de forma alostérica y no competitiva a la PTP1B. Las estimaciones de las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de estos tripéptidos permiten predecir que estas moléculas son susceptibles de ser optimizadas y convertirse en fármacos.

En el mismo contexto, en la sección **5.2** se describen los resultados obtenidos del ensayo de inhibición *in vitro* contra la PTP1B usando una quimioteca de compuestos naturales aislados de plantas medicinales y hongos depositados en el laboratorio 124 de la Facultad de Química, con el propósito de identificar inhibidores que tengan una actividad similar al ácido ursólico. Con los datos generados se realizó la comparación entre el espacio químico formado compuestos aislados de plantas y otros organismos de México y los mejores inhibidores de la PTP1B identificados de la quimioteca. En esta misma sección del trabajo, para los compuestos hit, se describen la cinética de inhibición, sus interacciones con la enzima mediante estudios de acoplamiento molecular, las propiedades ADMET y finalmente la construcción de los mapas de estructura similitud (SAS maps) para identificar núcleos base prometedores o “scaffold hopes”.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Diabetes mellitus (DM)

El término *diabetes* empezó a utilizarse en el siglo I d. de C. por Areteo de Capadocia, refiriéndose a la excesiva eliminación de orina; la adición de *mellitus* fue acuñada por el médico inglés Thomas Willis en 1674, al hacer referencia al color amarillento de la orina, similar a la miel disuelta en agua y con un sabor dulce (Jara et al., 2010). De esta información fue posible inferir que el primer síntoma conocido para la DM enfermedad fue la poliuria.

La Federación Internacional de la Diabetes (FID), define a la DM como una enfermedad crónica que se presenta cuando el cuerpo no produce insulina o no es capaz de utilizarla de forma eficiente (IDF, 2021). Jara y colaboradores (2010) define a la DM como un conjunto de enfermedades metabólicas cuyo común denominador es la hiperglicemia producida por una deficiencia en la secreción y/o acción de la insulina. El estado de hiperglucemia por tiempo prolongado provoca con daño, disfunción y fallo en varios órganos, especialmente los ojos (retinopatía), los riñones (nefropatía), los nervios (neuropatía), el corazón y los vasos sanguíneos (cardiovasculares). La diabetes es una enfermedad que no tiene cura, sin embargo, es posible controlarla con tratamiento farmacológicos y hábitos de vida saludables (IDF, 2021; NIH, 2016a; WHO, 2017).

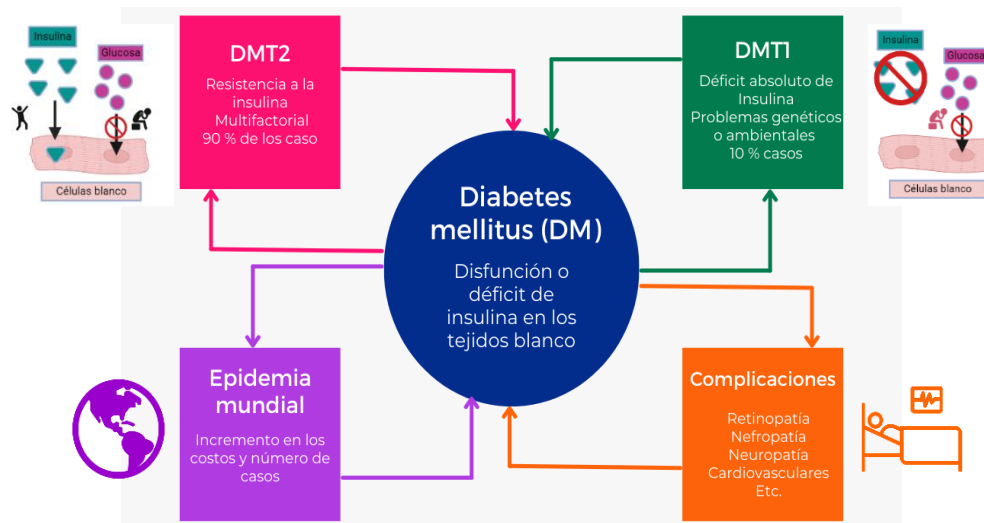
La insulina es una hormona que se sintetiza en las células  $\beta$  pancreáticas; su función primordial es permitir el ingreso de glucosa en las células hepáticas, del musculo esquelético y del tejido adiposo, de tal forma que se produzca energía tras la ingesta de alimentos.

La insulina consiste en dos cadenas peptídicas A y B de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, unidas mediante dos puentes disulfuro entre residuos de cisteína presentes en ambas cadenas. La hormona se aisló primera vez en 1921 por los científicos Banting y Best, sin embargo, su estructura primaria fue elucidada por Sanger y colaboradores en 1951 y su estructura terciaria por Dorothy Hodgkin en 1969 (Jara et al., 2010). En la DM el cuerpo es incapaz de producir insulina o bien la poca cantidad que produce no se utiliza eficientemente. En cualquiera de los dos casos la glucosa permanece en la sangre, provocando un estado de

hiperglucemia crónica, que a largo plazo ocasiona muchos problemas de salud (NIH, 2016). Esta hormona también desempeña un papel esencial en el metabolismo de proteínas y lípidos.

Los nuevos criterios para el diagnóstico de la DM se presentan en la última edición del Atlas de la Diabetes (IDF, 2021) y toman como base los siguientes parámetros clínicos: en ayunas la concentración de glucosa en plasma debe ser  $\geq 126$  mg/dL; después de 2 horas de la ingesta oral de 75 g de glucosa, su concentración debe ser  $\geq 200$  mg/dL y la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA1c)  $\geq 48$  mmol/mol. Finalmente, en la toma aleatoria de glucosa en sangre, la concentración de ser  $\geq 200$  mg/dL. Cabe destacar que el estado de prediabetes se presenta cuando alguno de los parámetros clínicos usados para el diagnóstico de la DM se encuentra ligeramente por arriba del valor de referencia. Las personas pre-diabéticas pueden generar resistencia a la insulina y desarrollar así DM (NIH, 2018).

Existen varios tipos de DM, las más comunes son el tipo 1 (DMT1), el tipo 2 (DMT2) y la gestacional. Otros tipos de diabetes incluyen a las monogénicas y las relacionadas con enfermedades del páncreas o infecciones virales. En la siguiente sección se hablará de forma breve de cada una de ellas, pero se enfatizará sobre la DMT2, por ser la más común.



**Figura 1.** Mapa conceptual de las formas más comunes de diabetes mellitus (IDF, 2021; NIH, 2016a; WHO, 2017).

## 1.2 Diabetes mellitus Tipo 1

Enfermedad que se caracteriza por una deficiencia absoluta de insulina producida por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas por parte de células T; es común en personas genéticamente susceptibles ya que implica la mutación de varios genes relacionados con la síntesis de la insulina; pero también varios agentes ambientales como infecciones virales (hepatitis C, rubéola) pueden provocar la DMT1. Esta afección se puede presentar a cualquier edad, aunque es más común en niños y adolescentes, y en cualquier caso el organismo produce muy poca insulina o ninguna. Su tratamiento implica la inyección diaria de insulina, a fin de mantener la glucosa en sangre en intervalos adecuados, además de un monitoreo constante y hábitos saludables de alimentación.

## 1.3 Diabetes mellitus Tipo 2 (DMT2)

La DMT2 es la forma más común de la enfermedad (90 % del total de los casos de diabetes), y se caracteriza por estados anormales de hiperglucemia, ocasionados por la incapacidad de las células de los órganos blanco de la hormona de responder eficientemente a su acción. Esta incapacidad de respuesta a la acción de la insulina es lo que se conoce como **resistencia a la insulina**, fenómeno que implica en un inicio un estado de hiper-insulinemia, que de mantenerse por mucho tiempo puede originar un daño permanente en las células  $\beta$  (IDF, 2021; Jara Albarrán et al., 2010). Los síntomas más comunes de la DMT2 son poliuria, sed, cansancio, aumento del apetito, y pérdida de peso.

La DMT2 es una de las enfermedades crónicas, no trasmisibles, con mayor prevalencia en la población adulta a nivel global. Así, es una de las primeras cinco causas de muerte en la mayoría de los países desarrollados y una epidemia en muchas naciones en vías de desarrollo. Su constante incremento es el resultado de una serie de factores entre los que encontramos la obesidad, el sedentarismo y una mayor longevidad de la población. El sobrepeso, la falta de actividad física y la mala alimentación son algunos de los factores que predisponen a una persona para el desarrollo de DMT2 (IDF, 2021; Klein et al., 2022; Ning et al., 2022). La

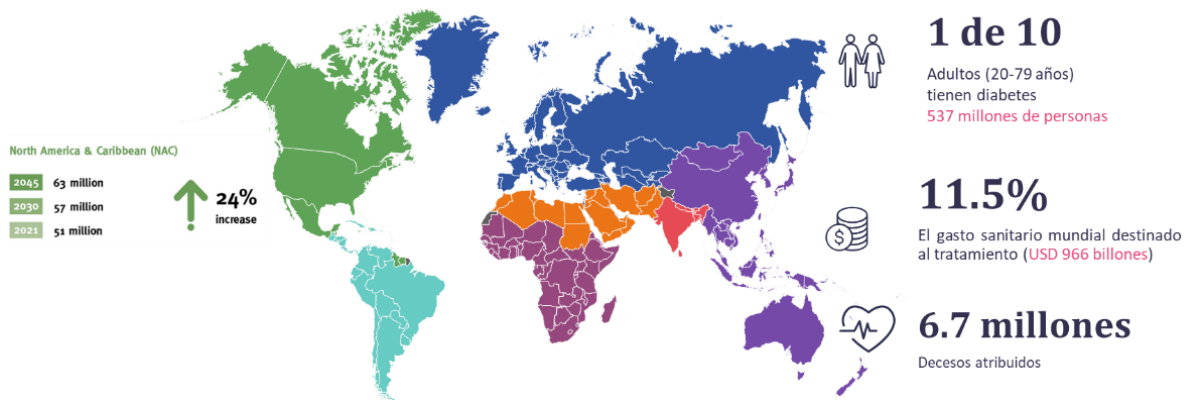


obesidad, en especial aquella que implica la acumulación de grasa visceral y concentraciones altas de triglicéridos provoca un aumento significativo de ácidos grasos libres y glicerol que empeora la resistencia a nivel muscular y hepático (Klein et al., 2022).

Las personas con DMT2 pueden pasar años sin ser diagnosticadas, su padecimiento inicia silenciosamente y cuando aparecen los síntomas ya existe daño en algún órgano o sistema. Los pacientes diagnosticados deben recibir tratamiento de por vida, si se pierde adherencia al mismo se llega a una deficiencia metabólica y la aparición de un mayor número de complicaciones. Desafortunadamente solo una pequeña fracción de los enfermos acude con regularidad a los servicios de salud, y de éstos el 25-40 % muestra apego a su tratamiento farmacológico (Flores, et al., 2021). Las complicaciones de la DMT2 son causa de discapacidad.

Con respecto a la prevención, existen diferentes maneras de prevenir el desarrollo de la DMT2; los más importantes consisten en mantener un estilo de vida saludable, controlar el peso, y realizar actividad física constante. Una vez desarrollada la enfermedad se requiere la farmacoterapia y el control de otros parámetros metabólicos (hipercolesterolemia e hiperlipidemia), y la presión arterial por mencionar los más importantes.

A nivel mundial se espera que el número de personas diagnosticadas con diabetes mellitus incremente en un 46 % en los próximos veinticuatro años. La última estimación de casos confirmados para esta enfermedad se realizó en el año 2021, reportando que cerca de 537 millones de personas entre 20 y 79 años viven con este padecimiento. Tan solo en la región de Norte América y el Caribe (donde se reportan los datos de México, EU y veinte países del Caribe) hay 51 millones de personas diagnosticadas, lo que implica que 1 de cada 7 adultos en esta región tiene DM, ubicándola en la segunda posición entre las regiones con casos confirmados, con una prevalencia del 14 %. De este número de casos, en México hay 14.1 millones de personas que viven con esta enfermedad, colocándolo en el país número siete con incidencia, solo por debajo de Indonesia y Brasil. La DMT2 es la que tiene una mayor incidencia, ya que representa el 90 % de los casos.



**Figura 2.** Panorama mundial de la DM. En verde se presenta la región de América del Norte y el Caribe, para el 2021 se estimó que vivían 51 millones de diabéticos (IDF, 2021).

A nivel nacional, los datos preliminares reportados en julio de 2022 por el INEGI indicaron que la DM fue la tercera causa de defunciones, con un poco más de 142 millones de fallecimientos, distribuidos de manera equitativa entre hombres y mujeres, de esta cantidad el 74.7 % está asociada a la DMT2.

En México en los últimos diez años se ha duplicado la incidencia de obesidad en adultos y triplicado en niños entre 6 y 15 años, lo que da como resultado 35 millones de obesos, de los cuales el 60 % padece DMT2 (Flores, 2021). En la Encuesta Nacional de Salud del 2020 las enfermedades crónicas de mayor impacto fueron la DM, la hipertensión y la obesidad. La prevalencia de la DM fue del 10.6 % y al separarla por sexo, las mujeres presentaron un valor de 11.6 % mientras que en los hombres fue de 9.4 %. Finalmente 4.6 % de los adultos que viven en México desconocen su condición diabética (ENSANUT, 2020).

Aunque existen algunas discrepancias entre los datos del INEGI y de la ENSAT, es evidente el aumento progresivo y acelerado de la DMT2 en México. Esta situación denota un sistema de salud, precario.

## 1.4 Tipos de diabetes mellitus con menor tasa de incidencia

Dentro de este grupo podemos encontrar a la diabetes gestacional, y las relacionadas por alteraciones genéticas en las células  $\beta$ , o del páncreas por acción de algún fármaco o infecciones virales (Flores-Lozano et al., 2021; NIH, 2016).

La diabetes gestacional se caracteriza por una hiperglucemia durante la gestación, en la mayoría de los casos seis semanas después del parto la glucosa alcanza niveles normales. Sin embargo, la madre y el producto son más susceptibles a padecer DMT2 posteriormente.

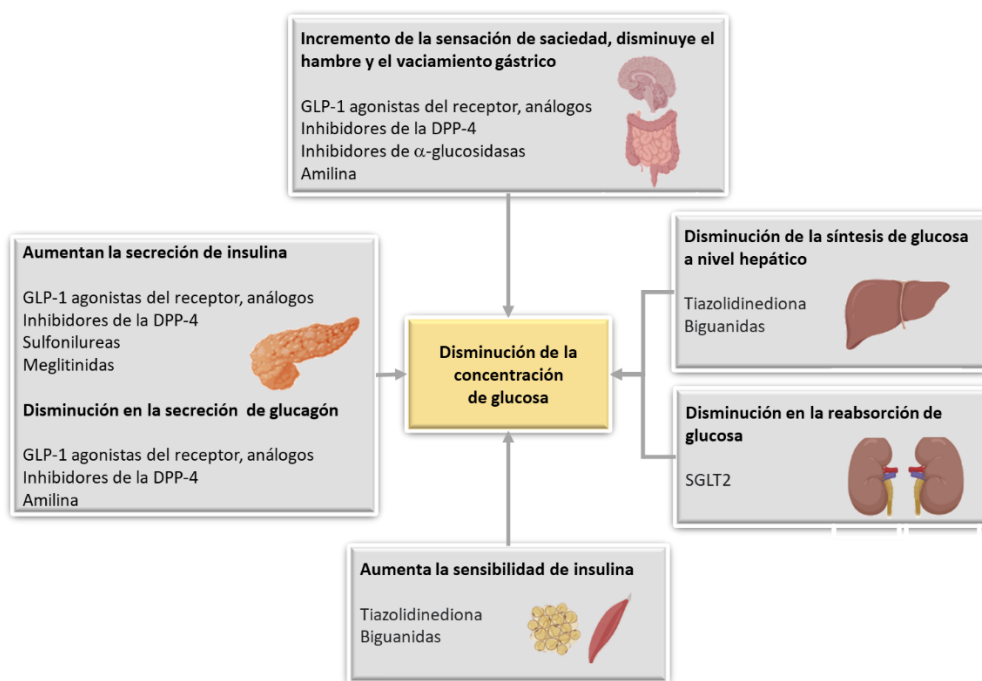
En el caso de las alteraciones genéticas en las células  $\beta$ , están regidas por defectos monogénicos en la función de estas células; se originan por una mutación de uno o varios cromosomas relacionados con la síntesis de la insulina.

Muchas enfermedades pancreáticas pueden propiciar la aparición de la DMT2; las más relevantes son: pancreatitis, carcinoma pancreático, fibrosis quística, hemocromatosis, rubeola, *coxsackie* B y adenovirus; las tres últimas tienen una etiología viral. Finalmente, entre las sustancias que pueden inducir la DMT2 se encuentra el ácido nicotínico, el  $\alpha$ -interferón, la fenitoína, los glucocorticoides, y la pentamidina, por mencionar algunos; estas moléculas modifican la secreción de insulina a través del daño en las células  $\beta$  pancreáticas.

## 1.5 Tratamientos farmacológicos para la DM

En el caso de la DMT1 el objetivo del tratamiento farmacológico con dosis diarias de insulina es mantener los niveles de glucemia lo más próximos a la normalidad, evitando estados de hipoglucemias. Las descompensaciones originadas por la condición de hiperglicemia se pueden controlar con múltiples dosis de insulina por día o el uso de bombas subcutáneas encargadas de su administración (Flores Lozano et al., 2021; Jara Albarrán et al., 2010). Se debe recordar que la secreción de insulina depende de la concentración de glucosa, por lo tanto, su administración debe estar acompañada de un monitoreo constante a lo largo del día (ADA, 2022; Bello-Chavolla et al., 2017; Buse et al., 2022; IDF, 2021; Jara Albarrán et al., 2010).

El tratamiento farmacológico para la DMT2 tiene como objetivo mejorar la secreción de insulina (secretagogos), aumentar su sensibilidad en los tejidos blanco (sensibilizadores), disminuir el ingreso de glucosa a nivel del tubo digestivo, los análogos de incretinas y los que actúan como inhibidores de algún blanco clave en la DMT2; para diabéticos de larga evolución el tratamiento debe ir acompañado del uso de insulina (Angermayr et al., 2010; Buse et al., 2022). En la Tabla 1 y la Fig. 3 se resumen los tratamientos más importantes.



**Figura 3.** Esquemática de fármacos antidiabéticos usados en el tratamiento de la DMT2, se presentan los órganos o tejidos donde realizan su acción; péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4), transportador de glucosa dependiente de sodio 2 (SGLT2) (ADA, 2022; Bello-Chavolla et al., 2017; Buse et al., 2022; IDF, 2021; Jara Albarrán et al., 2010).

**Tabla 1.** Tratamientos actuales de la DMT2 (Abbas et al., 2019; Buse et al., 2022; Kerru et al., 2018; Tsapas et al., 2020).

Efecto	Tipo	Fármacos	Eficacia <sup>1</sup>	Otros efectos benéficos	Efectos secundarios
Sensibilizadores de Insulina	Biguanidas	Metformina	Alta	Bajo costo, PCV <sup>2</sup> , no HP <sup>3</sup>	Náuseas, distensión abdominal, diarrea, Retención de agua, no ofrece PCV <sup>2</sup> , aumento de peso
	Tiazolidinedionas o glitazonas	Pioglitazona, Rosiglitazona	Alta	Bajo costo, no HP <sup>3</sup> ,	
Secretagogos	Sulfonilureas	Glibenclamida, Glipizida, Gliclazida, Glimepirida	Alta	Bajo costo,	En adultos no ofrece PCV <sup>2</sup> , aumento de peso, HP <sup>3</sup>
	Meglitinidas	Repaglinida, Nateglinida	Alta	PCV <sup>2</sup>	Alto costo, aumento de peso, HP <sup>3</sup>
Análogos de incretinas	GLP-1	Exenatida, Liraglutida, Lixisenatida, Albiglutida y Dulaglutida, Semaglutida	Alta	Pérdida de peso, no HP <sup>3</sup> , PCV <sup>2</sup> , evitan VG <sup>4</sup>	Alto costo, náuseas, distensión abdominal, diarrea,
Inhibidores	Dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4)	Sitagliptina, Vildagliptina, Saxagliptina, Linagliptina, Alogliptina, Gemigliptina	Intermedia	Pérdida de peso, no HP <sup>3</sup> , evitan VG <sup>4</sup>	Alto costo, infecciones urinarias, cefalea y faringitis.
	α-glucosidasas	Voblibosa, acarbosa	Intermedia	Disminución en la absorción de carbohidratos	Hinchazón y flatulencias
	Transportador glucosa dependiente de sodio tipo 2 (SGLT2)	Dapagliflozina, Canagliflozina, Empagliflozina	Intermedia	PCV <sup>2</sup> , HP <sup>3</sup> , eliminación renal de glucosa	Alto costo, infecciones urinarias y genitales.

<sup>1</sup>con respecto a la metformina para la reducción de HbA1c, <sup>2</sup>PCV, protección cardiovascular, <sup>3</sup>HP, hipoglucemia, <sup>4</sup>VG, vaciamiento gástrico

## 1.6 Tratamientos novedoso de la DMT2

El incremento mundial de personas con DMT2 y la resistencia que se puede desarrollar por el uso prolongado de los tratamientos farmacológicos de primera línea (metformina) provoca la necesidad constante del desarrollo de nuevo fármacos; en este contexto es constante el desarrollo o descubrimiento de moléculas que interaccionen con los blancos terapéuticos tradicionales relacionados con el tratamiento de la DMT2, algunos ejemplos se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** *Fármacos de última generación o en fase de desarrollo para el tratamiento de la DMT2*

<b>Nombre</b>	<b>Desarrollador</b>	<b>Blanco de acción</b>
Albiglutida	GlaxoSmithKline	Agonista de GLP1
Dulaglutida (LY2189265)	Eli Lilly	Análogo de GLP-1
Omarigliptina (MK-3102)	Merck & Co.	Inhibidor de la DPP-4
Succinato de trelagliptina (SYR-472)	Farmacéutica Takeda y Furiex	Inhibidor de la DPP-4
Empagliflozin (BI10773)	Boehringer Ingelheim and Eli Lilly	Inhibidor del SGLT2
Invokana (canagliflozin)	Johnson & Johnson	Inhibidor del SGLT2
Aleglitazar	Roche	Activador de PPAR $\alpha/\gamma$
Atrasentan	AbbVie	Agonista del receptor endotelina A

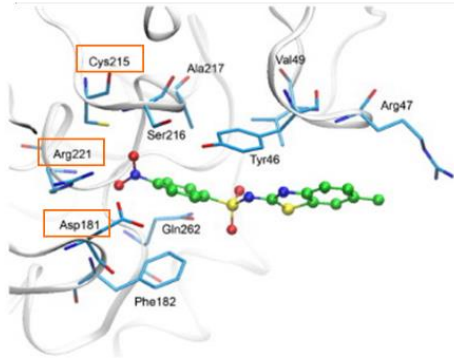
Por otro lado, a medida que se conoce más la fisiopatología de la enfermedad surgen nuevos blancos para el tratamiento de la DMT2, incluyendo algunas enzimas como la deshidrogenasa 11- $\beta$ -hidroxiesteroide, la glutamina fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT), y la proteína tirosina fosfatasa (PTP1B). Además algunos receptores como los de ácidos grasos libres (FFA 1–3), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), gamma activados por

proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), y de glucocorticoides han cobrado gran interés (Demir et al., 2021; Kanwal et al., 2022). El blanco terapéutico seleccionado en este trabajo con la finalidad de descubrir agentes potenciales antidiabéticos fue la PTP1B.

### **1.7 Generalidades de las Proteínas tirosinas fosfatasas (PTP)**

Las proteínas tirosina fosfatasas pertenecen a una familia de enzimas encargadas de realizar la desfosforilación en residuos de tirosina, con la finalidad de regular procesos celulares esenciales, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, el metabolismo, y la apoptosis, por mencionar los más importantes. Los defectos en su expresión están relacionados con enfermedades como el cáncer, la diabetes y la obesidad (Pulido, 2016; Singh et al., 2022). En el cuerpo humano se sabe que más de 100 genes codifican para la expresión de algún tipo de PTP.

Las PTPs presentan diferencias estructurales con las fosfatasas de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr), principalmente en la región del dominio catalítico, donde se encuentra un asa formada por un arreglo tipo CxxxxxR, donde C es la Cys catalítica, x cualquier aminoácido y R, una Arg; en el caso específico de la PTP1B los aminoácidos encargados de realizar el proceso de desfosforilación son Cys215, Arg221 y Asp181, también conocida como triada catalítica, Fig. 4. Las PTPs se dividen en cuatro tipos (I–IV): las pertenecientes al tipo I–III se caracterizan por la presencia del arreglo CxxxxxR, mientras que las PTPs que pertenecen al tipo IV cuentan con la presencia varios residuos de ácido aspártico (Asp27 y Asp25) encargados de la eliminación del grupo fosfato (Seifried et al., 2014).



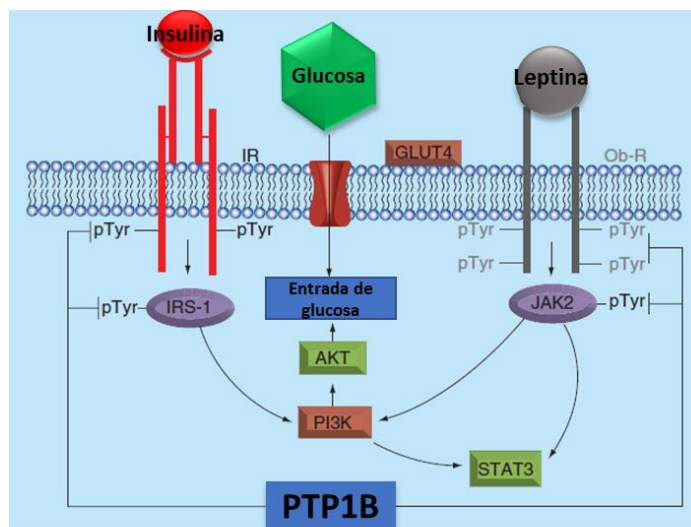
**Figura 4.** Aminoácidos que integran la cavidad catalítica de la PTP1B y su interacción con un derivado de 2-arilsulfonilaminobenzotiazoles, en anaranjado se indica la triada catalítica encargada del proceso de desfosforilación, imagen tomada de (Navarrete-Vazquez et al., 2009).

### 1.7.1 Proteína tirosina fosfatasa 1B

La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) es una PTP clásica, no receptora, tipo I, y el gen que codifica para su expresión en el cuerpo humano es el PTPN1. La PTP1B desempeña un papel importante en la regulación negativa (desactivación) de los receptores de insulina y leptina (Fig. 5), relacionados con la DMT2 y la obesidad, (Casertano et al., 2022; Liu et al., 2022; Ning et al., 2022; Singh et al., 2022).

En el caso de la leptina al unirse a su receptor (Ob-R) transfiere un grupo fosfato a JAK cinasa 2 (JAK2) activándola y desencadenando la transducción de señales que involucra al factor de transcripción 3 (STAT) hasta su translocación en el núcleo, originando una disminución en las enzimas encargadas de la síntesis de ácidos grasos y un aumento en su  $\beta$  oxidación (Cho, 2013; Johnson et al., 2002). Otra función relevante de la PTP1B es la desfosforilación de los receptores de insulina (IR) y sus sustratos (IRS), que tiene como efecto la modificación en la cascada de señalización de las fosfoinositol 3-cinasas (PI3K) y las proteínas cinasa B (AKT), lo que ocasiona una disminución de la traslocación de transportador de glucosa 4 (GLUT4). Por lo tanto, la inhibición de la PTP1B implicaría un aumento en la entrada en glucosa a los tejidos blanco (Cho, 2013; Johnson et al., 2002).





**Figura 5.** Mecanismos de acción que involucran a la PTP1B, receptor de insulina y receptor de leptina, imagen tomada de (Qian et al., 2016).

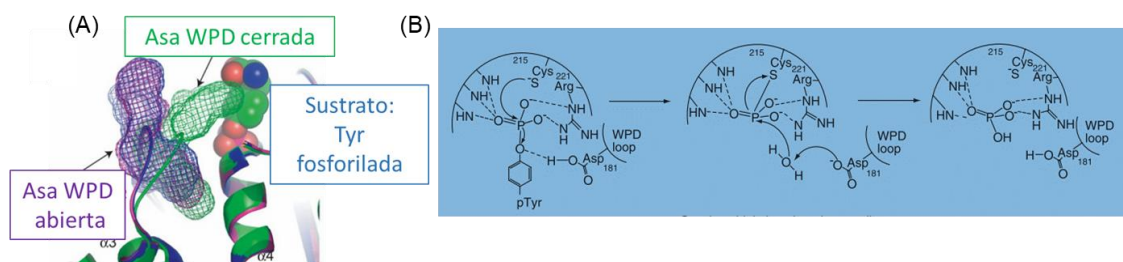
La PTP1B fue aislada por primera vez en 1988 de tejidos de placenta humana (Tanks et al., 1988), y la primera estructura cristalina se reportó en 1994 por Tonks y colaboradores (PDB: 2HNP); las estructuras depositadas en el PDB, incluyen únicamente al dominio catalítico (1–321). El sitio catalítico en este dominio está localizado en la base de una hendidura poco profunda, y presenta una alta especificidad de sustratos. Este dominio también presenta zonas que se encargan de su regulación y/o anclaje a membranas celulares del retículo endoplasmático.

La PTP1B de *homo sapiens*, es un monómero formado por tres regiones: el *N*-terminal donde se encuentra el dominio catalítico (1–300), una región de regulación (301–400) y finalmente la región *C*-terminal, que juega un papel de anclaje y regulación (401–435). Hasta la fecha no se cuenta con una estructura cristalina que contenga a todos los aminoácidos de su estructura primaria (1–435); de manera breve se describirán las tres regiones se encuentran en el PTP1B.

La región *N*-terminal (1–300), está formada por ocho hélices  $\alpha$  y doce hebras  $\beta$ , diez de las hebras forman una lámina  $\beta$  con regiones paralelas y antiparalelas, confiriéndole una estructura central retorcida. El sitio catalítico está integrado por dos asas, un arreglo distintivo

de las PTP tipo I y un residuo de Tyr; la primera asa contiene a Asp181 (WPD loop), y la segunda a Gln262 (Q loop). En el arreglo distintivo de las PTP tipo I se encuentra en el motivo CxxxxxR, que contiene Cys215, es esencial para la reacción de desfosforilación. Finalmente, tenemos al residuo de Tyr46 (pTyr) que juega un papel importante al regular la entrada de los sustratos al sitio activo, realizando una función de reconocimiento de Tyr fosforiladas en sitios específicos de las moléculas blanco (Liu et al., 2022; Pulido, 2016; Singh et al., 2022).

La reacción involucrada en la eliminación del grupo fosfato se encuentra completamente elucidada para las PTP, y se realiza en dos pasos: (i) primero, el ataque nucleofílico del S<sup>-</sup> (Cys215) al grupo fosfato en los sustratos y la pérdida de un protón de Asp181, generando una molécula de sustrato estable y un complejo Cys215-S<sup>-</sup>-PO<sub>3</sub><sup>-2</sup>; (ii) posteriormente, el grupo fosfato unido a la Cys215 sufre un ataque nucleofílico por una molécula de agua, regenerando al nucleófilo en Cys215, y Asp181 recupera su protón, liberándose una molécula de HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>. De esta forma el sitio catalítico queda listo para recibir otra molécula de sustrato; el último intercambio de protones se ve favorecido gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre Gln262 o Arg221 y la molécula de agua que realiza el segundo ataque nucleofílico (Pulido, 2016; Tonks, 2003). Antes de la entrada del sustrato al sitio catalítico el asa WPD adopta una posición que permite su ingreso; una vez iniciada la reacción el asa WPD se cierra, disminuyendo la distancias entre el sustrato y los aminoácidos encargados de realizar la catálisis enzimática (SarathKumar and Lakshmi, 2019; Wiesmann et al., 2004).



**Figura 6.** (A) Cambio conformacional en el asa WPD antes (morado) y después (verde) de la unión del sustrato (Wiesmann et al., 2004). (B) Secuencia de reacciones en el sitio catalítico de la PTP1B (Qian et al., 2016).

A pH fisiológico la Cys215 en la PTP1B se mantiene en forma aniónica; sin embargo, ante cambios drásticos de pH, se realiza una *S*-nitrosilación, mediada por el óxido nítrico celular (Chen et al., 2008), fin de evitar la oxidación permanente del aminoácido y su inactivación de forma irreversible (Sharma et al., 2020).

La región de regulación (301–400) es una zona rica en prolina y serina que participan en la interacción con la PTK y sustratos de la PTP1B. Por último, la región *C*-terminal (401–435) está formada por aminoácidos hidrofóbicos, encargados en su mayoría, del anclaje de la proteína a la membrana del retículo endoplasmático; también se le asocia a la capacidad de regular la catálisis mediante fosforilación o desfosforilación de residuos de Ser y Thr. El primer modelo completo de la PTP1B se obtuvo mediante AlphaFold que es un algoritmo de inteligencia artificial (IA) para la predicción de estructuras de proteínas (Jumper et al., 2021).



**Figura 7.** Diagrama de cintas correspondiente al dominio catalítico de la PTP1B (PDB: 2HNP), se señalan las zonas con los aminoácidos que intervienen en la eliminación de los residuos de fosfato. Imagen creada en Chimera (Pettersen et al., 2004).

AlphaFold, es un algoritmo de acceso libre que permite la predicción de estructuras secundarias y terciarias de proteínas, basado en la información estructural del PDB y fue creada por la colaboración entre la industria privada (Google DeepMind) y centros de investigación (Laboratorio Europeo de Biología Molecular-Instituto Europeo de Bioinformática, EMBL-EBI) (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2021). Entre las estructuras depositadas en la base de datos de AlphaFold se encuentra la de la PTP1B con todos los aminoácidos que integran a su estructura primaria (1–435) (Varadi et al., 2021). Las estructuras depositadas en esta base de datos fueron generadas usando métodos híbridos, caracterizados por emplear todos los datos experimentales y teóricos disponibles, así como los avances en inteligencia artificial (IA). El modelo de la PTP1B depositado en AlphaFold predice para la región C-terminal una región intrínsecamente desestructurada que va de His246-Leu403 y una  $\alpha$ -hélice formada a partir de Ser404 hasta Asn434.



**Figura 8.** Diagrama de cintas para el modelo depositado en AlphaFold correspondiente a la PTP1B<sub>1-435</sub> (Q9PT91), en amarillo se presentan las hebras  $\beta$ , morado las hélices  $\alpha$ , en cian asas o regiones intrínsecamente desestructuradas; en esferas se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos encargados de la reacción de desfosforilación. Imagen creada en Chimera (Pettersen et al., 2004).

### 1.7.2 Inhibición en la PTP1B

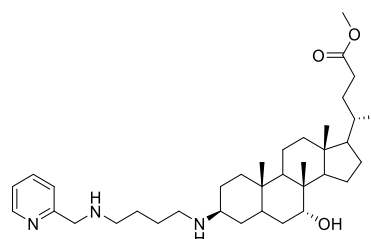
Existen dos tipos de cavidades en donde se puede llevar a cabo la inhibición de la PTP1B: las primeras incluyen al sitio activo de la enzima y tres regiones aledañas; las segundas son regiones alostéricas.

Dentro de la primera clasificación encontramos a las cavidades cercanas al sitio activo que se caracterizan por alojar sustratos fosforilados de Tyr, pero incapaces de realizar la reacción de desfosforilación (cavidades B, C y D). Algunas de las desventajas que presenta la interacción con las cavidades B y C son los residuos que las forman, ya que tienen una gran homología con otros tipos de PTPs; además la interacción con las cavidades B-D siempre implica una interacción con algún aminoácido del sitio activo de la enzima. En la cavidad D, la presencia de la Lys120, crea una región atractiva para el diseño de inhibidores selectivos. De forma general, los inhibidores de tipo I, son inespecíficos, competitivos y muchos de ellos son compuestos miméticos de fosfotirosinas.

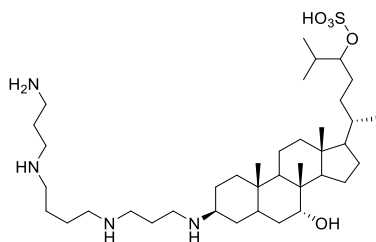
El segundo tipo de inhibidores interactúan con regiones alejadas del sitio catalítico de la PTP1B (alostéricas); sus residuos tienen una menor homología con las de otras PTPs, convirtiéndose en zonas de interacción prometedoras para el desarrollo de inhibidores más selectivos, y promisorios para el desarrollo de fármacos. La región alostérica con más estudios en la PTP1B se encuentra en la región C-terminal a 20 Å del centro catalítico, es hidrofóbica y está integrada por tres hélices;  $\alpha 3$  (Glu186-Glu200),  $\alpha 6$  (Ala264-Ile281) y  $\alpha 7$  (Ser285-Ser295). Cuando un inhibidor se coloca en medio de las tres hélices genera un cambio conformacional en la  $\alpha 7$  bloqueando al asa WPD dejando completamente inactiva a la PTP1B. En un estudio publicado por Yang y colaboradores demostraron que los compuestos con inhibición en esta zona son 100 veces más selectivos a la PTP1B que a su homóloga más cercana, la proteína tirosina fosfatasa de linfocitos (TCPTP). En el PDB (1T48, 1T49 y 1L8K) se encuentran depositadas estructuras co-cristalizadas con inhibidores de tipo benzofurano que interactúan en esta región, Fig. 9 (Hongdusit and Fox, 2021; Shinde and Sobhia, 2013; Wiesmann et al., 2004).

Otra de las regiones alostéricas se encuentra en las hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  (Gly220-Arg236), uno de los compuestos que interacciona esta región es la trodusquemina (Fig. 9), que se coloca dentro de la zona formada por las hélices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 9$ , lo que origina un cambio en la  $\alpha 7$ , además la inhibición de la PTP1B se ve potenciada por la unión de dos moléculas de este aminoesterol (Krishnan et al., 2014). Es importante mencionar que la trodusquemina alcanzó la etapa II de estudios clínicos; sin embargo, debido a su pobre adsorción sus estudios clínicos no continuaron. En la actualidad el compuesto DPM-1001 (compuesto derivado de la trodusquemina, Fig 9) presenta un mecanismo de inhibición parecido al de su predecesor y se encuentra en estudios preclínicos.

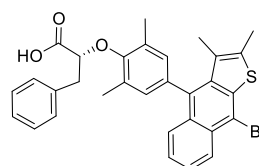
IONIS-PTP-1B<sub>Rx</sub> Secuencia complementaria de ADN (Fase II (continua))



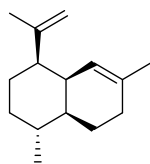
(1) DPM-1001, preclínico (continua)



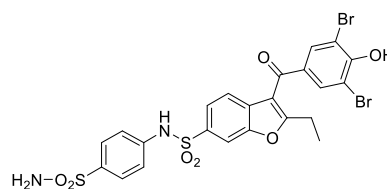
(2) Trodusquemina, Fase I (descontinuado)



(3) Ertiprotafib, Fase II (descontinuado)



(4) Amorfadieno, preclínico (continua)



(5) Derivado de benzofurano bromado, preclínico (descontinuado)

**Figura 9.** Ejemplos de Inhibidores alostéricos de la PTP1B. Dentro del paréntesis de encuentra su estado actual de estudio.

Finalmente algunas posibles zonas de inhibición alostérica con pocos estudios se resumen en al siguiente Tabla 3 (Krishnan et al., 2014; Kumar et al., 2018).

**Tabla 3.** Regiones alostéricas con poco estudiadas en al PTP1B.

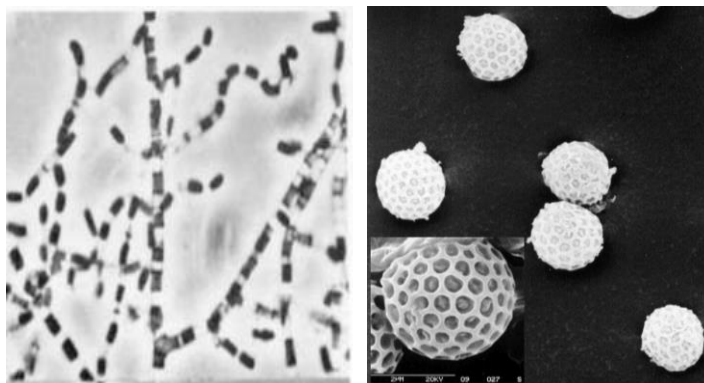
<b>Aminoácidos involucrados</b>	
Asa Ser201-Pro210, hélices Pro188-Glu200 y Gly220-Arg238, hebra $\beta$ Gln78-Thr84	Hebra $\beta$ Gln78-Thr84 y lazo Ser201-Pro210
Hélice Pro188-Glu200, hebras $\beta$ Gln78-Thr84, Leu140-Ile149 y Tyr153-Asn162	a 8.1 Å de Cys215: Try 124, His214 y Cys121 C-terminal: His320-Phe327 ( $\alpha 8'$ ) y Gly360-Gly377 ( $\alpha 9'$ )

### 1.8 Antecedentes sobre *Malbranchea albolutea*

La especie fúngica utilizada en el presente estudio fue *Malbranchea albolutea* Sigler & J.W.Carmich. [Onygenaceae; syn. *Auxarthron alboluteum* Sigler & Hambleton], aislada de una muestra proveniente de un suelo no especificado del Estado de Utah, Estados Unidos de América del Norte. La primera descripción de esta especie la realizó Sigler en 1979, quien la ubicó en la familia Myxotrichaceae; sin embargo, estudios genéticos posteriores revelaron que pertenecía a la familia Onygenaceae (Sigler L. 1979; Sigler et al., 2002).

*Malbranchea albolutea* tiene una forma asexual (anamorfo) que se descubrió en 1882 y un estado sexual (teleomorfo), que fue descrito por Hambleton en 1963, quien lo designó como *Auxarthron alboluteum* Sigler & Hambleton (Fig. 10). De acuerdo a las recomendaciones del Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas, se sugiere el uso de un solo nombre sin importar su estadio sexual, teniendo más peso aquel usado por primera vez. El nombre oficial para esta especie es *Malbranchea albolutea* Sigler & J.W.Carmich. (ATCC: 34522).





**Figura 10.** Derecha, *M. albolutea*, hifas segmentadas para la formación de arthroconidios; izquierda, *A. alboluteum* ascosporas (Sigler et al., 2002; Sigler L., 1976).

Las colonias de *M. albolutea* son de color amarillo o marfil, extensas, pero bien localizadas, alcanza un estadio asexual en el día 14 de crecimiento, cuando forma una red de hifas conectadas y forma ascosporas globosas u ovaladas. Desde etapas tempranas de crecimiento se observa la formación de arthroconidios cilíndricos (Fig. 10). Los cultivos preservados por más de seis semanas se caracterizan por formar estructuras esféricas, con paredes irregulares de color café (Webster J., 2007).

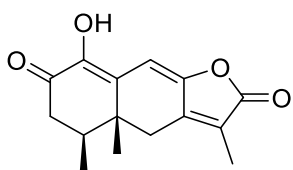
Los hongos pertenecientes al género *Malbranchea* se consideran de tipo queratolíticos, y además de *M. albolutea*, existen otras trece especies (*M. californiensis* (G.F. Orr & Kuehn) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano, *M. chinensis* (Z.F. Zhang & L. Cai) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. chlamydospora* Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. compacta* (G.F. Orr & Plunkett) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. concéntrica* Rodr.-Andr., Stchigel & Cano, *M. conjugata* (Kuehn) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. guangxiensis* (Z.F. Zhang & L. Cai) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. longispora* Rodr.-Andr., Stchigel & Cano, *M. ostraviensis* (Hubka) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. pseudauxarthron* (G.F. Orr & Kuehn) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano, *M. umbrina* (Boud.) Rodr.-Andr., Cano & Stchigel, *M. zuffiana* (Morini) Rodr.-Andr., Stchigel & Cano, y *M. filamentosa* Sigler & J.W. Carmich.). Todas se caracterizan por la formación de arthroconidios estrechos, regulares y alternados; su morfología se encuentra estrechamente relacionada con la de los Hifomicetos, porque en su forma asexual poseen hifas fértiles. El estado sexual de la mayoría de las especies pertenecientes a este género se encuentra en los géneros *Myxotrichum* y *Auxarthron*. La morfología y el color son



características importantes para distinguir las especies pertenecientes al género *Malbranchea*., ya que el tamaño de los arthroconidios entre una especie y otra varía muy poco.

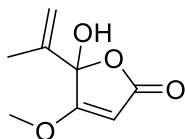
### 1.8.1 Compuestos asilados de la especie *Malbranchea*

Los hongos de la especie *Malbranchea* son una fuente prolífica de compuestos con amplias actividades biológica y estructuralmente diversos, de ahí que en nuestro grupo de trabajo se ha llevado a cabo el estudio químico de varias especies pertenecientes a este género. En la Fig. 11 se resumen algunos de los compuestos aislados de los hongos pertenecientes al género *Malbranchea* y su actividad biológica.

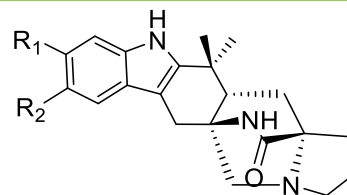


(6) 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olido

Citotóxicos (Martínez-Luis et al., 2005)



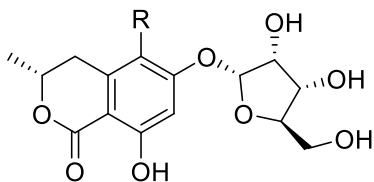
(7) ácido penicílico



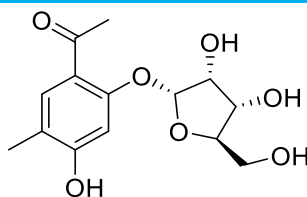
(8) Malbranqueamida  $R_1 = Cl, R_2 = Cl$   
(9) Malbranqueamida B  $R_1 = Cl, R_2 = H$

Inhibidores de calmodulina y vaso relajantes (Figuroa et al., 2011; Madariaga-Mazón et al., 2015; Martínez-Luis et al., 2006a, 2006b)

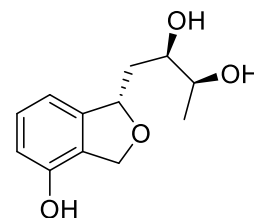
*M. aurantica*



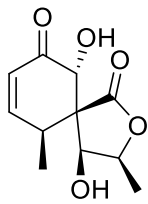
(10) Flavoroseido,  $R = OH$   
(11) Flavoroseido, B  $R = Cl$



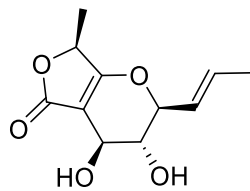
(12) 4-hidroxi-2-O-α-ribofuranosil-5-metilacetofenona



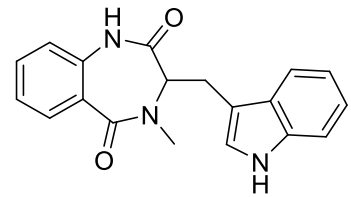
(13) Riboxilarinol B



(14) Rosigenina



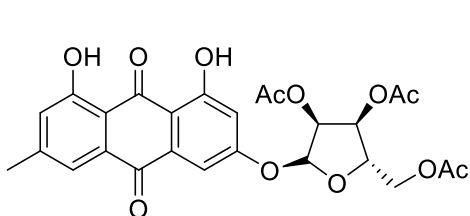
(15) Massarilactona B



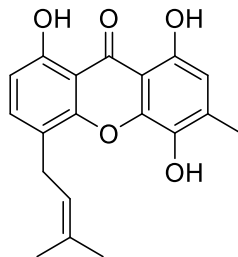
(16) (S)-3,4-dihidro-3-(1H-indol-3-ilmetil)-4-metil-1H-1,4-benzodiazepina-2,5-diona

Compuestos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas (Rebollar-Ramos et al., 2018; Verastegui-Omaña et al., 2017)

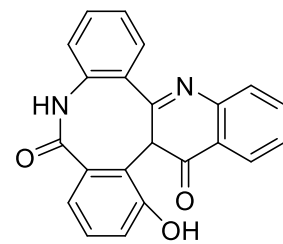
*M. flavorosea*



(17) glucósido de antraquinona



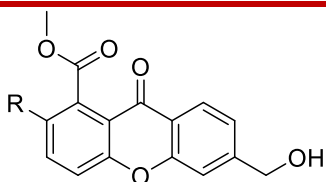
(18) 4-isoprenilravenelina



(19) Derivado de ácido antranílico

Inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas y de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) (Rangel-Grimaldo et al., 2020)

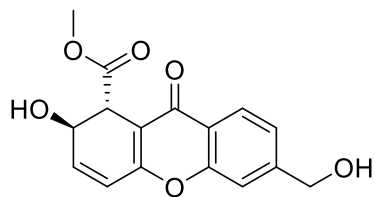
*M. circinata*



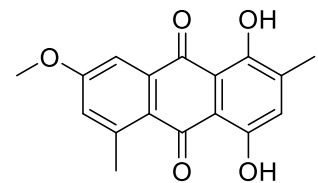
(20) Sydownin A, R = H,

(21) Sydownin B, R= OH

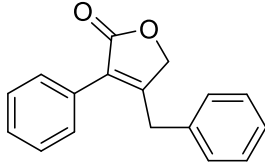
Inhibidor de PTP1B



(22) AGI-B4

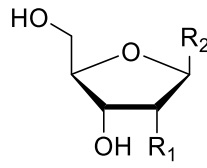


(23) Eritroglauцина

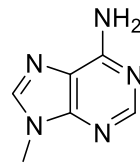


(24) Gimnoascolida A

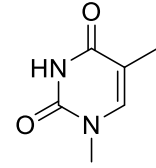
Inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas



R<sub>1</sub>



R<sub>2</sub>



R<sub>2</sub>

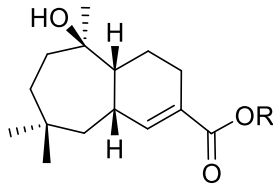
(25) Deoxiadenosina, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = H,

(27) Tiamina, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = H,

(26) Adenosina, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = OH

(28) Uridina. R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> = OH

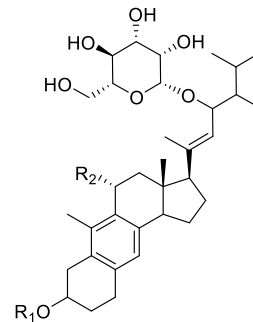
*M. dendrítica* (Rebollar-Ramos et al., 2021)



(29) Malfilanol A, R = H

(30) Malfilanol B, R = CH<sub>3</sub>

Antifúngicos y citotóxicos (Wakana et al., 2009, 2008)



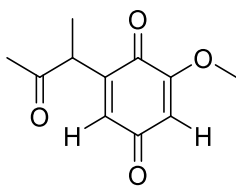
(31) Malsterosido A, R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H

(32) Malsterosido B, R<sub>1</sub> = N-acetil-D-glucosamina, R<sub>2</sub> = H

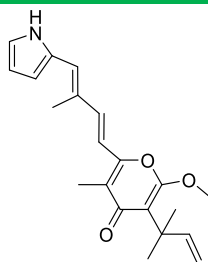
(33) Malsterosido C, R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH

Citotóxicos (Wakana et al., 2014)

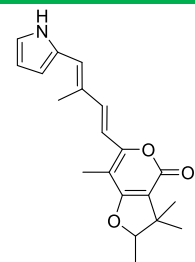
*M. filamentosa*



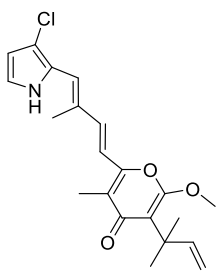
(34) Malbrancina



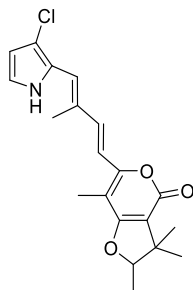
(35) Malbranpirrol A



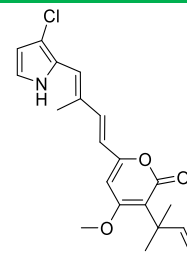
(36) Malbranpirrol B



(37) Malbranpirrol C



(38) Malbranpirrol D



(39) Malbranpirrol E

Compuestos citotóxicos en líneas cancerígenas y antimicrobiano (Chiung et al., 1993; Han et al., 2013; Yang et al., 2009)

*M. cinnamomea*

**Figura 11.** Compuestos con actividad biológica reportados en diversas especies del género Malbranchea.

Además, algunos de los hongos de esta familia son excelentes productores de enzimas capaces de hidrolizar celulosa y hemicelulosa; en el caso específico de *M. flava* y *M. cinnamomea* son excelentes productoras de xilanasas, muy cotizadas en la industria para la hidrólisis de celulosa modificada y hemicelulosa. Los estudios sobre estas especies se han centrado en la caracterización de los genes que codifican para la expresión de las proteínas productoras de xilanasas (Sharma et al., 2016). *M. cinnamomea* produce cutinasas empleadas para la producción de butil-butirato, compuesto empleado como combustible renovable, capaz de sustituir al diésel comercial y como una fuente de lignocelulosa (Duan et al., 2017).

Es importante resaltar que varios de los compuestos aislados de hongos pertenecientes a este género, han presentado actividad inhibitoria frente a blancos relacionados con el tratamiento de la DMT2, en especial  $\alpha$ -glucosidasas y la PTP1B. Tomando en cuenta este antecedente hemos continuado con el estudio de una especie poco estudiada dentro de este género, *M. albolutea*, como fuente de inhibidores de la PTP1B.

## 2. HIPÓTESIS

2.1 *Malbranchea albolutea* es una fuente importante de inhibidores de la PTP1B susceptibles de aislarse de sus medios de cultivo y micelio correspondientes.

2.1 La búsqueda de compuesto dentro de una quimioteca de productos naturales permitirá el descubrimiento de productos líderes inhibidores PTP1B, de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes antidiabéticos

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General

Descubrir nuevos inhibidores de la enzima PTP1B a partir de la especie *Malbranchea albolutea* y de una quimioteca de productos naturales, con la finalidad de contribuir al desarrollo de fármacos útiles para el tratamiento de la diabetes.

### 3.2 Objetivos específicos

1. Cultivar en pequeña escala *M. albolutea* utilizando diferentes condiciones, con la finalidad de preparar los extractos que serán sujetos a las evaluaciones preliminares para detectar su actividad potencial sobre la enzima PTP1B.

2. Determinar el efecto de los extractos fúngicos sobre la actividad de la enzima utilizando los protocolos estandarizados en el grupo de trabajo. Esta actividad permitirá seleccionar las mejores condiciones de cultivo para obtener los compuestos bioactivos.

3. Aislar y caracterizar los principios activos de la especie fúngica a partir de cultivos realizados en mediana escala. Se utilizarán los procedimientos adecuados de fraccionamiento,

separación y purificación de compuestos orgánicos. Este proceso se realizará de manera biodirigida utilizando los ensayos enzimáticos como prueba monitora.

4. Establecer la estructura molecular de los principios activos mediante la aplicación de los métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y químicos que se requieran.
5. Identificar moléculas de una quimioteca de productos naturales obtenidos de plantas medicinales mexicanas y hongos que inhiban a la PTP1B utilizando el mismo ensayo enzimático indicado en el inciso 1.
6. Establecer huellas digitales moleculares de las moléculas activas y su espacio químico con el fin de identificar nuevas moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos antidiabéticos.
7. Realizar los estudios de cinética enzimática de los compuestos activos para establecer la naturaleza del efecto inhibitorio.
8. Realizar estudios de acoplamiento y dinámica molecular para predecir el sitio de unión a la enzima y la estabilidad de los complejos enzima-producto activo.
9. Predecir las propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas, y toxicológicas determinantes en el desarrollo de las fases preclínicas de un fármaco potencial.

## 4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### Procedimientos generales

Los espectros en el IR se registraron por la técnica de reflectancia en un espectrofotómetro (PerkinElmer®) Modelo II. El registro de los espectros de dicroísmo circular electrónico (DCE) se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-1500, utilizando MeOH como disolvente.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron en los equipos Bruker Avance III HD, 700 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 175 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) y/o Bruker BioSpin GmbH 500, 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) en cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) o metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y usando tetrametilsilano (TMS) como referencia.

Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un equipo AccuTOF-DART-JMS-T100LC (JEOL®) utilizando la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (EM-ESI<sup>+</sup>).

Los análisis por cromatografía de líquidos de ultra resolución (ULPC, por sus siglas en inglés) se realizaron en un cromatógrafo Acquity UPLC-H Class® marca Waters equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA) acoplado a un detector de masas de cuadrupolo simple (SQD2) utilizando la técnica de ionización por electrospray en los modos positivo y negativo (ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup>). Los análisis se realizaron en una columna Acquity BEH C<sub>18</sub> (1.7  $\mu\text{m}$ ; 2.1  $\times$  100 mm), la fase móvil utilizada fue un gradiente entre ácido fórmico al 0.1% (**A**) y CH<sub>3</sub>CN (**B**), con un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 3 mL. Las condiciones de análisis en el detector SQD2 fueron las siguientes: voltaje capilar de 2.0 kV (ESI<sup>-</sup>) y 2.5 kV (ESI<sup>+</sup>); voltaje de cono 30 V; temperatura de solvatación 400°C; gas de solvatación nitrógeno (N<sub>2</sub>) 650 L/h; gas cono 10 L/h.

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución de tipo analítico y/o preparativo (HPLC, por sus siglas en inglés) se realizaron en un cromatógrafo marca Waters equipado con una bomba 2535, un detector PDA 2998, un detector de dispersión de luz evaporativo 2424 (ELSD) y un recolector de fracciones automático 2707, empleando las

columnas XBridge Shield RP-C<sub>18</sub> [(5 mm; 4.6 × 250 mm) y/o (5 mm; 19.0 × 250 mm)]. La elución se realizó con diferentes gradientes con una mezcla binaria constituida por ácido fórmico al 0.1% (**A**) y CH<sub>3</sub>CN (**B**), y utilizando un flujo de elución de 4.72 o 17.06 mL/min. Las condiciones de análisis del detector ELSD empleadas fueron: presión de gas nebulizador 40 psi, ganancia 100, en modo de calentamiento y temperatura del tubo (70 ± 25°C). Las longitudes de onda (l) utilizadas para la detección de los compuestos fueron 254 y 365 nm. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el software Empower 3.0 (Waters Corp.).

La cromatografía en columna abierta se realizó utilizando como fases estacionarias gel de sílice 60 (Merck®) [Hex-éter de petróleo-éter etílico-AcOEt-CHCl<sub>3</sub>-MeOH] o Sephadex LH-20 (GE Healthcare®) [MeOH].

Finalmente, los análisis cromatográficos en capa fina de tipo analítico se realizaron en placas de aluminio (0.25 mm de grosor) de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice 60 F254 (Merck®) y utilizando diversos sistemas de elución. Como agentes reveladores se emplearon (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> y los reactivos de Dragendorff y Ehrlich, además de luz ultravioleta (UV).

#### 4.1 Estudio de *Malbranchea albolutea*

##### 4.1.1 Material Fúngico

La cepa de *Malbranchea albolutea* Sigler & Carmichael (Onygenaceae), fue adquirida en la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés) con el número de catálogo ATCC 34522. El microorganismo fue activado siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Este procedimiento se realizó adicionando 1 mL de agua estéril desionizada a las esporas liofilizadas e incubando a 37°C, por 24 horas.

A fin de confirmar la identidad de *M. albolutea* se llevó a cabo el aislamiento y secuenciación del material genético del hongo. Una región del ADN altamente conservada (ITS1, 5.8S e ITS2) se secuenció y amplificó y el ADN obtenido se sometió a un alineamiento BLAST, permitiendo comparar regiones específicas de ADN con la base de datos. De esta



manera se obtienen porcentajes de homología de las regiones internas transcritas con las contenidas en la base de datos.

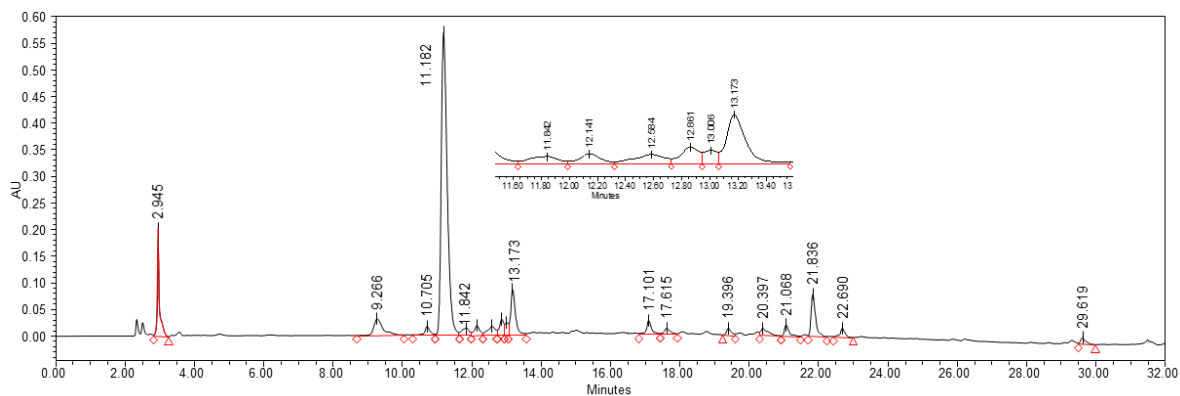
#### **4.1.1.1 Condiciones de crecimiento, extracción y aislamiento**

#### **4.1.1.2 Preparación cultivos a pequeña escala**

A partir de una suspensión homogénea de las esporas de *M. albolutea*, se realizaron los cultivos axénicos del microorganismo en cajas de Petri con medio de agar papa dextrosa (PDA, Difco®) y se dejaron en crecimiento durante 7 días. Posteriormente, se realizó la preparación de los pre-cultivos en medio de caldo de papa dextrosa (PDB Difco®, 25 mL), se mantuvieron en agitación a 100 rpm, durante 7 días y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas. Al finalizar el período de crecimiento, cada pre-cultivo fue utilizado para realizar el crecimiento del microorganismo a pequeña escala empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL con 15 g arroz con 30 mL de agua previamente esterilizados. El tiempo de crecimiento en los matraces se realizó durante 21 días, en condiciones estáticas y ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas.

#### **4.1.1.3 Preparación del extracto orgánico a partir de los cultivos**

Una vez finalizado el período de crecimiento, el cultivo dentro de los matraces fue inactivado adicionando 10 mL de MeOH y posteriormente sometido a un proceso de maceración con 150 mL AcOEt por matraz. El extracto orgánico resultante (MAIb) se filtró, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró a sequedad a presión reducida. Posteriormente, MAIb fue reconstituido con MeOH-CH<sub>3</sub>CN (1:1) y sometido a un proceso de partición por triplicado usando hexano. La fracción polar fue concentrada al vacío, obteniéndose 1.3 g de un residuo café oscuro (FrMAIb MeOH-CH<sub>3</sub>CN), Fig. 12. A fin de identificar algún compuesto mayoritario y ver la complejidad de FrMAIb se analizó en CCD (CHCl<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O-petróleo-HCO<sub>2</sub>H, 1:2:7:0.1) y CLAR (gradiente MeOH-CH<sub>3</sub>CN, 85:15).



**Figura 12.** Perfil cromatográfico de FrMAIb. HPLC-PDA-ELSD. Columna XBridge Shield RP-C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 mm); fase móvil compuesta por ácido fórmico al 0.1% (A) y CH<sub>3</sub>CN (B): 0 min 15% B, 8 min 100% B, 9.5 min 100% B, 10 min 15% B, 12 min 15% B; flujo: 1 mL/min; vol. inyección: 10 µL.

#### 4.1.2 Fraccionamiento de FrMAIb MeOH-CH<sub>3</sub>CN y obtención de los compuestos puros

FrMAIb (1.2955 g) fue sometida a un proceso de fraccionamiento en columna abierta, utilizando gel de sílice desactivada al 10 % (175 g), un gradiente de elución con mezclas de éter de petróleo-éter etílico y éter etílico-cloroformo en orden creciente de polaridad. Este proceso generó un conjunto de 18 fracciones reunidas con base en su similitud cromatográfica, fueron analizadas en CLAR (FrMAIb1–18), Fig. 13.

Las fracciones FrMAIb1–3, estaban integradas por compuestos muy apolares, por lo que fueron descartadas para su posterior análisis. El análisis de las FRMAIb5 y 6 permitió la identificación de cuatro compuestos mayoritarios con un espectro de absorción UV entre 200–350 nm. Por otro lado, tanto en las fracciones FrMAIb7 y 8 como en las FrMAIb9–18 fue posible asilar dos compuestos mayoritarios.

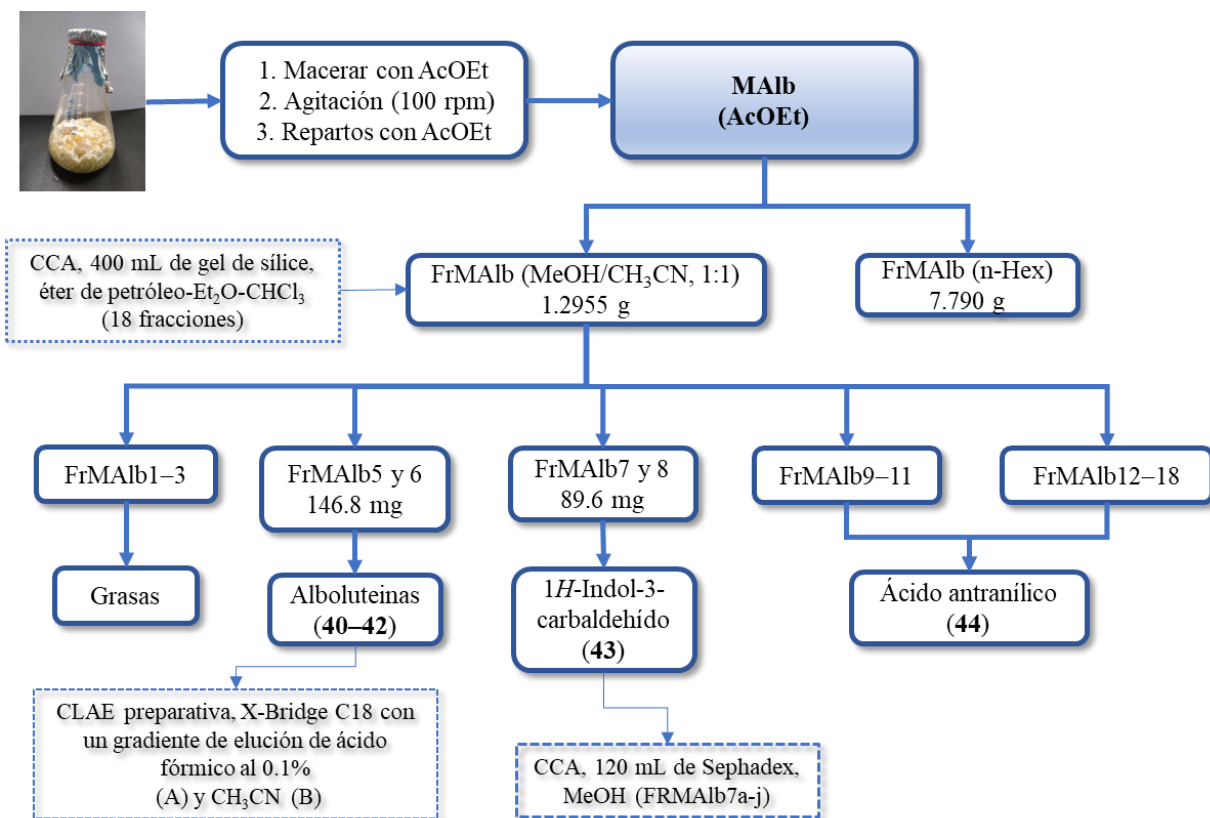


Figura 13. Fraccionamiento del extracto orgánico de *M. albolutea*

#### 4.1.3 Ensayos enzimáticos

El extracto orgánico, fracciones y compuestos puros fueron evaluados mediante un ensayo de tipo espectrofotométrico utilizando placas de Elisa de 96 pozos para establecer su actividad inhibitoria contra la enzima PTP1B. La enzima PTP1B recombinante utilizada en los ensayos fue proporcionada por Dr. Martín González Andrade.

Para mantener la estabilidad del residuo de Cys215, susceptibles a oxidarse, se adicionó un agente reductor como DTT, de esta manera se conserva la forma activa de la enzima (Salmeen et al., 2003).

Para la evaluación se prepararon diferentes soluciones de las muestras a evaluar (extracto, fracciones y/o compuestos puros) y del control positivo (ácido ursólico, 1 mM) en DMSO o

solución buffer de Tris-HCl (50 mM, pH 6.8). Para el ensayo, en cada pozo se colocaron alícuotas crecientes entre 0–10 mL del analito de prueba (inhibidor), una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  mM de la enzima PTP1B preparada a partir de una solución de referencia de 22 nM y una concentración de 0.25 mM del sustrato *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP Sigma Aldrich®). Enseguida, se tomó la lectura al tiempo cero ( $t_0$ ) e inmediatamente la placa con la mezcla de reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Al término de este período de incubación se registró la lectura final ( $t_{15}$ ). Todos los valores de absorbancia se registraron a la longitud de onda de 405 nm utilizando el programa Microplate Manager 6.0, y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\%Inhibición, PTP1B = \left( 1 - \frac{A_{405(s)}}{A_{405(b)}} \right) \times 100\%$$

Donde  $A_{405(s)}$  es el  $\Delta A$  de la muestra ( $A_{t_{15}} - A_{t_0}$ ) y  $A_{405(b)}$  es el  $\Delta A$  del blanco ( $A_{t_{15}} - A_{t_0}$ ). Utilizando el programa OriginPro (OriginLab Corp., 2018) se realizó la curva de inhibición de las muestras, el ajuste para calcular la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y otros parámetros cinéticos.

#### 4.1.3.1 Estudios de cinética enzimática

Una vez calculado el valor de la  $CI_{50}$  de las muestras evaluadas, se realizaron los ensayos de cinética enzimática, mediante la elaboración de curvas de saturación por sustrato empleando concentraciones de *p*NPP en el rango entre 0.2–1.2 mM y diferentes concentraciones del inhibidor en estudio; los datos obtenidos se ajustaron usando la ecuación de inhibición enzimática contenidas en programa el OriginPro, se analizaron los parámetros de ajuste ( $R^2$  y  $\chi^2$ ) para determinar el tipo de inhibición y obtener los siguientes parámetros de velocidad máxima ( $V_{MÁX}$ ), constante de afinidad enzima-sustrato ( $K_M$ ) y la constante de inhibición de

acuerdo con el tipo de inhibición: cte. de inhibición competitiva ( $K_{IC}$ ), cte. de inhibición no competitiva ( $K_{ICu}$ ), cte. de inhibición acompetitiva ( $K_{IU}$ ) o ctes. de inhibición mixta ( $K_{IC}$ ,  $K_{IU}$ ) Además el tipo de inhibición se confirmó con el análisis de los gráficos de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk).

#### 4.1.4 Estudios de acoplamiento y dinámica molecular

Los estudios *in silico* se realizaron utilizando una de las estructuras de la PTP1B contenidas en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) con el código 1T49. De todas las estructuras depositadas en el PDB, se eligió a la enzima 1T49 que presenta una conformación abierta, que es la forma que adopta la proteína antes de realizar la hidrólisis del grupo fosfato presente en el sustrato. Los parámetros relacionados con la calidad de la estructura cristalina utilizada fueron resolución (1.90 Å) y R (0.205) y Rfree (0.236). Esta estructura es una forma trunca de la PTP1B, debido a la falta de la hélice 7 $\alpha$ , que es una porción importante presente en la cavidad alostérica reportada (Wiesmann et al., 2004).

Una segunda estructura utilizada en los estudios de acoplamiento molecular fue un modelo teórico de la PTP1B<sub>1-435</sub> humana (Q9PT91) propuesto por AlphaFold un programa de inteligencia artificial (Jumper *et al.*, 2021) que usa un modelo híbrido para la elucidación de estructuras y todos los datos experimentales disponibles (estructuras cristalinas, secuencias de aminoácidos, similitud entre las proteínas de una misma familia, etc.), finalmente los analiza usando inteligencia artificial y aprendizaje profundo (UniProt Consortium, 2021). Además, existe una base de datos AlphaFoldDB que proporciona acceso a más de 200 millones de predicciones de estructuras.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando el programa AutodockTools 1.5.4. En breve, el protocolo realizado consistió en la preparación de la proteína adicionando las cargas de Kollman, los átomos de hidrógeno polares, la fusión de los protones no polares, así como, la eliminación de todo tipo de molécula orgánica presente en el archivo de la proteína.

Enseguida se realizó, la optimización de la geometría de los compuestos utilizados para el acoplamiento, realizando la determinación de enlaces rotables y la adición de las cargas de Gasteiger-Marsili en Avogadro (Hanwell et al., 2012). Una vez preparados los archivos de la proteína y el ligando se realizó un acoplamiento a ciegas utilizando el programa de AutoDock4 (4.2) con los parámetros por defecto del algoritmo genético Lamarkiano con búsqueda local, número de individuos en la población (150), máximo número de evaluaciones de energía (25 millones), número máximo de generaciones (27000), tasa de mutación genética (0.02), tasa de cruzamiento (0.8) y 500 corridas de acoplamiento. Con los resultados obtenidos a partir de este análisis se generaron los mapas de campo electrostático para cada tipo de átomo presente en los ligandos usando el programa AutoGrid4 (AutoDock4), con un tamaño inicial de la caja del campo de  $60\text{\AA} \times 60\text{\AA} \times 60\text{\AA}$  en las dimensiones x, y, z. Con el fin de afinar los análisis de acoplamiento, estos se volvieron a ejecutar utilizando una caja electrostática (campo) más pequeña, con las dimensiones de  $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$ , colocada en el ligando. El análisis de estas cajas se realizó con las herramientas de AutoDockTools y UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

Para las simulaciones de dinámica molecular, se utilizó el programa AMBER, el software de simulación permite que todos los átomos de un sistema vibren y se trasladen por un período de tiempo, integrando las ecuaciones de movimiento de Newton, bajo un campo potencial empírico que aproxima las energías de los sistemas moleculares representando los átomos como esferas cargadas y los enlaces como resortes con propiedades descritas por la ley de Hook. Los sistemas se parametrizan para predecir propiedades energéticas y estadísticas de los sistemas, a la vez que aportan información sobre la conformación y estabilidad en solución.

Cada complejo PTP1B-ligando es preparado en el módulo LEaP a partir del programa AMBER, donde se adicionan todos los hidrógenos de los aminoácidos, se neutraliza el sistema con  $\text{Na}^+$ , posteriormente el complejo se solvata en una caja octahedra de moléculas de agua con el modelo explícito TIP3P localizada a  $12\text{\AA}$  a partir de la superficie de la proteína. Las simulaciones fueron hechas a una presión de 1 atm y 298.15 K. A continuación, la dinámica molecular (DM) consistió en una minimización de la estructura inicial, seguido de 50 ps de calentamiento desde 0 a 298.15 K, 50 ps para equilibrar el volumen, 500 ps para equilibrar el sistema a una presión de 1 atm y finalmente 20 ns de DM. Después de terminar la DM se

analizaron los resultados con el protocolo de MM/PBSA en modos normales para obtener los parámetros energéticos. Estos programas han sido diseñados para simulaciones en sistemas de cómputo de alto desempeño, como Miztli de supercomputo (NES) de la UNAM.

Las coordenadas de los ligandos resultantes del estudio de DM se procesaron con antecámara (un conjunto de programas auxiliares para estudios de mecánica molecular) con el fin de generar topologías adecuadas para el módulo LEaP de AMBER 14. Cada estructura y complejo se sometió al siguiente protocolo: se agregaron hidrógenos y otros átomos faltantes utilizando el módulo LEaP con el conjunto de parámetros parm99, se agregaron contraiones de Na<sup>+</sup> para neutralizar el sistema, los complejos luego se solvataron en una caja octaédrica del modelo TIP3P donde las moléculas de agua se localizan en los límites de la caja a 12 Å de la superficie de la proteína. Las simulaciones de DM se realizaron a 1 atm y 298 K, mantenidas con el baróstato de Berendsen, utilizando condiciones de contornos periódicos y sumas de Ewald de malla de partículas (espaciado de cuadrícula de 1 Å) para tratar interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de 10 Å para calcular directamente interacciones. El algoritmo SHAKE se utilizó para satisfacer las restricciones de enlace, permitiendo el empleo de un paso de tiempo de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton como se recomienda en el paquete Amber. Los parámetros de campo de fuerza para los residuos fueron Amberf 99SB68, y se utilizaron parámetros de campo de fuerza de Gaff para los ligandos. Todos los cálculos se realizaron utilizando el motor DM acelerado de unidades de procesamiento de gráficos (GPU, por sus siglas en inglés) en AMBER (pmemd.cuda), paquete de programa que se ejecuta completamente en GPU habilitadas para CUDA73. Los fotogramas se guardaron a intervalos de 100 ps para análisis posteriores.

Finalmente se calculó la energía libre del sistema y el área de superficie de Poisson Boltzmann usando las aproximaciones pertinentes de la energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) entre el ligando y la proteína en estudio, las ecuaciones asociadas a este parámetro son:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{Sol} - T\Delta S$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{Interna} + \Delta E_{Electrostática} + \Delta E_{Vdw}$$

$$\Delta G_{Sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA}$$

Al realizar la aproximación de la energía libre del sistema los parámetros que aparecen en la ecuación son la energía mecánica molecular del sistema en fase gaseosa, la energía de solvatación y la entropía después de la interacción ( $\Delta E_{MM}$ ,  $\Delta G_{sol}$  y  $T\Delta S$ ). Dentro de la  $\Delta E_{MM}$  encontramos la contribución de las energías internas (enlace, ángulos y diedros), electrostáticas y finalmente de Van Der Waals. Con respecto a la energía de solvatación esta está representada por la solvatación electrostática polar y no polar ( $\Delta G_{PB}$  y  $\Delta G_{SA}$ ). La contribución polar se calcula utilizando el modelo de área de superficie de Poisson-Boltzmann, mientras que la energía no polar se estima a partir del área de superficie accesible al solvente (SASA). El cambio de entropía conformacional ( $-T\Delta S$ ) se calculó mediante análisis en modo normal a partir de un conjunto de capturas conformacionales tomadas de las simulaciones DM.

#### **4.1.5 Predicciones ADMET de los compuestos estudiados**

Con la finalidad de complementar el estudio de los inhibidores de las PTP1B se realizó la predicción de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y toxicológicas (ADMET absorción, distribución, metabolización, excreción y toxicidad), empleando herramientas online de uso libre. Para la predicción de las propiedades fisicoquímicas se usaron los siguientes servidores SwissADME, DataWarrior y ADMETLab 2.0 (Daina et al., 2017; Sander et al., 2015; Xiong et al., 2021). Con respecto a las propiedades toxicológicas se usó DataWarrior el software ICM v. 3.9 (Molsoft); la estimación de la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) se realizó con el programa Toxicity Estimation Software Tool, TEST v. 5.1 (EPA, Environmental Protection Agency, 2016).

Para las propiedades farmacocinéticas se consideraron los siguientes parámetros: la absorción a nivel gastrointestinal (GI), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), muchas de las propiedades que predicen una buena absorción oral se resumen en la gráfica de biodisponibilidad generada en SwissADME.

En cuanto a la evaluación de toxicidad se consideraron las interacciones con la glicoproteína P (P-gp), cinco isoformas del citocromo 450 (CYP450) y efectos mutagénicos, tumorigénicos e irritantes. Además, se evaluó la presencia de residuos potencialmente dañinos



o inestables y compuestos considerados como PAINS (Pain Assay Interference Substances), caracterizados por una interacción inespecífica con múltiples enzimas y dar falsos positivos con gran facilidad.

Todas las propiedades predichas fueron comparadas con el control positivo usado en los ensayos *in vitro* (AU), la metformina (M) un medicamento de primera línea usado en el tratamiento de la DMT2, y dos moléculas inhibitoras de la PTP1B que alcanzaron ensayos preclínicos, trodusquemina (T) y ertiprotafib (E).

En todos los casos usamos una representación unidimensional canónica de las moléculas (SMILES) para obtener una serie de descriptores calculados uni- y bi- dimensiones como: número de anillos aromáticos, la fracción de sp<sup>3</sup>, enlaces rotables, área superficial topología, etc.; con estos datos fue posible la predicción de las propiedades mencionadas en esta sección.

#### **4.2 Descubrimiento de nuevos inhibidores de la PTP1B a partir de una pequeña quimioteca de productos naturales de laboratorio 124 del Departamento de Farmacia**

En laboratorio 124 de Farmacognosia del Departamento de Farmacia, a cargo de la Dra. Rachel Mata, se han descubierto varias moléculas a partir de extractos fúngicos y vegetales de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes antidiabéticos. Muchas de las moléculas contenidas en esta quimioteca han sido sometidas a estudios *in vitro* o/y *in vivo* con la finalidad de establecer su interacción con alguna de las dianas terapéuticas relacionadas con el tratamiento de la DMT2. Como se ha descrito en secciones anteriores en nuestro grupo de trabajo hemos comenzado a trabajar en la búsqueda de inhibidores de PTP1B que puedan servir para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Estudio de *Malbranchea albolutea*

#### 5.1.1 Identificación del Material fúngico

La región del ADN transcrita de la cepa con el número de identificación ATCC 34522 corresponde a *Malbranchea albolutea* (Onygenales; Onygenaceae, Ascomycota, Figura 14), presentando una homología de 99.81 % con *Auxarthron alboluteum*/*M. albolutea* identificada con el código UAMH 2846 (NR\_111137.1; AY177303) UAMH del Centre Global Microfungal Biodiversity, de la Universidad de Toronto (<https://www.uamh.ca/details.php?id=2846>). El nombre aceptado para este hongo es *Malbranchea*, en concordancia con las recomendaciones del Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas, que sugiere el uso de un solo nombre. En el caso de hongos el lema es “one fungus one name” (1F1N, por sus siglas en inglés). El nombre que tiene más peso es aquel utilizado por primera vez para el género; así *Malbranchea*, se usó por primera vez en 1882, mientras que *Auxarthron*, fue empleado en 1963.

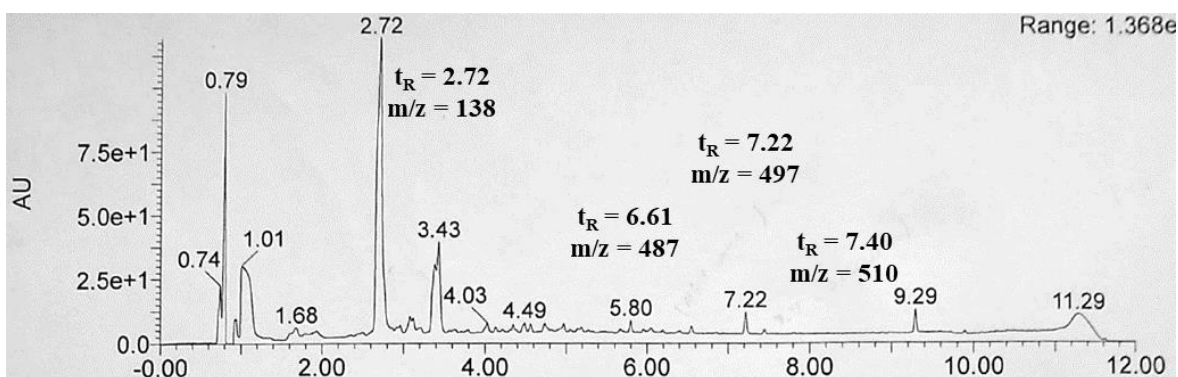
#### 5.1.2 Extracción y aislamiento de los productos identificados en el extracto orgánico de *M. albolutea* (FrMA1b)

El extracto orgánico (FrMA1b) se obtuvo como se describe en la sección experimental. En promedio la cantidad de FrMA1b obtenido por cada 300 g de arroz fue de 1.3 g (Fig. 14).

El análisis de FrMA1b se realizó empleando la cromatografía de líquidos de alta y ultra alta eficiencia (CLAE y CLUE). Un cromatograma representativo del extracto se ilustra en la Fig. 15. El análisis permitió detectar la presencia de una serie de compuestos aromáticos en el extracto.



**Figura 14.** De izquierda a derecha se presentan las Colonia de *M. albolutea* en medio PDA con 7 días de crecimiento y los cultivos en arroz con 21 días de crecimiento.



**Figura 15.** Cromatograma correspondiente al extracto FrMAIb registrado en un barrido de  $\lambda$  entre 210–300 nm, gradiente:  $\text{CH}_3\text{CN}$  (B) y  $\text{H}_2\text{O}$  ácida (A), 15 % B-100 % B en 5 min, flujo 0.5 mL/min, vol. de inyección 5  $\mu\text{L}$ . En la imagen se presenta el valor de  $m/z$  para algunos los picos de interés.

Posteriormente, FrMAIb se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta para generar 18 fracciones que fueron ensayadas *in vitro* para determinar si sus componentes inhibían a la enzima PTP1B. De acuerdo con los resultados obtenidos, las fracciones activas fueron de la 5–15 (Tabla 4); la mayor actividad se concentró en las fracciones FrMAIb12–15 que contenían un compuesto mayoritario con una relación  $m/z$  138.67 ( $t_R$  2.72) identificado como ácido antranílico (44).

**Tabla 4.** Porcentaje de inhibición frente a la PTP1B de las fracciones provenientes del extracto de *M. albolutea*.

FRMAIb	Concentración (ppm)	
	200	1000
<b>1</b>	1.53	11.45
<b>2</b>	2.70	16.53
<b>3</b>	4.71	10.52
<b>4</b>	2.56	18.52
<b>5–6</b>	4.96	47.12
<b>7–8</b>	4.44	41.06
<b>9–11</b>	39.64	61.55
<b>12–13</b>	56.58	80.65
<b>14–15</b>	83.03	86.87
<b>16–18</b>	5.65	23.97

Nota: Cada resultado corresponde al promedio de tres replicas

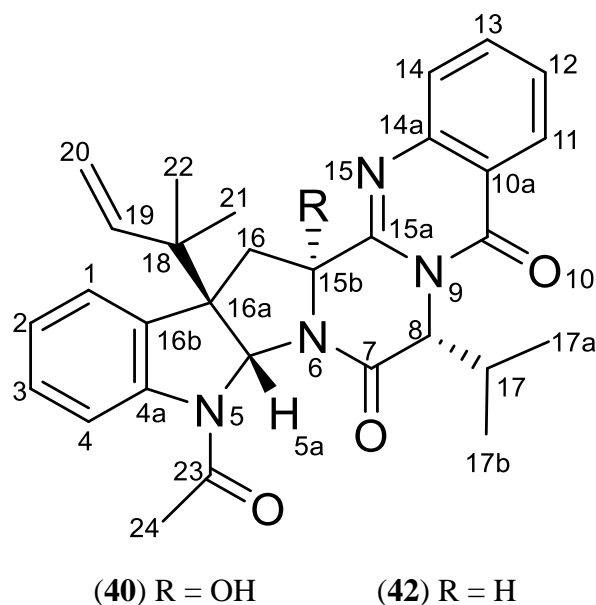
### 5.1.2.1 Aislamiento y caracterización de Alboluteinas A-C (40–42)

La alboluteina A (**40**) y la alboluteina C (**42**) se aislaron como sólidos amorfos; sus espectros de masa de alta resolución tipo ESI<sup>+</sup> permitieron calcular sus fórmulas condensadas como C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (513.2457) y C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (497.2528), respectivamente. Sus espectros en el IR indican la presencia de los siguientes grupos funcionales: carbonilo de amida (1648 cm<sup>-1</sup>), imina (1633 cm<sup>-1</sup>), y en el caso del compuesto **40** hay dos señales correspondientes a la presencia de grupo hidroxilo (3330 y 1270 cm<sup>-1</sup>). Los datos de RMN se presentan en las Tablas 5 y 6. Toda la información analizada permitió detectar que los productos eran similares a la sartoriglabrina B (Kijjoa et al., 2011) y la 5-*N*-acetil-8β-isopropil-ardemina (Mendes et al., 2016). Estos productos se caracterizan por la presencia en su estructura hexacíclica de un hexahidropirrol [2,3-*b*]indol, una quinazolinona, y un grupo prenilo inverso (Fig. 16).

Una de las diferencias notables entre la sartoriglabrina B y el producto **40** es el sustituyente en el anillo intermedio (C-8) entre el hexahidropirrol [2,3-*b*]indol y la quinazolinona. En el caso de **40**, el sustituyente en C-8 es un isopropilo en lugar del isobutilo de la sartoriglabrina B. Los desplazamientos δ<sub>H</sub> 2.48 (dq *J* = 9.8, 6.7 Hz, H-17), 0.80 (d, *J* = 6.7 Hz, H-17a), 1.04

(d,  $J = 6.7$  Hz, H-17b)/ $\delta_C$  33.8 (C-17), 19.8 (C-17a) y 20.3 (C-17b) observados en los espectros de RMN de **40** son congruentes con esa diferencia. Por otra parte, la única diferencia entre **40** y **42** es la ausencia de un grupo hidroxilo, que en el caso de **40** se asignó en la posición C-15b [ $\delta_H$  4.58 (dd,  $J = 5.9, 10.6$  Hz)/ $\delta_C$  59.7 (C-15b)] con base en los análisis detallados de los experimentos de HMBC y HSQC (Tabla 5). El desplazamiento paramagnético y la multiplicidad de la señal correspondiente en **42** es consistente con esta propuesta (Tablas 5 y 6).

La propuesta de configuración relativa en los centros estereogénicos se basó en las correlaciones observadas en el espectro de NOESY. En el caso de la **40** las correlaciones más relevantes fueron:  $\delta_H$  6.22 (H-5a)/ $\delta_H$  1.00 (H-21), 1.16 (H-22), 5.91 (H-19), 5.01 (H-8) y 5.13 (H-20b), que permitieron ubicar al residuo de prenilo y el protón H-5a del mismo lado. En el caso del isopropilo este se localizó del mismo lado que el hidroxilo [ $\delta_H$  2.84 (OH-15b)/ $\delta_H$  1.04 (H-17b)], Tabla 5. En el caso de **42** se observaron interacciones similares a las observadas en **40**, y H-15b se situó del mismo lado que el isopropilo [ $\delta_H$  4.58 (H-15b) / $\delta_H$  2.05 (H-17) y  $\delta_H$  0.87 (H-17a y H-17b)], Tabla 6.

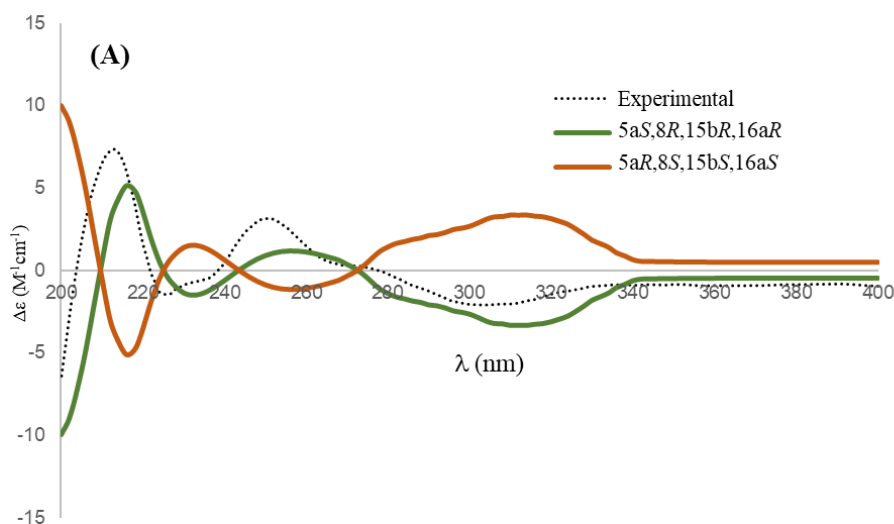


**Figura 16.** Alboluteina A (**40**) y C (**42**) aisladas del extracto FrMalb (MeOH/CH<sub>3</sub>CN) de *M. albolutea*.

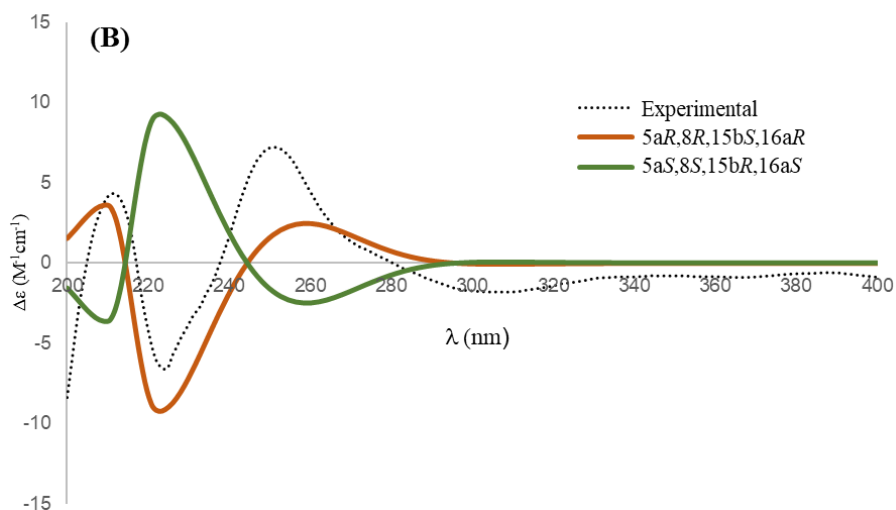
El compuesto **42** es similar a la 5-*N*-acetil-8 $\beta$ -isopropil-ardemina descrita por Mendes et al. (2016); sin embargo, estos autores proponen una orientación  $\beta$  del isopropilo.

La configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en **40** y **42**, se realizó con el cálculo teórico de los espectros de dicroísmo circular electrónico (DCE) y su comparación con los obtenidos experimentalmente. Los diastereoisómeros propuestos para los cálculos teóricos se eligieron tomando como base el análisis de los espectros NOESY. Para los cálculos se usaron los niveles B3LYP/6-311G+(2d,p) y B3LYP/6-31+G(d). El compuesto **40** presentó dos efectos Cotton positivos y uno negativo ( $\lambda_{\text{máx}}$  213, 251, 226 nm) que correlacionó con el espectro calculado para el diastereoisómeros 5a*S*,8*R*,15b*R*,16a*R* (Fig. 17). El espectro calculado correspondiente al enantiómero 5a*R*,8*S*,15b*S*,16a*S* mostró efectos Cotton opuestos al obtenido experimentalmente (Fig. 17), lo que implica que la configuración de los centros quirales de este compuesto son diferentes a los del compuesto **40**.

Siguiendo la misma estrategia se realizó la comparación de los espectros de DCE experimental del compuesto **42** ( $\lambda_{\text{máx}}$  211, 224 y 251 nm) con los obtenidos teóricamente; de este análisis, se determinó que la configuración absoluta de los centros estereogénicos de **42** es 5a*R*,8*R*,15b*S*,16a*R* (Fig. 18).



**Figura 17.** Comparación del espectro experimental de DCE correspondiente al compuesto **40** (punteado negro) con el calculado para los enantiómeros 5a*S*,8*R*,15b*R*,16a*R* (verde) y 5a*R*,8*S*,15b*S*,16a*S* (anaranjado).



**Figura 18.** Comparación del espectro experimental de DCE correspondiente al compuesto **42** (punteado negro) con el calculado para los enantiómeros 5aR,8R,15bS,16aR (anaranjado) y 5aS,8S,15bR,16aS (verde).

### 5.1.2.2 Caracterización Alboluteina B (41)

La alboluteina B (**41**) fue aislada como un sólido blanco; sus espectros de masa de alta resolución tipo ESI presentaron los iones moleculares en una  $m/z$  487.77  $[M+H]^+$  y 485.89  $[M-H]^-$ , congruentes con una fórmula condensada de  $C_{28}H_{30}N_4O_4$ . Este compuesto mostró características estructurales similares a **40** y **42**, revelando el mismo núcleo tripéptido y la presencia de un prenilo inverso, pero con señales y correlaciones ligeramente diferentes. En primer término, los espectros de RMN no presentaron señales el residuo de *N*-acetil y en su lugar se observó la señal para una amina secundaria ( $\delta_H$  4.47). En segundo lugar, el espectro de **41** presentó señales para dos carbinos terciarios [ $\delta_C$  90.5 (C-15b) y 90.8 (C-16a)]; los protones correspondientes a esos hidroxilos fueron confirmados mediante la adición de agua deuterada, desapareciendo las señales en  $\delta_H$  2.77 (OH-15b) y 7.17 (OH-16a), Tabla 7.

**Tabla 5.** Datos de RMN obtenidos para la muestra de alboluteina A (**40**), realizada en acetona-*d*<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H (500 MHz) y <sup>13</sup>C (125 MHz).

Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	HMBC	NOESY
1	124.6	7.50 (dd, 7.6, 1.1)	3, 4a	2,3
2	126.1	7.15 (ddd, 8.1, 7.6, 1.4)	3, 4a	1,4
3	128.8	7.28 (ddd, 8.1,7.6, 1.1)	2, 4a, 16a	1
4	119.7	7.96 (dd, 8, 1.4)		2
4a	144.1			
5				
5a	81.6	6.22 (s)	4a, 15b, 16b	19, 21, 22, 24
7	167.9			
8	63.4	5.01 (d, 9.8)	7, 10, 15a, 17, 17b	17a, 17b
10	161.6			
10a	121.5			
11	127.7	8.20 (dd, 7.9, 1.5)	10, 10a, 13	12
12	128.1	7.57 (ddd, 8.1, 7.9, 1.2)	14a	11, 13
13	135.5	7.86 (ddd, 8.1, 8.0, 1.5)	10a, 11	12, 14
14	128.4	7.71 (dd, 8.0, 1.2)	14a	13
14a	148.2			
15a	153.8			
15b	90.3		5a, 16α, 16β	17a
16	45.6	α: 3.15 (d, 14.0) β: 3.29 (d, 14.0)	15a, 15b, 16a, 16b, 18	15b 21,22
16a	60.1			
16b	135.9			
17	33.8	2.48 (dqq, 13.5, 9.8, 6.7)	8, 17a, 17b	8, 17, 17a
17a	19.8	0.80 (d, 6.7)	8, 17, 17b	8,15b
17b	20.3	1.04 (d, 6.7)	8, 17, 17a	8, 17a
18	41.6			
19	144.9	5.91 (dd, 17.4, 10.8)	21, 22	3, 5a, 16, 18, 20α, 21
20	114.5	α: 5.05 (dd, 10.8, 1.1) β: 5.13 (dd, 17.4, 1.1)	18	19
21	23.7	1.00 (s)	18, 19, 22	3, 5a, 16, 19, 20α, 21
22	22.9	1.16 (s)	18, 19, 22	3, 5a, 16, 19,20β, 22
23	170.5			
24	24.1	2.65 (s)	23	5a
15b-OH		2.84 (s)		16α, 17a

Datos asignados con base en el análisis del espectro HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) y HMBC; los valores de *J* (Hz) se encuentran dentro del paréntesis.



**Tabla 6.** Datos de RMN obtenidos para la muestra de alboluteina C (**42**), realizada en acetona-d<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H (500 MHz) y <sup>13</sup>C (125 MHz).

Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	HMBC	NOESY
1	125.8	7.59 (dd, 7.7, 1.3)	3, 4a, 16a	2, 16β
2	125.1	7.22 (ddd, 7.7, 7.8, 1.1)	2, 4	3
3	129.6	7.35 (ddd, 8.0, 7.8, 1.3)	2, 4, 4a	2
4	119.6	7.98 (dd, 8.0, 1.1)	2,3	3
4a	144.3			
5				
5a	80.2	6.13 (s)	4a, 19	15b, 19, 20α, 21, 22, 24
7	165.3		8	
8	63.1	5.04 (d, 8.4)	7, 10, 15a, 17, 17a	17, 17a, 17b
10	161.0			
10a	121.4			
11	127.5	8.19 (dd, 8.1, 1.6)	10, 10a, 13	12
12	127.8	7.54 (ddd, 8.1, 7.1, 1.2)	11, 13, 14a	11
13	135.4	7.84 (ddd, 8.5, 7.1, 1.6)	10a, 12	12, 14
14	128.1	7.67 (dd, 8.5, 1.2)	12, 13, 14	13
14a	148.3			
15a	152.8			
15b	59.7	4.58 (dd, 10.6, 5.9)	15a, 15b, 16	16, 17, 17a, 17b
16	37.5	α: 3.04 (d, 5.9)	15α, 15β, 16β, 18	17, 22, 24
		β :2.85 (d, 10.6)	16a, 16b, 5a	16, 17, 21, 22
16a	61.8			
16b	133.9			
17	32.1	2.05 (m)	17a, 17b	17a, 17b, 22, 23
17a	18.8	0.87 (t)	8, 17	8, 15b, 16, 17
17b	20.2	0.87 (t)	8, 17, 17b	8, 15b, 16, 17
18	41.1			
19	144.7	5.95 (dd, 17.4, 10.8)	16a, 18, 22	16α, 20α, 20β
20	114.3	α:5.07 (dd, 10.8, 1.2)	15a, 18	20β
		β:5.16 (dd, 17.4, 1.1)	18, 19	20α, 21, 22
21	23.9	1.22 (s)	16a, 18, 19, 22	1
22	22.9	1.05 (s)	16a, 18, 19, 21	1
23	169.9			
24	23.7	2.64 (s)	5a, 23	17, 21, 22

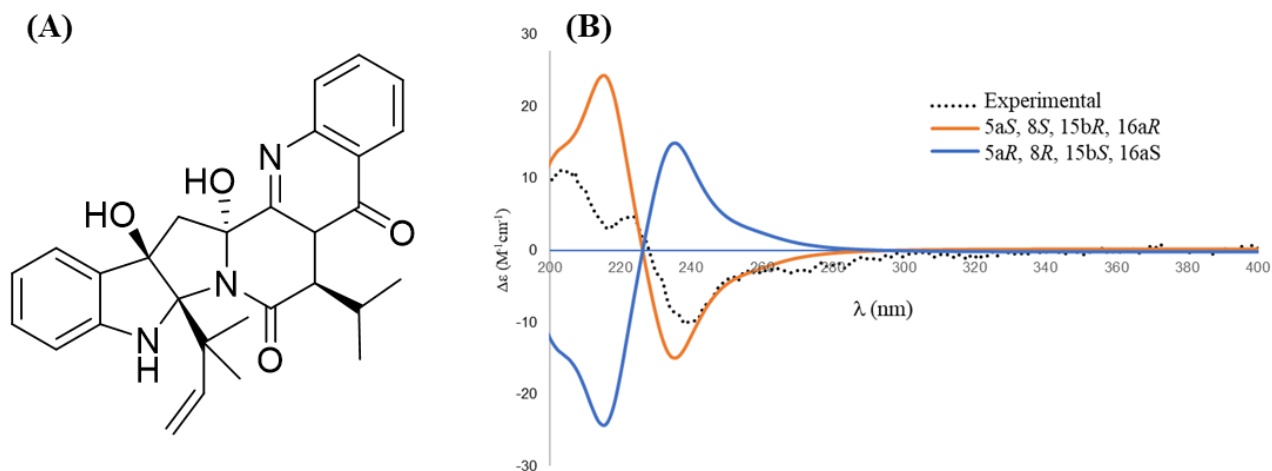
Datos asignados con base en el análisis del espectro HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) y HMBC; los valores de *J* (Hz) se encuentran dentro del paréntesis.

Las correlaciones en el experimento HMBC,  $\delta_H$  7.30 (H-1)/ $\delta_C$  90.8 (C-16a), y  $\delta_H$  4.73 (NH-5)/ $\delta_C$  131.6 (C-16b) permitieron ubicar al primer grupo hidroxilo en C-16a (Fig. 18A y Tabla 7). En tanto que las correlaciones  $\delta_H$  4.00 y 2.51 (H-16 $\alpha$  y H-16 $\beta$ )/ $\delta_C$  90.5 (C-15b) permitieron colocar al segundo hidroxilo en C-15b.

La ubicación del grupo prenilo inverso en C-5a se asignó con base en las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre  $\delta_H$  4.00 y 2.51 (H-16 $\alpha$  y H-16 $\beta$ )/ $\delta_C$  111.0 (C-5a),  $\delta_H$  1.25 (H-21 y H-22)/ $\delta_C$  111.0 (C-5a), y  $\delta_H$  6.03 (H-19)/111.0 (C-5a).

La configuración relativa de los centros estereogénicos se propuso con base en las correlaciones NOESY entre  $\delta_H$  7.17 (OH-16a) con  $\delta_H$  1.25 (H-21 y H-22) y 2.51 (H 16 $\beta$ ), indicando que el grupo hidroxilo en C-16a y la unidad de prenilo se encuentran del mismo lado de molécula. Por otro lado, las correlaciones entre H-17 y H-19 colocan a la unidad de isopropilo del mismo lado del residuo de prenilo (Tabla 7) Con base en estas observaciones los siguientes diastereoisómeros 5a*R*,8*R*,15*bR*,16a*R*; 5a*S*,8*S*,15*bS*,16a*S*; 5a*R*,8*R*,15*bS*,16a*S*, y 5a*S*,8*S*,15*bR*,16a*R* podían corresponder a la estructura del producto **41** (Fig. 19A).

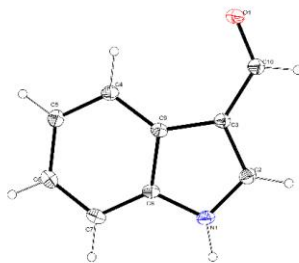
Para discriminar entre los cuatro diastereoisómeros, se llevaron a cabo predicciones computacionales de los tensores de blindaje isotrópicos de RMN de todos los isómeros utilizando el método GIAO con los niveles mPW1PW91/6-311+G (d,p) y B3LYP/6-31+(d,p), con el modelo de cálculo de conductor polarizable (PCM) en CHCl<sub>3</sub> (Grimblat et al., 2015; Marcarino et al., 2020). Los tensores de blindaje isotrópicos para cada diastereoisómeros se sometieron a análisis estadístico DP4+, que mostró que el isómero 5a*S*,8*S*,15*bR*,16a*R* es la estructura más probable; este diastereoisómeros se predijo con probabilidades del 100 % en el nivel B3LYP/6-31G+(d,p) y del 99.98 % en el nivel mPW1PW91/6-311+G(d,p). Esta predicción fue respaldada por el cálculo de los espectros DCE (Yang et al., 2020) del isómero 5a*S*,8*S*,15*bR*,16a*R* y su enantiómero, utilizando el método de la teoría funcional de densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). El espectro calculado para el isómero 5a*S*,8*S*, 5*bR*, 16a*R* fue idéntico al espectro experimental (Fig. 19B).



**Figura 19.** (A) Estructura propuesta para la alboluteina B; (B) Comparación del espectro experimental de DCE para el compuesto **41** (líneas punteadas) con los enantiómeros propuestos 5aS,8S,15bR,16aR (anaranjado) y 5aR,8R,15bS,16aS (azul).

### 5.1.2.3 Caracterización 1-*H*-Indol-3-carbaldehído (**43**) de las FrMAIb7 y 8

El compuesto **43** se aisló como un sólido cristalino color ámbar. Su estructura se confirmó inequívocamente por difracción de rayos X (Fig. 20).



**Figura 20.** Representación ORTEP obtenida por difracción de rayos X del compuesto **43**.

**Tabla 7.** Datos de RMN obtenidos para la muestra de alboluteina B (**41**), realizada en CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H (700 MHz) y <sup>13</sup>C (175 MHz).

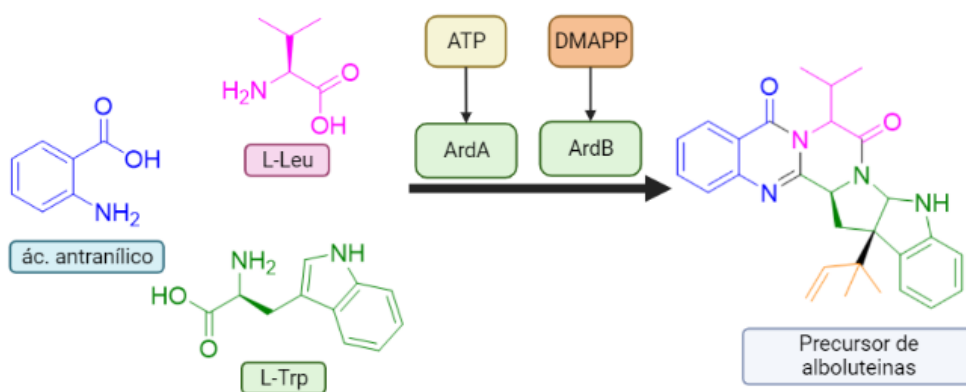
Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	HMBC	NOESY
1	122.1	7.30 (dd, 7.2, 0.7)	3, 4a, 16a	3, 4, 16β
2	119.0	6.87 (ddd, 7.8, 0.7)	1, 4, 16a, 16b	1
3	129.9	7.18 (ddd, 7.8, 0.7)	1, 4, 16b	2, 4
4	108.7	6.53 (dd, 7.2, 0.7)	1, 2, 16b	5
4a	146.5			
5		4.73 (s, N-H)	4a, 16a, 16b, 18	4, 19, 21, 22
5a	111.0			
7	169.5			
8	61.0	5.30 (d, 9.5)	7, 10, 15a, 17, 17a, 17b	17, 17a, 17b
10	161.3			
10a	120.3			
11	126.9	8.23 (dd, 8.0, 1.6)	10, 13, 14a	12
12	127.6	7.45 (ddd, 8.5, 7.1, 1.6)	10a, 13, 14	13
13	134.3	7.65 (ddd (8.5, 7.1, 1.6)	11, 14a	12, 14
14	128.0	7.35 (dd, 8.0, 1.6)	10a, 12	13
14a	146.3			
15a	148.1			
15b	90.5			
16	51.5	α: 4.00 (d, 14.1) β: 2.51 (d, 14.1)	7, 5a, 15a, 15b, 16b 5a, 15a, 16a, 16b	1, 16β 1, 16α, 16a
16a	90.8			
16b	131.6			
17	33.4	2.72 (m)	7, 8, 17a, 17b	8, 17a, 17b, 19
17a	19.6	1.00 (d, 6.8)	8, 17, 17b	8, 17
17b	20.2	1.32 (d, 6.8)	8, 17, 17a	8, 17
18	44.9			
19	143.7	6.03 (dd, 17.6, 10.8)		5, 17, 20β, 21, 22
20	114.5	α: 5.19 (dd, 17.6, 1.1) β: 5.14 (dd, 10.8, 1.1)	18, 19 18	21, 22 19
21	29.7	1.25 (s)	18	5, 16a, 17, 19
22	29.7	1.25 (s)	18	5, 16a, 17, 19
16a-OH		7.17(s)		16β, 21, 22
15b-OH		2.77 (s)		--

Datos asignados con base en el análisis del espectro HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) y HMBC; los valores de *J* (Hz) se encuentran dentro del paréntesis.

#### 5.1.2.4 Aislamiento del ácido antranílico (44) de la FrMA1b9-18

El ácido antranílico fue el compuesto mayoritario del extracto de *M. albolutea*, y se identificó por métodos espectroscópicos.

De acuerdo con la biosíntesis propuesta para los compuestos tipo ardemina y sartoriglabrina es indispensable para la biosíntesis de este tipo de moléculas, incluyendo a las alboluteinas presentadas en este trabajo, en analogía con la biosíntesis sugerida por Haynes y colaboradores (Haynes et al., 2013) en la Fig. 21 se encuentra la propuesta con respecto a las alboluteinas.



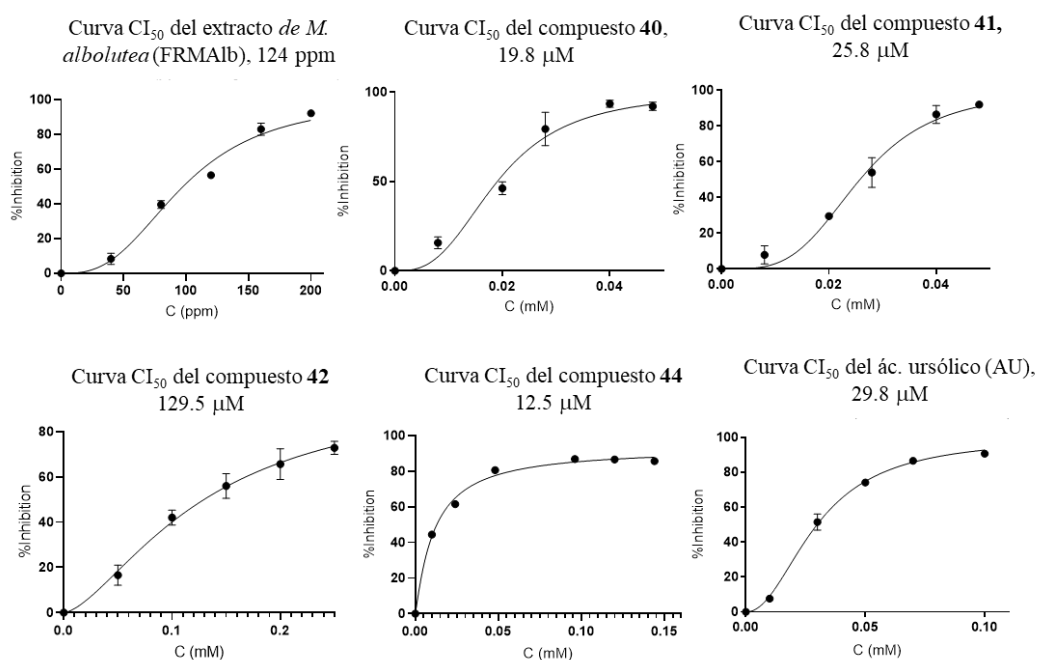
**Figura 21.** Dominios enzimáticos ArdA y ArdB, propuestos para la biosíntesis de alboluteinas en analogía con la propuesta de Haynes y colaboradores. Pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), Adenosín trifosfato (ATP). Imagen creada en BioRender y ChemDraw.

#### 5.1.3 Ensayos enzimáticos

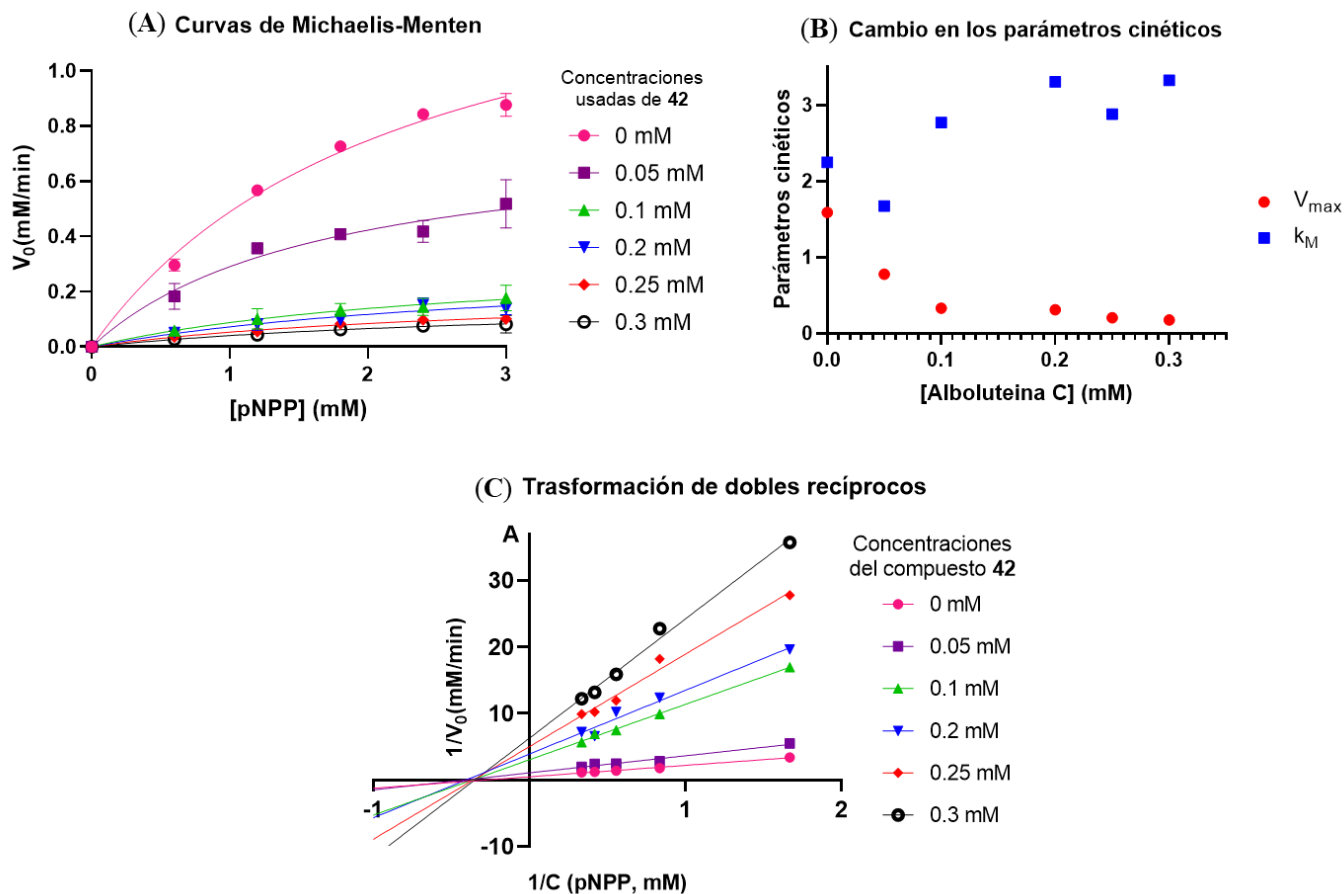
Una vez establecida la estructura de los compuestos se determinó la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>). Todos los compuestos evaluados, mostraron un efecto dependiente de la concentración; la forma de las curvas generadas fue de tipo Michaelis-Menten y el

coeficiente de regresión lineal en todos los casos fue mayor a 0.99. Los valores de  $CI_{50}$  de los productos **40** y **41** fueron similares al del AU, utilizado como control positivo (Fig. 22).

Los estudios de cinética del producto **42** permitieron identificar al inhibidor como de tipo alostérico (Copeland, 2000; Segel, 1994). Los valores de  $R^2$  para cada ajuste de con el compuesto **42** fueron: competitivo = 0.96, acompetitiva = 0.97 y no competitiva = 0.97; el mejor valor fue para la inhibición de tipo no competitivo (Fig. 23A). Al aumentar la concentración de la alboluteina C, la  $V_{MÁX}$  disminuye y los valores de  $K_M$  no muestran cambios significativos, sugiriendo una inhibición de tipo no competitivo (Fig.23B). Finalmente, todas las rectas obtenidas usando el método de Lineweaver-Burk presentaron una intersección en un mismo punto del eje negativo “x”; también la pendiente y la intersección con el eje “y”, aumentan proporcionalmente con el incremento de la concentración de inhibidor (Fig. 22C). Este análisis sustenta que el tipo de inhibición de la alboluteina C contra la PTP1B es no competitivo.



**Figura 22.** Curvas de % de I en función de la concentración de los compuestos; cada punto representa tres replicas. Debajo del título se encuentran los valores de  $CI_{50}$ .



**Figura 23.** Gráficos de la cinética de inhibición correspondiente a la alboluteina C (42). (A) Curvas usando las ecuaciones de inhibición no competitiva; (B) Representación gráfica de los parámetros cinéticos; (C) Rectas de dobles recíprocos.

#### 5.1.4 Resultados de acoplamiento y dinámica molecular

Para los ensayos de acoplamiento se utilizó la estructura del dominio catalítico de la PTP1B (PDB: 1T49), como control positivo de usó AU, el mismo empleado en los ensayos *in vitro*. Los resultados indicaron dos sitios de unión, uno alostérico y otro catalítico, sin embargo, las energías de unión asociadas a la interacción de las moléculas con el sitio alostérico fueron las mejores (Tabla 8, Fig. 23).

El sitio alostérico con el que interaccionaron los compuestos **40–44** y el AU está formado por los siguientes aminoácidos: Ala189, Leu192, Asn193, Phe196, Lys197, Glu200, Glu276, Phe280, Ile281 Val287, Gln290. La mayoría estos residuos forman parte de uno de los sitios alostéricos con más estudios, el formado por las hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  y  $\alpha_7$  (Hongdusit and Fox, 2021; Wiesmann et al., 2004); las interacciones que predominaron fueron las de tipo no polar e hidrofóbicas, destacando las de tipo apilamiento- $\pi$  entre la Phe196 con el anillo de benceno proveniente del ácido antranílico, y la Phe280 con el anillo del residuo de triptófano presente en todos los compuestos (Tabla 8, Fig. 24).

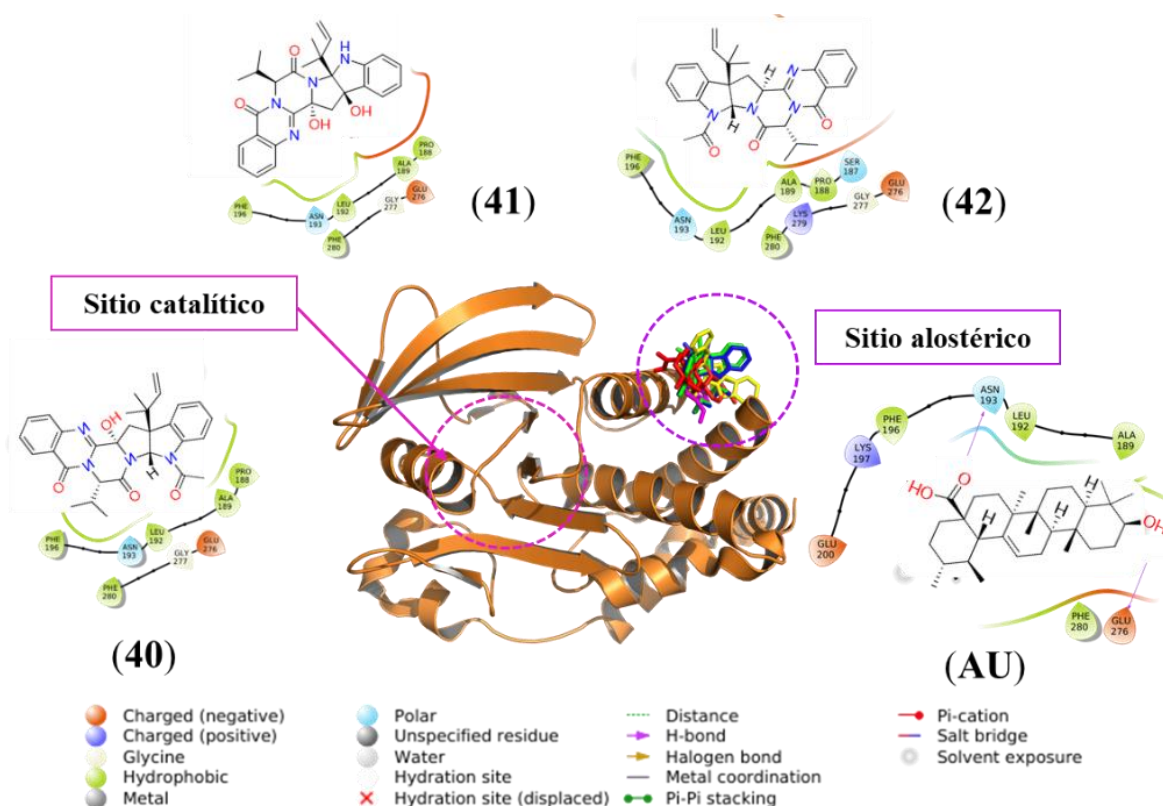
Al momento de la publicación del artículo no se contaba con el modelo completo de la PTP1B. Por lo tanto, con la finalidad de confirmar el posible sitio de unión de las alboluteinas, se repitieron los acoplamiento moleculares usando la PTP1B depositada en AlphaFold, los resultados se presentan en la Tabla 9 y la Fig. 25. El análisis de las interacciones entre la PTP1B<sub>1-400</sub> y los compuestos **40-42** reveló que se siguen uniendo cerca de la región alostérica formada por las hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  y  $\alpha_7$ ; en el caso del compuesto **40** únicamente interacciona con algunos residuos presentes en las hélices  $\alpha_3$  y  $\alpha_6$ ; el compuesto **41**, tiene interacción con tres aminoácidos de la hélice  $\alpha_3$ , una asa (Ser190-Thr178) que une hélice a y una hebra b, esta región se encuentra cerca de la zona intrínsecamente desestructurada (Leu 299-Asp400); **42**, se coloca en una región formada por cuatro aminoácidos de la  $\alpha_6$  y  $\alpha_1'$ . Finalmente, el AU solo presentó interacciones con las hélices  $\alpha_6$  y  $\alpha_7$ . En resumen las regiones con las que interaccionaron las alboluteinas y el AU con la PTP1B<sub>1-400</sub> no corresponde por completo al sitio alostérico reportado por Wiesmann y colaboradores, sin embargo, siguen siendo regiones no conservadas de la enzima (Liu et al., 2022). Los valores de  $\Delta G$  están en el mismo orden de magnitud que los presentados en la tabla 8; sin embargo, los valores de  $K_i$  son mejores en los acoplamiento usando la PTP-1B<sub>1-400</sub> (Tabla 9).



**Tabla 8.** Resumen de los resultados *in vitro* e *in silico* entre la PTP1B<sub>1-298</sub> y los compuestos aislados de *M. albolutea*.

Compuesto	Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición		Estudios de acoplamiento molecular	
	CI <sub>50</sub> (μM)	<sup>1</sup> K <sub>i</sub> (μM)	<sup>2</sup> ΔG (Kcal mol <sup>-1</sup> )	Residuos de aminoácidos con interacciones
40	19.8 ± 1.4	0.202	-9.13	Pro188, Ala189, Leu192, Asn193, Phe196, Glu276, Gly277 y Phe280
41	25.8 ± 1.8	0.131	-9.39	Pro188, Ala189, Leu192, Asn193, Phe196, Glu276, Gly277 y Phe280
42	129.5 ± 2.6	0.267	-8.97	Ser187, Pro188, Ala189, Leu192, Asn193, Phe196, Glu276, Gly277, Lys279 y Phe280
AU	29.0 ± 2.8	0.350	-10.17	Ala189, Leu192, Asn193, Phe196, Lys197, →Glu200, →Glu276 y Phe280

<sup>1</sup>Constante de afinidad a 298.15 K; <sup>2</sup>Energía de unión; Tipos de interacciones: ► Hidrofóbicas, ► Polares ► Carga negativa, ► Carga positiva, → Puentes de hidrógeno.

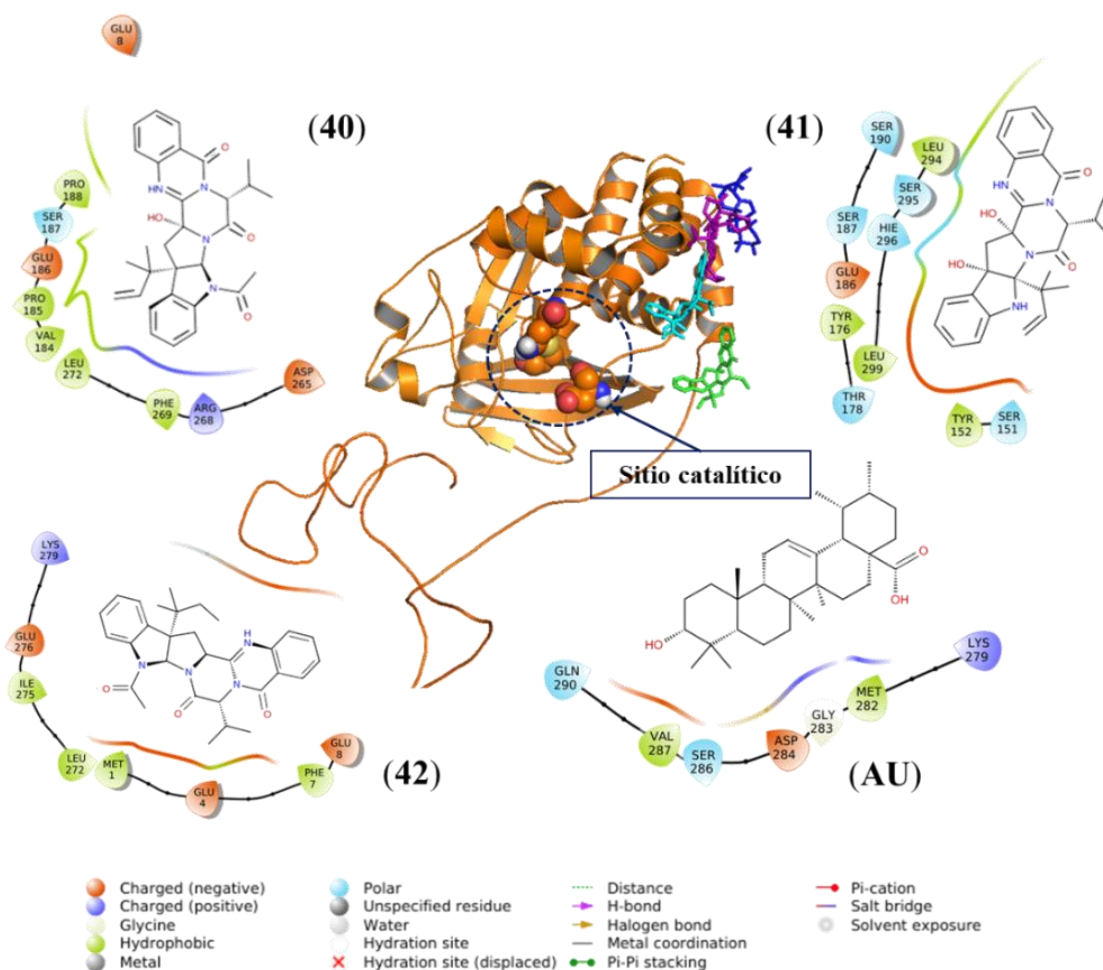


**Figura 24.** Interacciones en dos dimensiones entre las alboluteinas A-C, el AU y la PTP1B. En el centro de color naranja se presenta el diagrama de cintas de la PTP1B<sub>1-298</sub> (1T49), en líneas rojas (40), verdes (41), azules (42) y magenta AU; imágenes creadas en PyMOL y Maestro.

**Tabla 9.** Resultados del acoplamiento molecular entre la PTP1B<sub>1-400</sub> y las alboluteinas A-C.

Compuesto	<sup>1</sup> Ki (μM)	<sup>2</sup> ΔG (Kcal mol <sup>-1</sup> )	Residuos de aminoácidos con interacciones
40	5.4	-7.16	Glu8, Val184, Pro185, Glu186, Ser187, Pro188, Asp265, Arg268, Phe269
41	8.25	-6.91	Ser151, Tyr152, Tyr176, Thr178, Glu186, Ser187, Ser190, Leu294, Ser295, His296, Leu299
42	15.7	-6.53	Met1, Glu4, Phe7, Glu8, Leu272, Ile275, Glu276, Lys279
AU	11.19	-6.73	Lys279, Met282, Gly283, Asp284, Ser286, Val287, Gln290

<sup>1</sup>Constante de afinidad teórica a 298.15 K; <sup>2</sup>Energía de unión; Tipos de interacciones: ► Hidrofóbicas, ► Polares  
 ► Carga negativa, ► Carga positiva, → Puentes de hidrógeno.



**Figura 25.** Interacciones en dos dimensiones entre las alboluteinas A-C, el AU y la PTP1B. En el centro de color naranja se presenta el diagrama de cintas de la PTP-1B<sub>1-400</sub> (Q9PT91), en líneas color cian (40), verdes (41), magenta (42) y azul AU; imágenes creadas en PyMOL y Maestro.

Para complementar estos resultados se realizó una dinámica molecular, los resultados se presentan en la Tabla 10. Los complejos formados entre la PTP1B y las alboluteinas fueron termodinámicamente favorables, todos presentaron un  $\Delta G$  negativo. La entropía ( $\Delta S$ ) es el parámetro que más contribuye al valor de la energía del sistema y es un reflejo de que la interacción entre la proteína y los compuestos será espontánea y energéticamente favorecida.

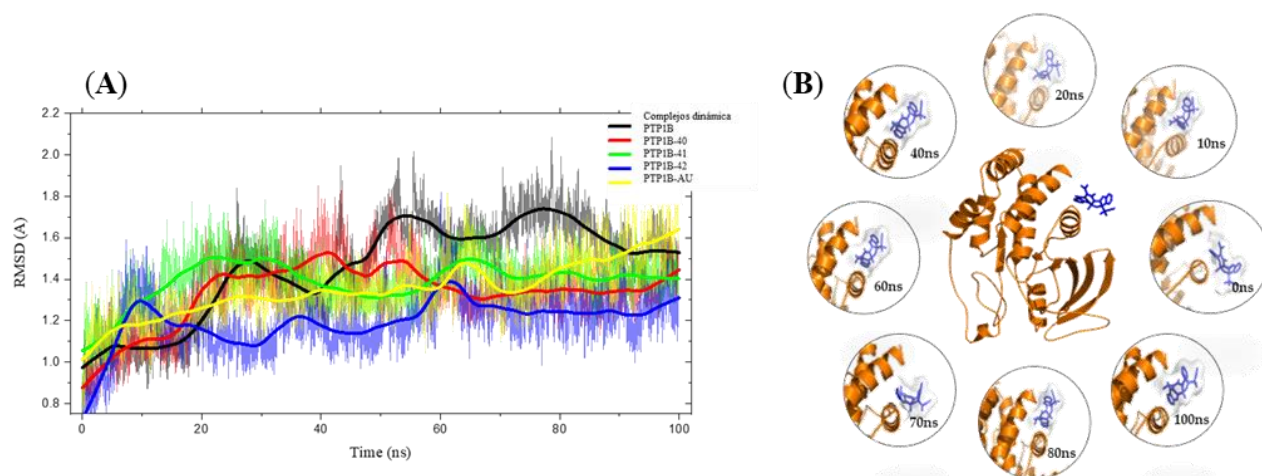
**Tabla 10.** Parámetros termodinámicos obtenidos después de la dinámica molecular entre las alboluteinas y la PTP1B.

Complejos con la PTP1B	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$
<b>40</b>	-10.75±3.2	-28.61±2.4	-14.85±2.1
<b>41</b>	-6.34±1.8	-23.49±3.5	-17.14±1.8
<b>42</b>	-10.36±3.4	-28.97±4.1	-18.60±3.7
<b>AU</b>	-3.11±1.2	-21.44±2.2	-18.32±3.2

La estabilidad de las interacciones entre la PTP1B y las alboluteinas después de 100 ns de simulación se evaluó con la desviación cuadrática media (RMSD). Al comparar las fluctuaciones de los átomos en la conformación inicial de la proteína con las generadas después de la interacción con el ligando, se puede observar que, en todos los casos, los cambios en el esqueleto de la proteína son menores al interactuar con las alboluteinas, y el complejo alcanza el equilibrio en los últimos minutos de la simulación, es especial el complejo formado con la alboluteina C (Fig. 26A y B). Con las alboluteinas A y B, así como con el ácido ursólico los resultados muestran que el sistema continúa evolucionando en busca de estados termodinámicos más favorecidos.

### 5.1.5 Predicciones ADMET de los productos aislados de *M. albolutea*

Se estimaron las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y toxicológicas (ADMET) de los compuestos aislados de *M. albolutea*, de esta manera es posible predecir algunas de las propiedades necesarias para asegurar la eficacia y seguridad de una molécula con miras a convertirse en un fármaco. Solo se analizaron las propiedades de las alboluteinas, las moléculas **43** y **44** ya cuentan con datos reportados al respecto (Wishart et al., 2006).



**Figura 26.** (A) RMSD en función del tiempo para los complejos formados PTP1B-alboluteinas y AU; (B) Modelos estructurales entre la PTP1B-alboluteina C durante 100 ns de dinámica molecular.

En el caso de las propiedades fisicoquímicas, se evaluaron las contenidas en las reglas de Lipinski, solo a fin de estimar las propiedades de absorción pasiva de los tripéptidos, pero considerando que los productos naturales (PNs) no cumplen estas reglas, ya que su mecanismo de absorción es diferente; **41**, **42** y la metformina (M) no presentaron ninguna violación a las reglas, lo que significa que tienen características fisicoquímicas similares a las que presentan los fármacos aprobados; el compuesto **40** excede la masa molecular y el AU tiene un  $\text{LogP}_{o/w}$  mayor a 5 (Tabla 11).

La plataforma de SwissADME también nos proporciona una gráfica donde relaciona los valores normalizados que deben tener algunas propiedades fisicoquímicas para ser considerados potenciales fármacos orales, el radar de biodisponibilidad (Daina et al., 2017). De estas gráficas se puede concluir que los compuestos **40–42** tienen parámetros fisicoquímicos similares a los de un fármaco (Druglikeness), pero es importante señalar a excepción de flexibilidad, los valores de las demás propiedades se encuentran en el límite superior (Fig. 26). Cabe resaltar, que los productos naturales o sus derivados aprobados como fármacos, presentan más de dos infracciones a las reglas de Lipinski, siendo las más comunes la masa molecular y el  $\text{LogP}_{o/w}$  (Boufridi and Quinn, 2018).

La capacidad de permear en la barrera hematoencefálica (BHE), a nivel GI y su potencial como sustrato o inhibidor de la P-gp se puede observar en la gráfica de huevo hervido (Fig. 27), esta gráfica representa la capacidad que tienen los compuestos para ser permear de forma pasiva la BHE (hidrofóbicos) o en el tracto gastrointestinal (hidrofílicos). Los compuestos **40** y **41** no atraviesan la BHE y son sustratos de la P-gp; las predicciones para el compuesto **42**, muestran que podría permear la BHE y que no presentaría interacción con la P-gp. Por lo tanto **40** y **41** cumplirían con los requisitos para ser absorbidos a nivel gastrointestinal y ser depurados de zonas críticas al ser sustratos de la P-gp (el sistema nervioso central y el aparato reproductor).

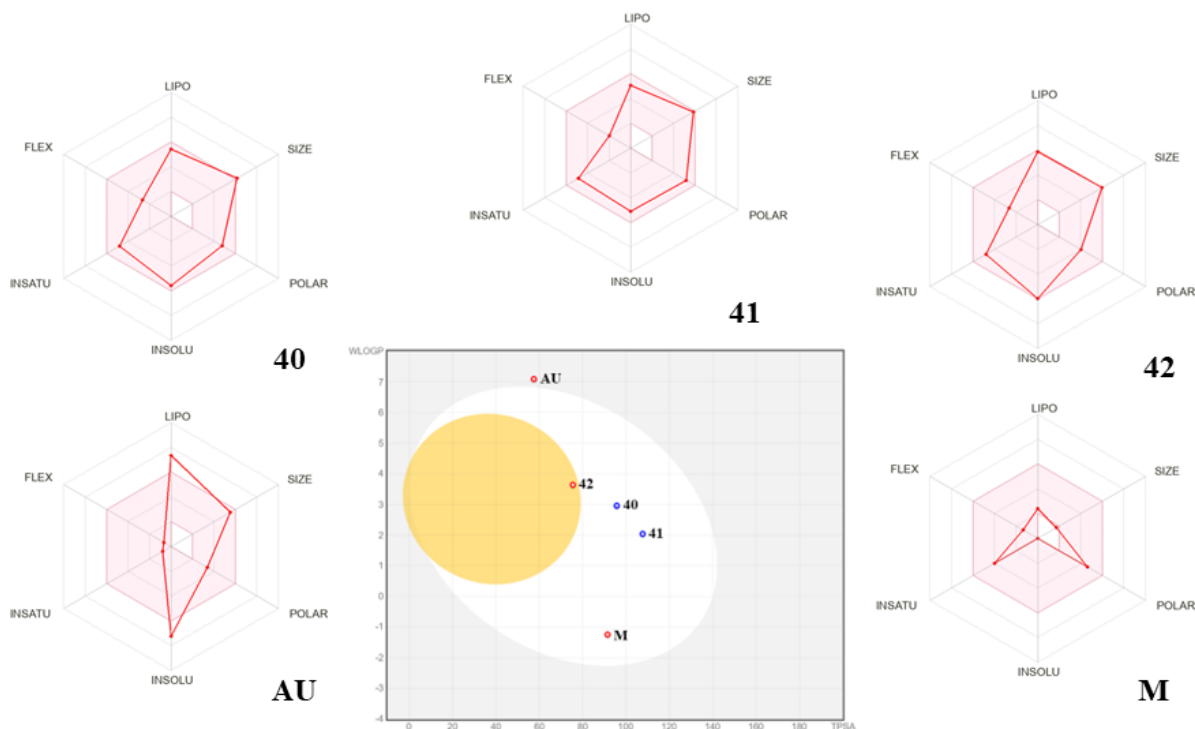
Con respecto a su potencial como sustancias mutagénicas, teratogénicas, cancerígenas e irritantes, ninguna de las moléculas presentó alertas (Sander et al., 2015).

En cuanto a su interacción con las cinco isoformas de CYP450 analizadas, las alboluteinas A-C inhiben a tres (2C19, 2C9, 2A4), lo que implicaría una difícil eliminación, una potencial interacción fármaco-fármaco y un aumento de su vida media dentro del cuerpo; el AU y la M no inhiben ninguno de los CYPs.

Otro parámetro que evalúa la toxicidad es la presencia de fragmentos inestables o dañinos. Comparándolos con una base de datos reporta por Brenk y colaboradores (Brenk et al., 2008), las alboluteinas presentaron un único fragmento problemático proveniente del residuo de isopreno. Finalmente, ninguno de los compuestos exhibió una alerta como compuesto PAINS.

En síntesis, las alboluteinas presentaron propiedades fisicoquímicas similares a los fármacos y no presentaron ninguna alerta de toxicidad grave, sin embargo, las alertas presentadas por el compuesto **42**, nos indican que es necesario realizar la optimización de las alboluteinas A-C (Fig. 27 y Tabla 11).

Teniendo esto en mente los resultados de las predicciones, las primeras modificaciones que resulta convenientes, sin sacrificar las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, serían: la eliminación del residuo de isopreno sobre el C-16a y el grupo acetilo sobre N-5, conservar los grupos hidroxilo sobre C-15b y C-16a, esta molécula se identificó como **41a** (Fig. 28). Con esta última se realizaron nuevamente las predicciones de las propiedades fisicoquímicas (Tabla 11) y farmacocinéticas, así como el acoplamiento molecular.



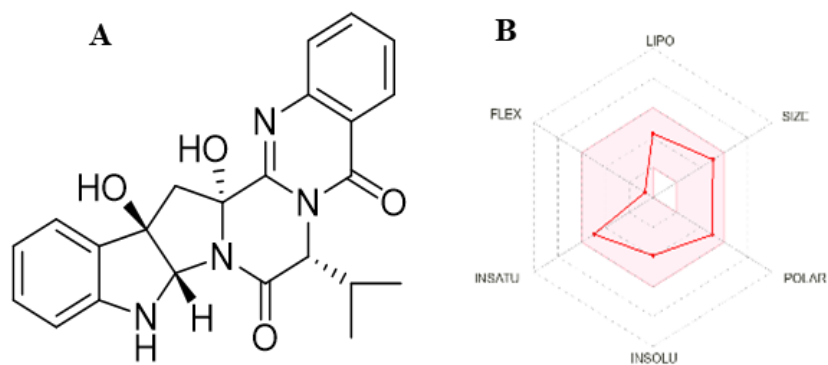
**Figura 27.** Radar de biodisponibilidad de las alboluteinas A-C, AU y M, representa del rango óptimo (en rosa) para cada propiedad presentada en los ejes; en el centro el modelo de huevo hervido usado para la predicción de permeabilidad GI y BHE; en azul los sustratos de la P-gp, en rojo los compuestos que no serían sustratos de P-gp. Imagen creada por SwissADME.

Las propiedades fisicoquímicas de **41a** se conservan e incluso mejoran, tendría una absorción alta a nivel GI, sería sustrato de P-gp, su solubilidad aumenta, cumple con las reglas de Lipinski (aunque no es una condición indispensable en el caso de los PNs) y en su radar de biodisponibilidad los valores de las propiedades fisicoquímicas están por debajo de los máximos. En cuanto a su toxicidad, **41a** no presenta alertas como sustancia mutagénica, teratogénica, cancerígena e irritante; ni sería inhibidor de las isoformas de CYP450 ensayadas (Fig. 28 y Tabla 11). Los resultados de acoplamiento molecular mostraron que se sigue

comportando como un inhibidor alostérico de la PTP1B e interacciona en la misma cavidad que las alboluteinas, conservando las interacciones hidrofóbicas y los apilamientos- $\pi$ .

**Tabla 11.** Propiedades fisicoquímicas predichas para una de las alboluteinas y el AU

Propiedades		Compuestos				
		40	41	41a	42	AU
Fisicoquímicas	Solubilidad H <sub>2</sub> O	Moderada	Moderada	Soluble	Pobre	Pobre
	Fracción Csp <sup>3</sup>	0.4	0.39	0.35	0.4	0.9
	Enlaces rotables	4	3	1	4	1
	TPSA Å <sup>2</sup>	95.74	107.69	107.69	75.51	57.53
Reglas de Lipinski	H-donadores	1	3	3	0	2
	MW g/mol	512.6	486.56	418.45	496.6	456.7
	Log P <sub>o/w</sub>	3.48	3.21	1.52	3.87	5.93
	H-aceptores	5	5	5	4	3
	# de infracciones	1	0	0	0	1
Farmacocinéticas	<b>Absorción GI</b>	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja
	Permeabilidad BHE	No	No	No	Si	No
	Sustrato P-gp	Si	Si	Si	No	No
	Biodisponibilidad Score	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56
	Inhibición	CYP2C9C YP3A4	CYP1A2 CYP2C9 CYP2D6	Ninguno	CYP2C19 CYP2C9 CYP3A4	Ninguno
Química Medicinal	Alertas PAINS	0	0	0	0	0
	Alertas Brenk	1	1	0	1	1
	Infracciones	2	2	1	2	2
	Leadlikeness	2	2	1	2	2
	Accesibilidad de síntesis	5.3	5.15	4.63	5.2	6.21



**Figura 28.** (A) Compuesto derivado de la alboluteina B (41a), se eliminaron los fragmentos problemáticos (residuo de isopreno y el grupo acetilo); (B). Radar de biodisponibilidad de 41a.



## 5.2 Resultados nuevos inhibidores de la PTP1B a partir de una pequeña quimioteca de productos naturales de laboratorio 124 del Departamento de Farmacia

### 5.2.1 Evaluación enzimática y determinación del espacio químico

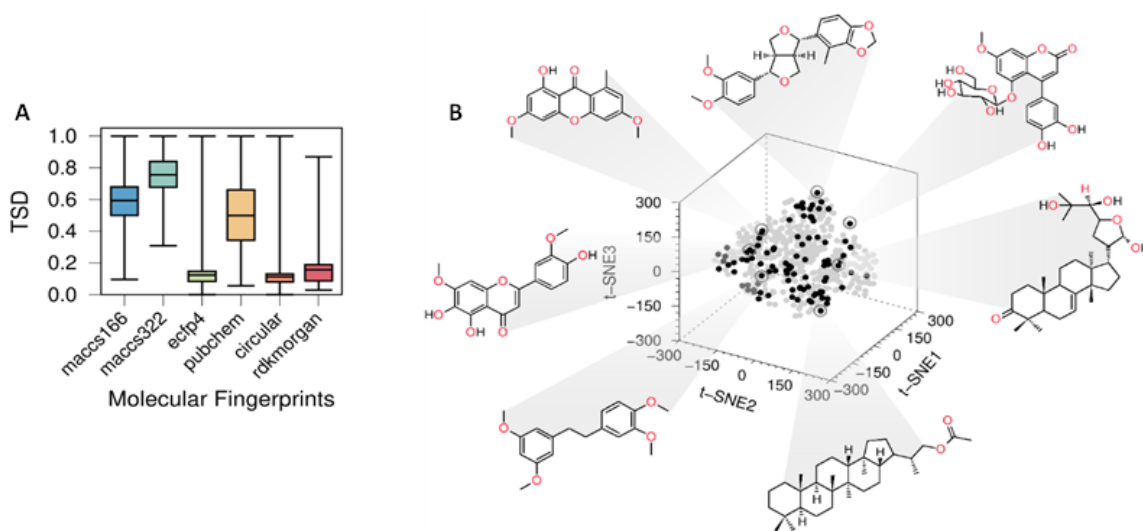
Los productos naturales (PNs) han sido una fuente de moléculas novedosas y de inspiración para el desarrollo de nuevos fármacos (Newman and Cragg, 2020), en especial las colecciones de PNs, que aunque sean pequeñas, si son diversas pueden ser fuente de compuestos con altas probabilidades de convertirse en fármacos (Harvey et al., 2010). En este proyecto tomamos una pequeña quimioteca de 99 productos naturales derivadas de plantas medicinales y hongos (**1L–99L**), las cuales fueron analizadas mediante un cribado enzimático bien estandarizado que sigue una metodología ampliamente usada en nuestro grupo de trabajo. De acuerdo con los objetivos de esta tesis, nos interesaba encontrar nuevos inhibidores de la PTP1B, que fueran estructuralmente diferentes al AU pero con una potencia de actividad similar “scaffold hops” o mejor.

El ensayo enzimático inicial a dos concentraciones (0.2 y 1 mM) permitió la identificación de cuarenta y siete compuestos (**1L–11L, 14L, 15L, 18 L, 25L, 32L, 34L, 40L, 41L, 43L, 46L, 47L, 49L–51L, 53L, 54L, 56L, 58L, 63L, 64L, 67L, 73L, 77L, 82L, 84L–86L, y 90L–94L**) con un % de inhibición igual o mejor que el obtenido para el AU ( $96.67 \pm 0.53$  mM); Los porcentajes de inhibición para los 99 compuestos evaluados, así como sus estructuras se encuentran en la Tabla A2. A los 47 inhibidores con mejor actividad se les determinó su  $pCI_{50}$  ( $pCI_{50} = -\text{Log}CI_{50}$ ), y las curvas generadas para la obtención de este parámetro, así como los ajustes generados se presentan en la Fig. A21 y la Tabla A3.

En colaboración con el Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz y usando los valores de  $pCI_{50}$  calculados de los 47 compuesto más activos se realizó un estudio de diversidad estructural a través de su comparación con una base de datos de productos naturales mexicanos BIOFAQUIM. La huella digital molecular se eligió mediante el análisis de las gráficas de cajas y bigotes o box plot, donde las huellas digitales moleculares usadas para representar a los inhibidores se encuentran en función de la distribución acumulada del coeficiente de Tanimoto (TDS); se eligió aquella huella que presentara un rango intercuartil más amplio, para asegurar que el 50 % de las



moléculas estuviera representada, por esta razón se eligió la fingerprint desarrollada por PubChem (Fig. 29A).

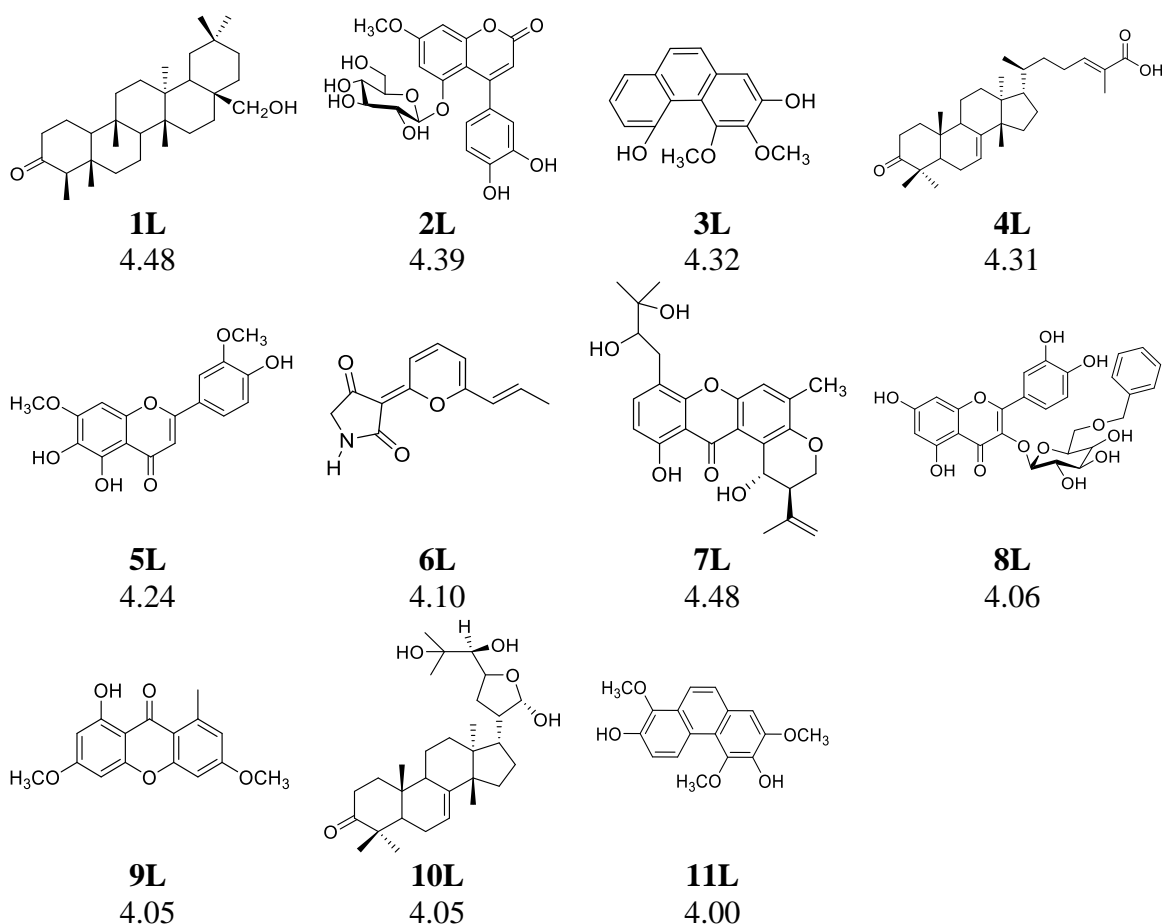


**Figura 29.** (A) Gráfica de las diferentes fingerprints probadas para la representación de las moléculas en función de la distribución acumulada a partir del coeficiente de Tanimoto; (B) Representación 3D del espacio químico, los puntos grises representan los compuestos depositados en la base de datos BIOFACQUIM, y los puntos negros los 47 inhibidores de la PTP1B.

Usando la fingerprint de PubChem y un el método de reducción de dimensiones no lineal (t-SNE) (Belkina et al., 2019) se realizó el estudio del espacio químico. El espacio químico se define como la representación visual de un conjunto de M compuestos en función de N descriptores, las coordenadas para cada compuesto dentro del espacio dependen del descriptor usado para su representación (González-Medina et al., 2017); la construcción de un espacio químico, sirve para realizar estudios de diversidad y similitud molecular (Medina-Franco et al., 2021). El análisis del espacio químico reveló que los 47 compuestos inhibidores de la PTP1B se distribuyen a todo lo largo y ancho del espacio formado por los productos naturales mexicanos, de tal forma que los productos seleccionados son una muestra representativa, diversa y dejando al descubierto la variedad estructural de los inhibidores de la PTP1B (Fig. 29B).

El análisis comparativo de los valores de  $pCI_{50}$  permitió seleccionar 11 compuestos denominados “hits” con una potencia de inhibición en el mismo orden de magnitud que la

calculada para el AU ( $pIC_{50} = 4.66 \pm 0.004$ ). Los compuestos seleccionados son canofilol (**1L**) un triterpenoide de tipo friedelano (Calzada et al., 1991), 5-*O*-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina (**2L**) (Guerrero-Analco et al., 2005), 3,4-dimetoxi-2,5-fenantreniol (**3L**) (Estrada et al., 1999), ácido masticadienónico (**4L**) (Rivero-Cruz et al., 2010), 4',5,6-trihidroxi-3',7-dimetoxiflavona (**5L**) (Salinas-Arellano et al., 2020), *E/Z*-vermelhotina (**6L**) (Leyte-Lugo et al., 2012), tajixantona hidratada (**7L**) (Figuroa et al., 2009), quercetina-3-*O*-(6''-benzoil)- $\beta$ -D-galactosido (**8L**) (Flores-Bocanegra et al., 2015), liquexantona (**9L**) (Rojas et al., 2000), melianodiol (**10L**) (Jimenez et al., 1998) y confusarina (**11L**) (Morales-Sánchez et al., 2014), Fig. 30.



**Figura 30.** Compuestos hit con un valor de  $pIC_{50}$  similar al ácido ursólico (AU, 4.66). Debajo del número de identificación para cada compuesto se presenta su valor de  $pIC_{50}$

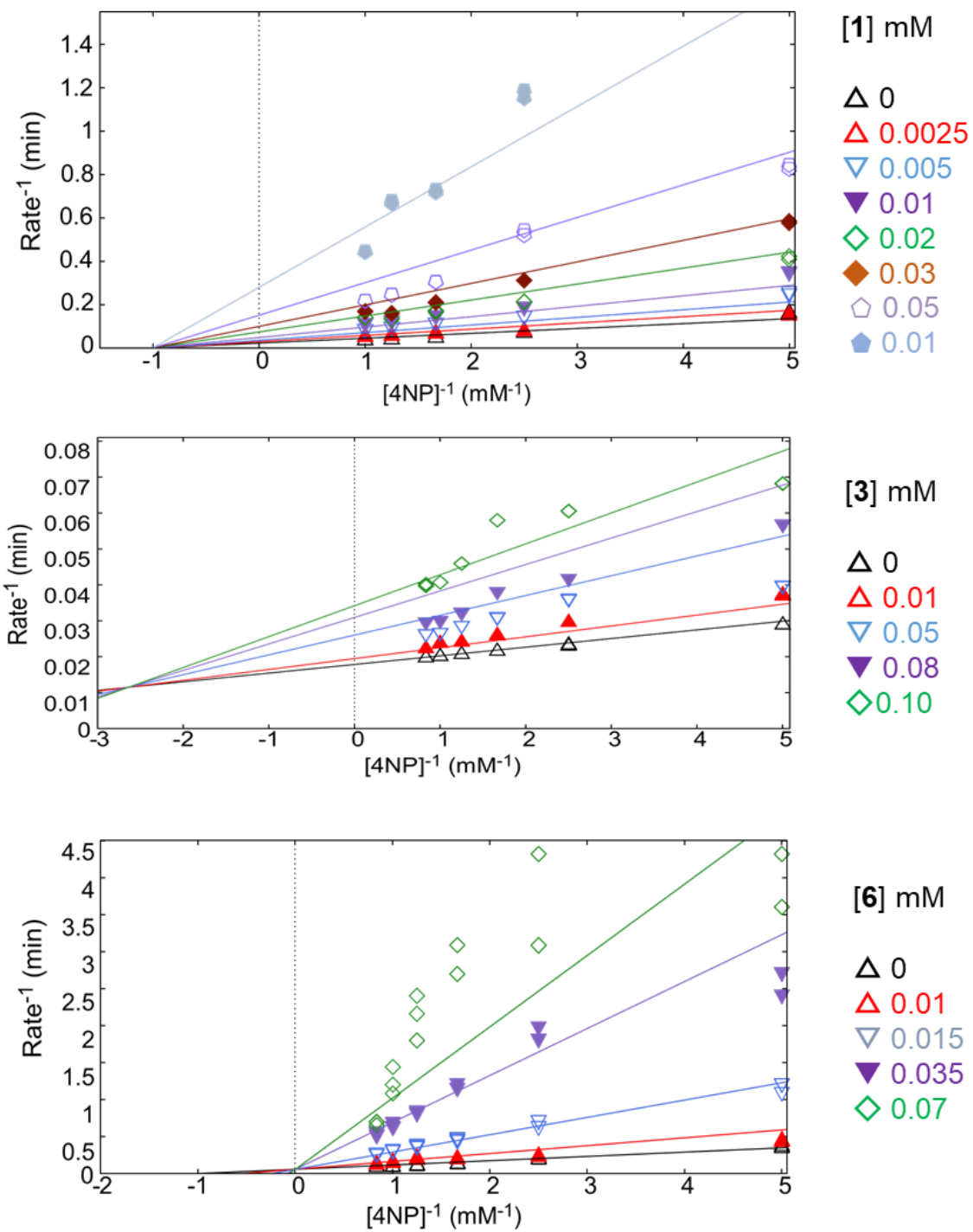
## 5.2.2 Estudios de cinética enzimática

Se seleccionaron a **1L**, **5L** y **6L**, compuestos estructuralmente diferentes, entre los más activos y con cantidades suficientes para un análisis de cinética que nos permitiera identificar su mecanismo de inhibición. De acuerdo los patrones obtenidos en las gráficas de Lineweaver-Burk o dobles recíprocos, **1L** es un inhibidor no competitivo y **3L** un inhibidor mixto (Tabla 12 y Fig. 31), la pendiente y la intersección con el eje de las ordenadas cambian a medida que aumenta la concentración del inhibidor, además la  $V_{MÁX}$  disminuye y los valores de  $K_M$  no muestran cambios significativos; sin embargo, los valores de las constantes de inhibición para cada mecanismo son diferentes  $K_{Icu} \neq K_{IC} \neq K_{IU}$  (Copeland, 2000; Spector and Cleland, 1981). En el caso de la *E/Z* vermelhotina (**6L**), los datos se ajustan a una inhibición parabólica competitiva; el análisis estadístico de este ajuste predijó que dos moléculas de **6L** se unen para interactuar con el sitio activo (inhibición competitiva); en este caso, el valor de  $V_{MÁX}$  no muestra ningún cambio, pero los valores de  $K_M$  cambian significativamente. La regresión no lineal para obtener los gráficos de Michaelis-Menten y el valor de  $\chi^2$  asociados al ajuste, avalan los resultados obtenidos (Fig. 31).

**Tabla 12.** Resultados de las cinéticas de inhibición enzimáticos para los compuestos seleccionados

Ensayos enzimáticos			
Compuestos	Reduce $\chi^2$ y <sup>1</sup> gdl.	<sup>2</sup> $V_{MÁX}$ (mM min <sup>-1</sup> )	<sup>3</sup> $K_I$ (mM)
<b>1L</b>	0.6, 93	44.1	$K_{Icu} = 0.009$
<b>3L</b>	21.4, 140	56.1	$K_{IU} = 0.11, K_{IC} = 0.04$
<b>6L E/Z</b>	0.08, 101	24.7	$K_{IC} = 0.031, K_{IC2} = 0.020$

<sup>1</sup>Grados de libertad, <sup>2</sup>Estimación de  $V_{MÁX}$ , <sup>3</sup>Estimación de la constante de inhibición



**Figura 31.** Gráficas de Lineweaver-Burk para los compuestos 1L, 3L y 6L.

### 5.2.3 Estudios de acoplamiento molecular

El análisis de acoplamiento molecular entre la *h*PTP1B<sub>1-400</sub> **1L**, **3L** y AU indica que estos podrían interactuar en la región alostérica formada por las hélices  $3\alpha$ ,  $6\alpha$  y  $7\alpha$ , cerca de la región C-terminal, Fig. 33, (Wiesmann et al., 2004).

El compuesto **6L** existe en solución como una mezcla isómeros *E* (**6a1L**, **6b1L**) y *Z* (**6a2L**, **6b2L**) (Fig. A23) en una proporción 6.4:3.6 (Leyte-Lugo et al., 2012), por lo tanto, el estudio de acoplamiento molecular se realizó con los cuatro conformeros más estables de ambos isómeros geométricos. Para todos los conformeros **6a1L**, **6a2L**, **6b1L** y **6b2L**, los eventos de acoplamiento de baja energía tuvieron lugar en dos cavidades contiguas pero separadas, designadas arbitrariamente como cavidad I y II (Figs. 34, A24-A27); la cavidad I se integra por residuos de aminoácidos aledaños al centro catalítico de la enzima, muchos de ellos menos conservados en la familia de PTPs, mientras que la cavidad II está formada por residuos de aminoácidos encargados de la catálisis enzimática (sitio activo). Los conformeros **6a1L** y **6a2L** presentaron interacciones energéticamente favorecidas en la cavidad I, que contiene residuos secundarios implicados en regiones menos conservadas de la enzima (Liu et al., 2022). En la cavidad II se unieron predominantemente **6b1L** y **6b2L**, lo que sustenta el mecanismo cinético de inhibición competitiva parabólica encontrado para **6L** *E/Z*. Los eventos de más baja energía se registraron en la cavidad II seguida por las poses en la cavidad I (Tabla 13, Figs. 32, A24-A27)

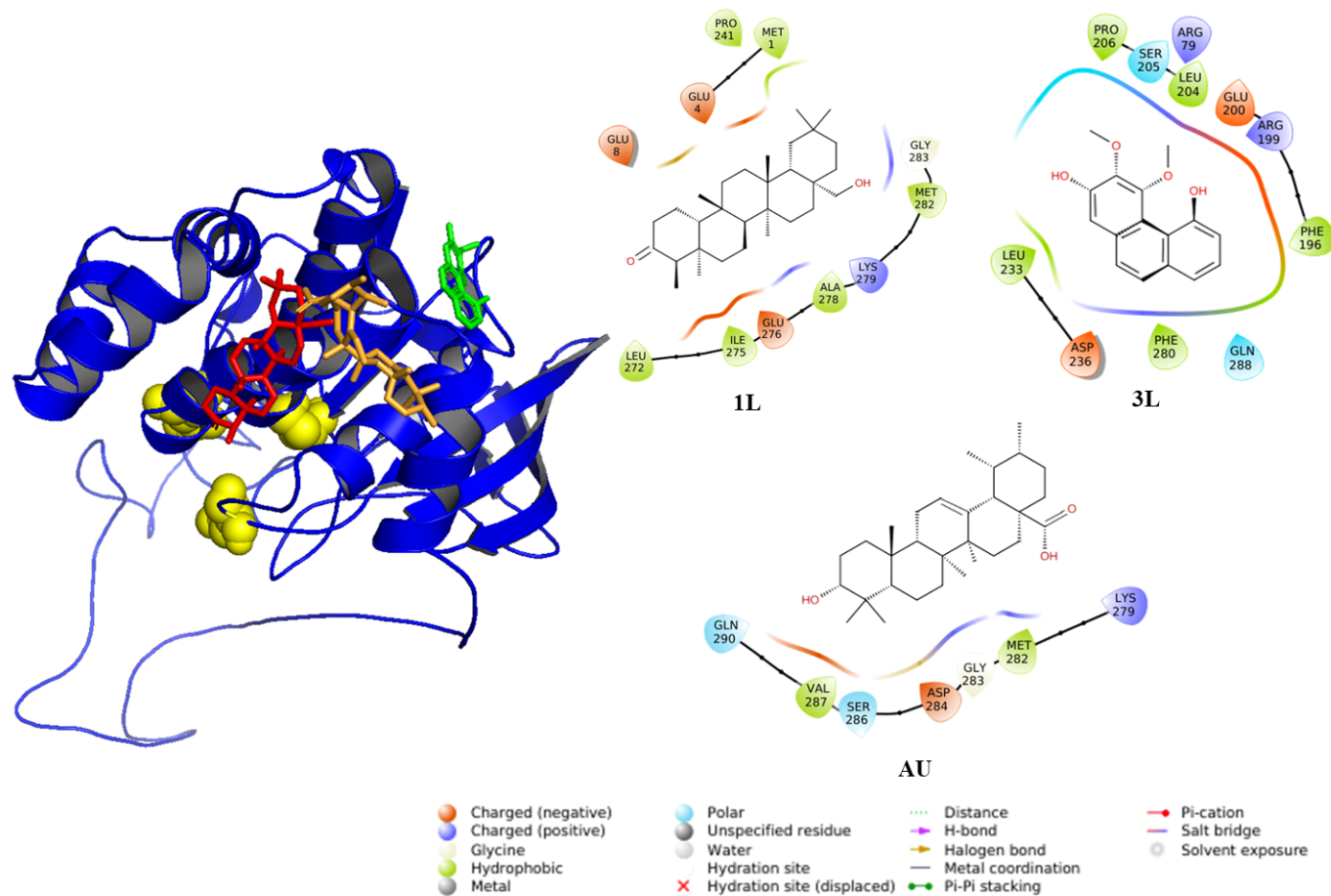
El compuesto **5L**, se acopla en una región integrada por la hélice  $3\alpha$  y un motivo compuesto de dos hebras  $\beta$  hidrofóbicas y la hélice  $9\alpha$ , que también es considerada como alostérica (Liu et al., 2022). Los compuestos **2L**, **4L**, **7L–11L** presentaron  $\Delta G$  entre  $-7.2$  y  $-5.6$  Kcal mol<sup>-1</sup> e interacciones de tipo hidrofóbicas; **4L**, **7L**, **9L** y **10L** se unen en la misma región que el UA formada por las hélices  $3\alpha$ ,  $6\alpha$  y  $7\alpha$ . En el caso de **2L**, **8L** y **11L** se posicionan cerca de las hélices  $3\alpha$  y  $9\alpha$  y dos hebras  $\beta$ , interacciones similares a las presentadas por **5L** (Figs. A28 y A29; Tablas A4 y A5).

Los aminoácidos involucrados y la naturaleza de las interacciones en los PNs fueron predominantemente hidrofóbicas, estas se resumen en la Tabla 13 y Fig. 33 y 34.

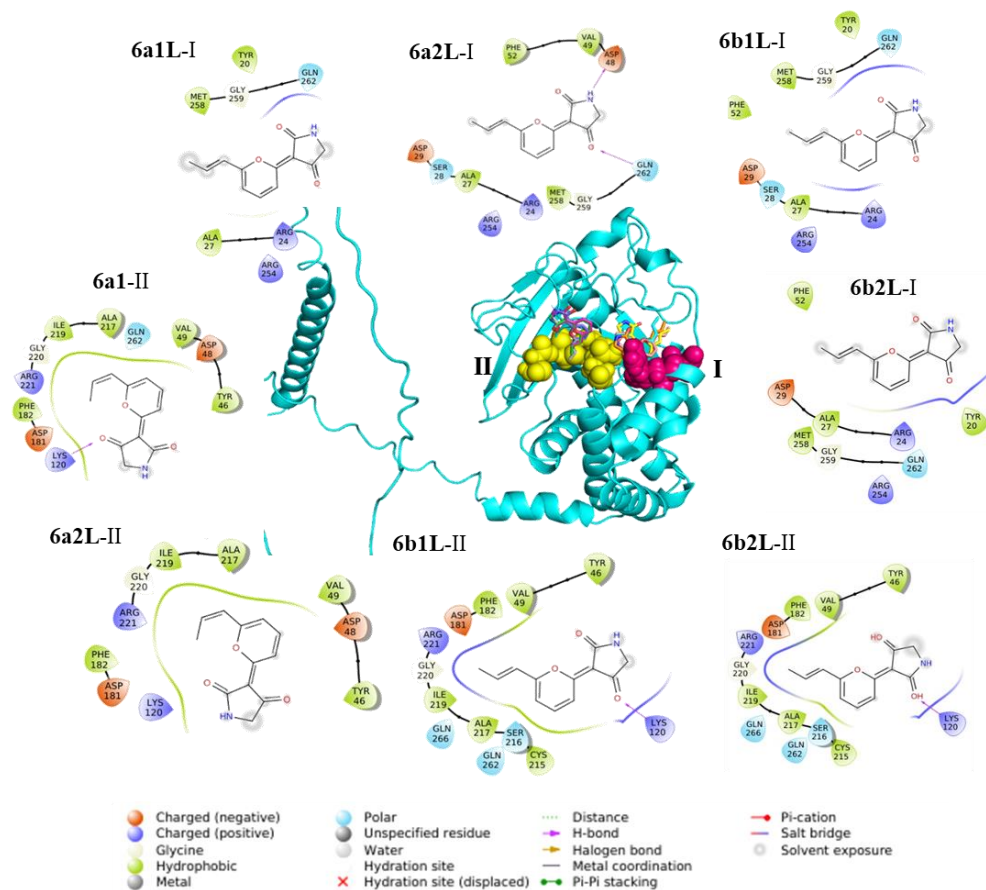
**Tabla 13.** Resultados de acoplamiento molecular entre la PTP1B y los compuestos **1**, **3** y **6**.

Resultados de acoplamiento molecular		
Compuesto	$^1\Delta G_T$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	Residuos de aminoácidos con interacciones
<b>1</b>	-6.71	<sup>3</sup> Met1, <sup>5</sup> Glu8, <sup>5</sup> Glu4, <sup>3</sup> Pro241, Gly283, <sup>3</sup> Met282, <sup>6</sup> Lys279, <sup>3</sup> Ala278, <sup>5</sup> Glu276, <sup>3</sup> Ile275, <sup>3</sup> Leu 272
<b>3</b>	-5.73	<sup>3</sup> Pro206, <sup>4</sup> Ser205, <sup>3</sup> Leu204, <sup>6</sup> Arg79, <sup>5</sup> Glu200, <sup>6</sup> Arg199, <sup>3</sup> Phe196, <sup>4</sup> Gln288, <sup>3</sup> Phe280, <sup>5</sup> Asp236, <sup>3</sup> Leu233
<b>6a1 E</b>	<sup>2</sup> I = -5.67 <sup>2</sup> II = -6.14	I: <sup>3</sup> Ala27, <sup>6</sup> Arg24, <sup>6</sup> Arg254, Gln262, Gly259, <sup>3</sup> Met258, <sup>3</sup> Tyr20 II: <sup>3</sup> Ala217, <sup>6</sup> Arg221, <sup>5</sup> Asp181, <sup>5</sup> Asp48, Gln262, Gly220, <sup>3</sup> Ile219, <sup>6</sup> Lys120, <sup>3</sup> Phe182, <sup>3</sup> Tyr46, <sup>3</sup> Val49
<b>6a2 E</b>	I: -5.86 II: -6.02	I: <sup>3</sup> Ala27, <sup>6</sup> Arg24, <sup>6</sup> Arg254, <sup>5</sup> Asp29, <sup>5</sup> Asp48, Gln262, Gly259, <sup>3</sup> Met258, Phe52, <sup>7</sup> Ser28, Val49 II: <sup>3</sup> Ala217, <sup>5</sup> Asp181, <sup>5</sup> Asp48, Gln262, Gly220, <sup>3</sup> Ile219, <sup>6</sup> Lys120, <sup>3</sup> Phe182, <sup>3</sup> Tyr46, <sup>3</sup> Val49
<b>6b1 Z</b>	I: -5.95 II: -6.70	I: <sup>3</sup> Ala27, <sup>6</sup> Arg24, <sup>6</sup> Arg254, <sup>5</sup> Asp29, Gln262, Gly259, <sup>3</sup> Met258, <sup>3</sup> Phe52, <sup>7</sup> Ser28, <sup>3</sup> Tyr20 II: <sup>3</sup> Ala217, <sup>6</sup> Arg221, <sup>5</sup> Asp181, <sup>4</sup> Cys215, Gln 262, Gln266, Gly220, <sup>3</sup> Ile 219, <sup>6</sup> Lys120, <sup>3</sup> Phe182, <sup>7</sup> Ser216, <sup>3</sup> Tyr46, <sup>3</sup> Val49
<b>6b2 Z</b>	I: -5.78 II: -6.64	I: <sup>3</sup> Ala27, <sup>6</sup> Arg24, <sup>6</sup> Arg254, <sup>5</sup> Asp29, Gln262, Gly259, <sup>3</sup> Met258, <sup>3</sup> Phe52, <sup>3</sup> Tyr20 II: <sup>3</sup> Ala217, <sup>6</sup> Arg221, <sup>5</sup> Asp181, <sup>4</sup> Cys215, Gln262, Gln266, Gly220, Ile219, <sup>6</sup> Lys120, <sup>3</sup> Phe182, <sup>7</sup> Ser216, <sup>3</sup> Tyr46, <sup>3</sup> Val49
<b>UA</b>	-6.73	<sup>4</sup> Gln290, <sup>3</sup> Val287, <sup>4</sup> Ser286, <sup>5</sup> Asp284, Gly283, <sup>3</sup> Met282, <sup>6</sup> Lys279

<sup>1</sup> Energía de unión teórica, <sup>2</sup>Cavidades I y II donde se acopla 6L; Tipos de interacciones: <sup>3</sup>Hidrofóbicas, <sup>4</sup>Polares  
<sup>5</sup>Carga negativa, <sup>6</sup>Carga positiva, → Puentes de hidrógeno



**Figura 32.** Interacciones previstas entre ligandos y PTP1B (código AlphaFold: Q9PT91). En el centro, la proteína se muestra en azul (diagrama de listones), el sitio activo en esferas amarillas y los compuestos en líneas: **1L** en rojo, **3L** en verde y **AU** en naranja; Imágenes creadas en PyMOL y Maestro.



**Figura 33.** Interacciones entre PTP1B (código AlphaFold: Q9PT91) y los isómeros conformacionales de E/Z vermeholtina (6L). En el centro, la proteína se muestra en cian (diagrama de cintas); los residuos de la cavidad II están representados en esferas amarillas; los residuos de la cavidad I están en esferas rosas; isómeros de 6L en líneas: verde (6a1L), rosa (6a2L), gris (6b1L), morado (6b2L), cian (6a1L), amarillo (6a2L), salmón (6b1L) y naranja (6b2L); Imágenes creadas en PyMOL y Maestro.



#### 5.2.4 Predicción de propiedades ADMET

Para estimar la seguridad y eficacia de los PN de los compuestos con los mejores valores de  $pCI_{50}$  (Fig. 30), se analizaron sus propiedades ADMET usando las herramientas citadas en la **sección 4.1.3**. Se evaluaron cinco reglas de Química farmacéutica (MC) y veintisiete propiedades relacionadas con ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad), además con fines comparativos se incluyeron las predicciones de dos inhibidores de la PTP1B con estudios clínicos y preclínicos [trofusquemina (T) y ertiprotafib (E)] y un fármaco de primera línea usado en el tratamiento de la DMT2, la metformina (M).

El radar de biodisponibilidad (Fig. 35) predice que los compuestos **1L–11L** poseen buenas propiedades fisicoquímicas, aunque el grado de instauración y los valores de solubilidad estaban fuera del rango óptimo en casi todas las moléculas, a excepción de **7L**. Todos los compuestos mostraron valores óptimos de LogP (coeficiente de partición octanol-agua; valores entre 0.3 y 6.6) y TPSA (áreas de superficie topológica, rango óptimo entre 37–217 Å). En el caso de aceptadores de enlace de hidrógeno (HBA, por sus siglas en inglés), la puntuación fue inferior a 10 en la mayoría de los casos, excluyendo **2L** y **8L**. Con respecto a la masa molecular (MW), todos menos **8L** presentan valores inferiores a 500 Da (Tabla A6). En cuanto al parámetro de biodisponibilidad oral, los compuestos **4L** y **6L** muestran el mejor puntaje (0.85), y solo los PN **1L**, **3L**, **5L**, **7L** y **9L–11L** están por encima de 0.55 (Tabla A6).

Con respecto a las reglas de Química farmacéutica, solo **3L**, **6L**, **7L**, **9L** y **10L** cumplieron con las reglas de Lipinski y las contenidas en el triángulo dorado, lo que indica que cuentan con las propiedades fisicoquímicas para presentar absorción pasiva a nivel gastrointestinal; los compuestos **2L**, **5L** y **8L** presentaron alertas como PAINS, por lo que podrían mostrar falsos positivos en ensayos biológicos. Finalmente, todos los compuestos, excepto **1L**, revelan una o dos alertas Brenk (Tabla A7).

Las predicciones de permeabilidad en el tracto gastrointestinal (GI), en la barrera hematoencefálica (BHE) y la interacción con la glicoproteína P (P-gp) para los compuestos **1L–11L** se presentan en la Tabla A8 y gráficamente se representan utilizando el modelo de huevo hervido (Fig. 36). Un análisis visual del gráfico de huevo hervido muestra que **3L**, **9L** y **11L** podrían cruzar pasivamente la BHE; únicamente **5L–7L**, **10L**, así como M podrían tener una buena

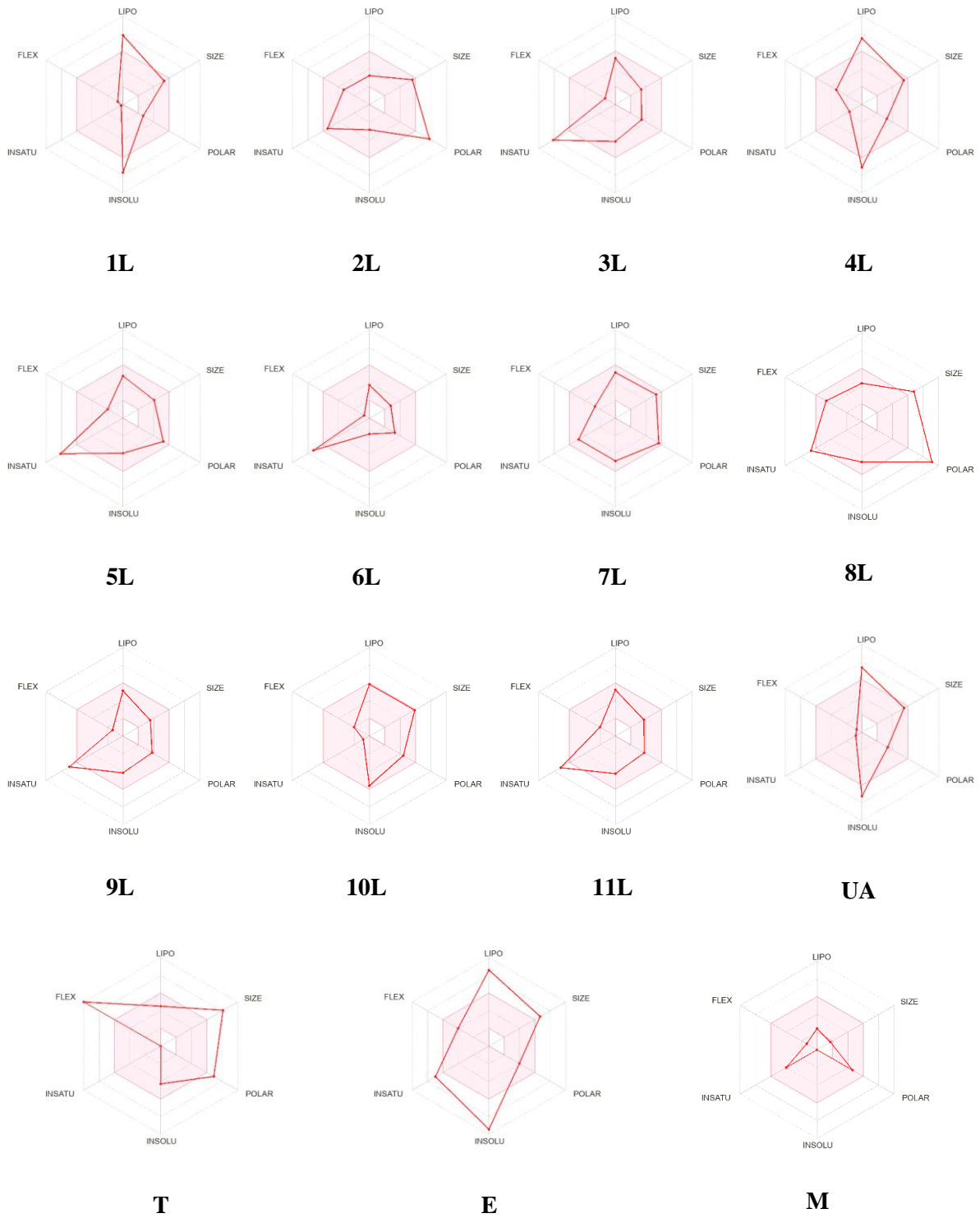
absorción GI. T y E, inhibidores de la PTP1B que alguna vez se consideraron fármacos antidiabéticos prometedores, quedaron fuera del gráfico, lo que impidió realizar cualquier predicción con respecto a su tipo de absorción. Finalmente, solo la xantona prenilada **7L** y el triterpenoide **10L** podrían ser sustrato de P-gp.

Según las estimaciones obtenidas en ADMETlab 2.0, el volumen de distribución (VD) estimado de los PN **1L–11L** está entre 0.4–1.3L/g, lo que se considera óptimo. La fracción libre de un fármaco (Fu) idealmente debe ser  $\geq 20\%$ , fue apropiada solo para el compuesto **6L** (36.3 %), Tabla A8.

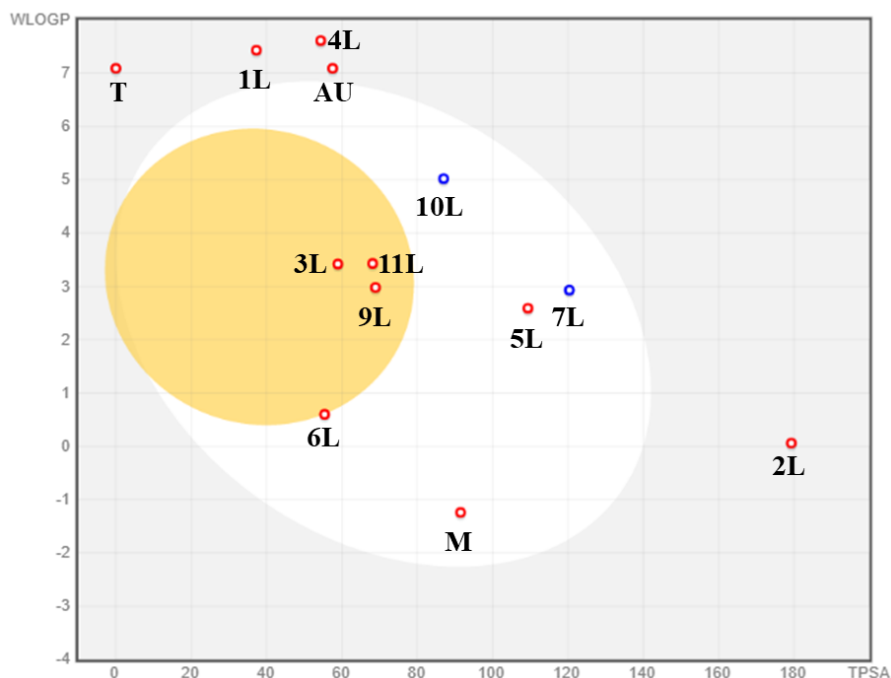
Las predicciones del metabolismo de **1L–11L** se asumieron en función de su inhibición potencial de diferentes isoformas de citocromos 450 (CYP450) (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4). Los compuestos **1L**, **2L**, **10L**, AU y M no interactuaron o inhibieron ninguna isoforma CYP450. Por el contrario, los compuestos restantes inhibieron una o más de estas enzimas (Tabla A9), revelando posibles interacciones farmacológicas que podrían provocar efectos adversos no deseados o tóxicos, debido a la menor eliminación y acumulación de sus metabolitos derivados.

La eliminación de las moléculas se calculó utilizando los parámetros eliminación renal o CL por su notación en inglés ( $CL \geq 15$  mL/min/kg) y vida media corta ( $T_{1/2} \leq 1$ ). Los valores de CL obtenidos oscilaron entre 19,4–2,1 mL/min/kg. El  $T_{1/2}$  fue  $\leq 1$  en todas las moléculas (Tabla A9).

Finalmente se realizó la predicción de toxicidad de los compuestos **1L–11L**, todos los resultados se presentan en las Tablas A10 y A11. Las conclusiones sobre toxicidad deben interpretarse con cautela, ningún compuesto está libre de efectos tóxicos o secundarios. Según estos resultados, los compuestos **1L**, **6L** y **10L** fueron los PNs con menos alertas toxicológicas. El resto de los compuestos presentaron una o dos alertas.



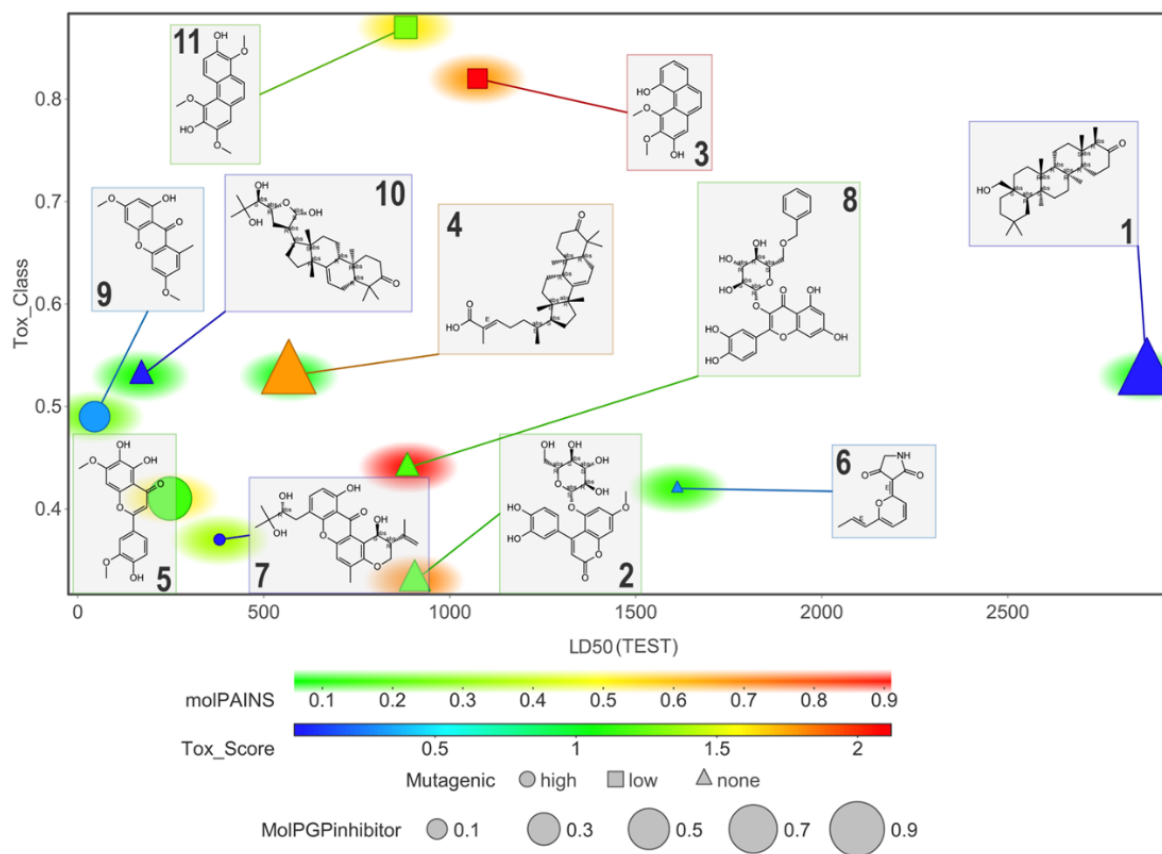
**Figura 34.** Representación visual del rango óptimo para cada propiedad presentada en ejes.



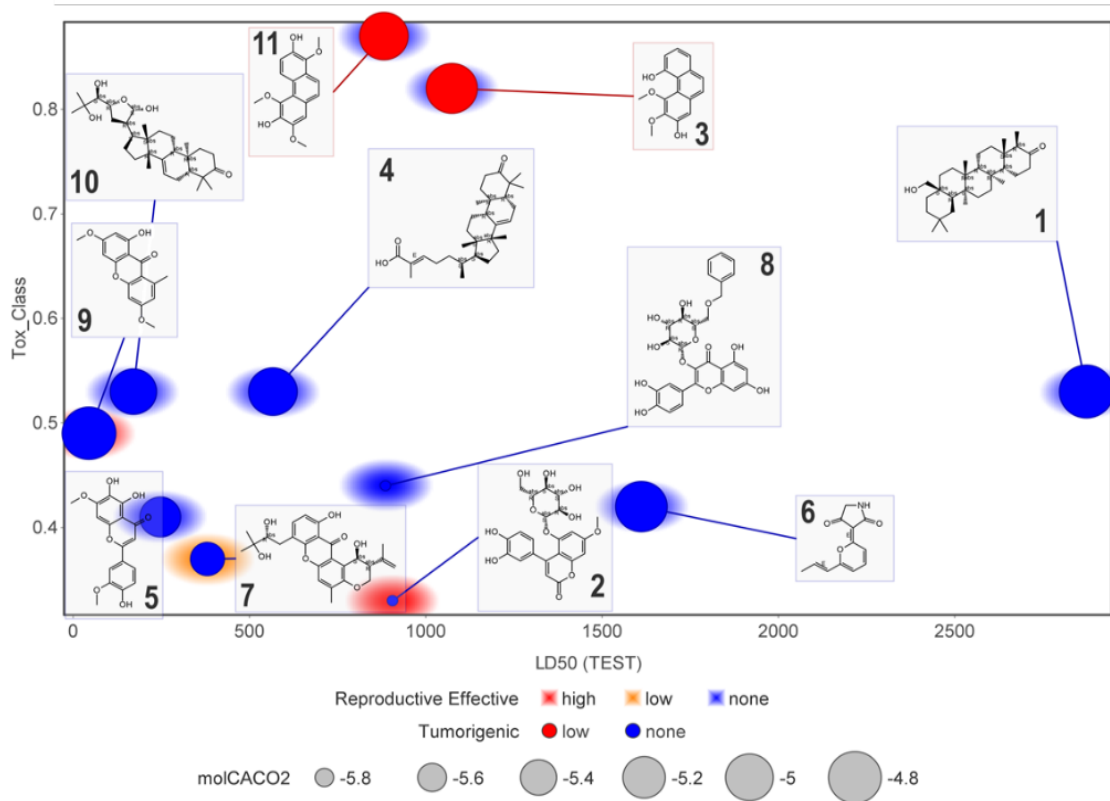
**Figura 35.** Modelo de huevo hervido para predicción de absorción a nivel GI y BBB utilizando SwissADME.

Las alertas más relevantes (Tabla A10) fueron para el compuesto **9L** (altos efectos mutagénicos y teratogénicos); **5L**, **7L** (alta mutagenicidad), y para el compuesto **2L** (alta acción teratogénica). En cuanto a las  $DL_{50}$ , los compuestos **1L**, **3L** y **6L** muestran  $DL_{50} \geq 1000$  mg/kg. Finalmente, todos los compuestos presentan uno o dos fragmentos (toxicóforos) asociados a posibles efectos tóxicos (Tabla A11). Es importante mencionar que las alertas de toxicidad están en función de las estructuras analizadas. Las figuras 37 y 38, presentan de forma gráfica seis propiedades toxicológicas correlacionadas con el valor de  $DL_{50}$  estimado, de esta forma es más sencillo la identificación de compuestos potencialmente tóxicos.

En promedio, los productos naturales **1L**, **6L** y **10L** presentaron el menor número de alertas (Tabla A12 y Figs. 37 y 38). La evaluación de toxicidad experimental de Lorke del compuesto **6L** no reveló ningún efecto tóxico agudo en ratones; la  $DL_{50}$  experimental se estimó superior a 5000 mg/Kg, que está en armonía con las predicciones.



**Figura 36.** Representación gráfica de algunas de las propiedades toxicológicas estimadas para los compuestos **1L–11L**. Gráfico de correlación de compuestos según su  $DL_{50}$  estimada y clase de toxicidad. El tamaño del marcador indica la probabilidad de que un compuesto sea inhibidor de *P-gp*. El color del marcador se refiere a la puntuación de toxicidad los valores  $>1$  indican subestructuras tóxicas. La forma del marcador indica mutagenicidad alta (círculo), baja (cuadrado) o ninguna (triángulo). Finalmente, el color de fondo del marcador correlaciona la probabilidad de ser una estructura PAINS.

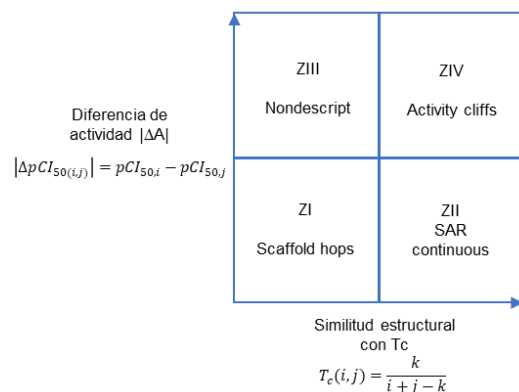


**Figura 37.** Representación gráfica de algunas de las propiedades toxicológicas estimadas para los compuestos **1L–11L**. Gráfico de correlación de compuestos según su  $DL_{50}$  estimada y clase de toxicidad. El tamaño del marcador indica la permeabilidad de las células CACO-2, relacionada con la absorción in vivo. El color del marcador se refiere a un efecto tumorigénico. El color de fondo del marcador indica teratogenicidad.

### 5.2.5 Similitud de los inhibidores de la PTP1B

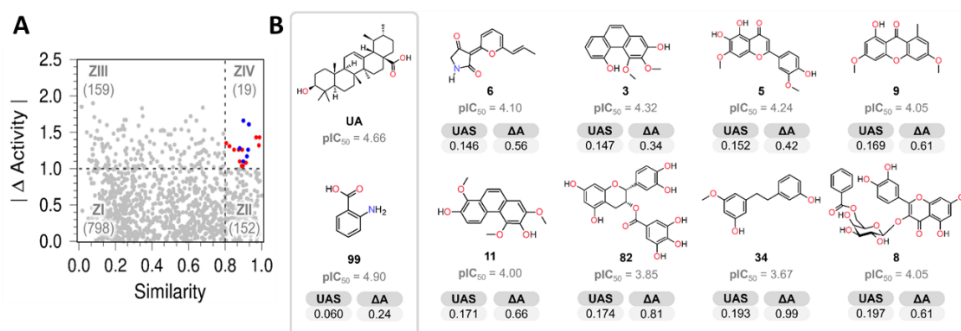
Los índices de similitud de Tanimoto ( $T_c$ ) y el valor absoluto de las diferencias de actividad ( $\Delta A$ ) con respecto al AU nos permitieron proyectar un gráfico en 2D llamado mapa de similitud actividad o SAS map, por sus siglas en inglés (Fig. 39). Los mapas SAS se dividen en cuatro regiones, ZI–ZIV (Fig. 39). En ZI, se encuentran los pares de compuestos que son estructuralmente diferentes al AU, pero con una potencia de actividad similar (scaffold hops). La región ZII, se integra de compuestos que son estructuralmente similares al AU y con una actividad similar, llamada región de continuidad estructura-actividad (SAR continuous). En ZIII, encontramos

moléculas con baja similitud y gran diferencia de actividad con respecto al AU. Finalmente, en ZIV, moléculas que tienen mucha similitud con el AU pero una potencia de actividad diferente (activity cliffs).



**Figura 38.** Mapas SAS, similitud estructural en función de la actividad. Debajo del nombre de los ejes se encuentran las ecuaciones usadas para obtener el  $\Delta A$  y  $T_c$  para cada par de compuestos:  $i$  valores o fragmentos asociados al AU;  $j$ : valores o fragmentos asociados a un inhibidor de la PTP1B;  $k$ , fragmentos compartidos entre  $j$  e  $i$ .

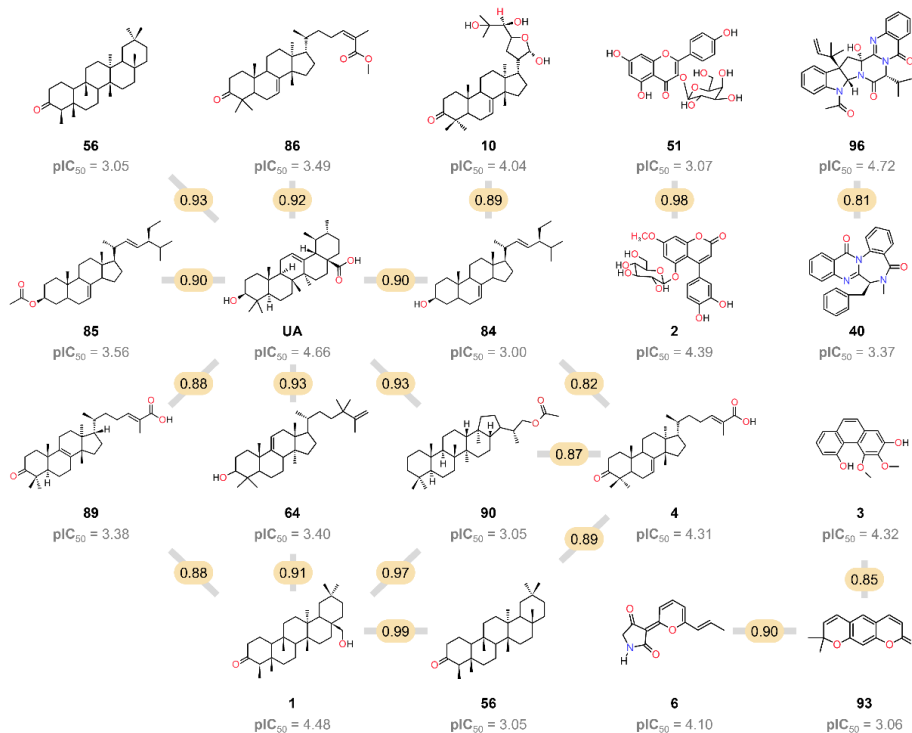
En ZI se identificaron nueve productos naturales (3L, 5L, 6L, 8L, 9L, 11L, 34L, 82L y 99L, Fig. 40) con baja similitud estructural con el compuesto de referencia (AU) pero excelentes valores de potencia de inhibición frente a la PTP1B, llamados “scaffold hops”.



**Figura 39.** (A) Mapa SAS, en paréntesis se encuentran el número de pares de compuestos que integran cada zona; (B) Scaffold hops identificados, los valores de similitud y diferencia de actividad de cada compuesto con respecto al AU se muestran debajo de las estructuras

Tres de los scaffold hops (**3L**, **5L** y **6L**) representan compuestos hit debido a su buena actividad inhibitoria y su simplicidad estructural.

Por otro lado, se detectaron 15 pares de compuestos con altas similitudes estructurales pero diferentes actividades biológicas (acantilados de actividad o activity cliffs) en la región ZIV del mapa SAS. Tres acantilados de actividad mostraron una disminución significativa en la potencia contra PTP1B en comparación con AU a pesar de tener ligeras diferencias estructurales (Fig. 41). Esta información brinda una visión más profunda de las características estructurales clave del compuesto de referencia para ejercer la actividad inhibitora de PTP1B.



**Figura 40.** Activity cliffs identificados en la región ZIV del mapa SAS. Los pares se representan con una línea gris, se resalta en amarillo el valor de similitud molecular.

Todos los resultados generados en la sección 5.2 se integraron el artículo **“Discovery of inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B contained in a natural products library from Mexican medicinal plants and fungi using a combination of enzymatic and *in silico* methods”**



Autores: Miriam Díaz-Rojas, Martín González-Andrade, Rodrigo Aguayo-Ortiz, Rogelio Rodríguez-Sotres, Araceli Pérez-Vásquez, Abraham Madariaga-Mazón, Rachel Mata actualmente se encuentra en proceso de revisión en la revista *Chemico-Biological Interactions*.

Durante los experimentos realizados para integrar el artículo arriba mencionado, se realizaron los ensayos *in vitro* de la actividad inhibitoria de todos los compuestos aislados de *Justicia spicigera* (Acanthaceae); estos resultados se publicaron en el artículo titulado “**Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of compounds from *Justicia spicigera* (Acanthaceae)**”.

## 6. CONCLUSIONES

6.1 Se descubrieron tres nuevos productos naturales del grupo de las ardeminas a partir de la especie fúngica *M. albolutea*, denominados con los nombres triviales de alboluteinas A-C (40–42). Este tipo de tripéptidos se describen por vez primera en el género *Malbranchea*. Los productos resultaron inhibidores alostéricos de la enzima PTP1B, de acuerdo con los estudios *in vitro* e *in silico*. La predicción de sus propiedades ADMET indica que las alboluteinas A-C (40–42) son compuestos que cumplen con las características fisicoquímicas para ser fármacos orales, sin embargo, deben ser sujetas a un proceso de optimización para asegurar sus procesos de eliminación y biodisponibilidad sin sacrificar su actividad. Con los datos generados se propuso modificaciones sobre la alboluteina B (41) (la eliminación del prenilo reverso y del acetilo sobre la amina del indol), estos cambios generaron la molécula hipotética 41a misma que mostró mejoras importantes en las predicciones realizadas, destacando su nula inhibición de las isoformas de CYP450, mejor solubilidad en agua y no presentó ninguna alerta de Brenk o como PAINS. Además, este producto si pudiera ser sustrato de la P-gp, lo que garantizaría su mejor eliminación. Así, de esta parte del proyecto fue factible demostrar la hipótesis planteada, además que desde el punto de vista quimiotaxonómico se amplió el conocimiento sobre la diversidad química del género *Malbranchea*.

6.2-De la quimioteca de productos naturales del laboratorio 124, se identificaron 47 inhibidores de la PTP1B. El análisis del espacio químico reveló que los 47 compuestos inhibidores de la PTP1B se distribuyen a todo lo largo y ancho del espacio formado por los productos naturales mexicanos, de tal forma que los productos seleccionados son una muestra representativa, y que la

diversidad estructural de los inhibidores de la PTP1B es muy amplia. De acuerdo con los valores de  $pIC_{50}$  los productos **1L–11L** fueron los más activos. Los productos **1L**, **3L** y **5L** fueron catalogados como inhibidores no competitivos, mientras que **6L**, fue competitivo. Los estudios de cinética enzimática se encontraron en armonía con los estudios de acoplamiento molecular. El análisis del coeficiente de Tanimoto y las diferencias de actividad permitieron construir los mapas SAS que señalan a los productos naturales **3L**, **5L**, **6L**, **8L**, **9L**, **11L**, **34L**, **82L** y **99L** como excelentes andamios moleculares “scaffold hops” con baja similitud estructural con el AU, pero con excelentes valores de actividad biológica. Los compuestos **1L** y **10L** mostraron excelente actividad, pero, tienen una similitud estructural con AU por lo tanto pueden ser considerados como análogos verdaderos. Entre ellos, los productos **1L**, **6L** y **10L** representan los mejores líderes de acuerdo con las predicciones de sus propiedades ADMET, y de Química Farmacéutica. Las propiedades de estas moléculas justifican más estudios *in vivo* e *in vitro* para evaluar su seguridad y eficacia preclínica.

Los PN **1L–5L**, **8L**, **10L** y **11L** están presentes en diferentes preparaciones utilizadas para tratar la diabetes o sus complicaciones en las prácticas médicas populares de México. La diversidad química y la complejidad de estos inhibidores de la PTP1B plantea la posibilidad de que interactúen con otras dianas moleculares (polifarmacología), lo que puede ser ventajoso para tratar enfermedades complejas donde la monoterapia falla.

## 8. PERSPECTIVAS

Continuar con la optimización estructural de los compuestos con las mejores predicciones de sus propiedades ADMET, en especial los compuestos **41a** (derivado de alboluteina B) y **6L** (*E/Z*-vermelhotina); en el caso de la *E/Z*-vermelhotina se cuentan con valores experimentales de toxicidad aguda, por lo que se pueden proponer modificaciones estructurales que favorezcan una inhibición alostérica de la PTP1B.

## 9. BIBLOGRAFÍA

- ADA, 2022. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* 45, S125–S143. <https://doi.org/10.2337/dc22-S009>
- Angermayr, L., Melchart, D., Linde, K., 2010. Multifactorial lifestyle interventions in the primary and secondary prevention of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus - A systematic review of randomized controlled trials. *Ann. Behav. Med.* 40, 49–64. <https://doi.org/10.1007/s12160-010-9206-4>
- Bello-Chavolla, O.Y., Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C.A., Hernández-Avila, M., 2017. Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutr. Rev.* 75, 4–12. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw030>
- Boufridi, A., Quinn, R.J., 2018. Harnessing the Properties of Natural Products. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 451–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-105029>
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I.H., Frearson, J., Wyatt, P.G., 2008. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* 3, 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>
- Buse, J.B., Wexler, D.J., Tsapas, A., Rossing, P., Mingrone, G., Mathieu, C., D'Alessio, D.A., Davies, M.J., 2022. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 43, 487–493. <https://doi.org/10.2337/dci19-0066>
- Calzada, F., Mata, R., Navarrete, A., del Rio, F., Delgado, G., 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 34, 147–154. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90032-9)
- Casertano, M., Genovese, M., Piazza, L., Balestri, F., Del Corso, A., Vito, A., Paoli, P., Santi, A., Imperatore, C., Menna, M., 2022. Identifying Human PTP1B Enzyme Inhibitors from Marine Natural Products: Perspectives for Developing of Novel Insulin-Mimetic Drugs. *Pharmaceuticals* 15, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ph15030325>

- Chen, Y.Y., Chu, H.M., Pan, K.T., Teng, C.H., Wang, D.L., Wang, A.H.J., Khoo, K.H., Meng, T.C., 2008. Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J. Biol. Chem.* 283, 35265–35272.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M805287200>
- Chiung, Y.M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., Chen, G.Y., Chen, Z.C., Nakayama, M., 1993. A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 46, 1819–26. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1819>
- Cho, H., 2013. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) And Obesity, 1st ed, Vitamins and Hormones. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00017-1>
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.*, Second. ed. Wiley-CVH, New York. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5023>
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Demir, S., Nawroth, P.P., Herzig, S., Ekim Üstünel, B., 2021. Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications. *Adv. Sci.* 8, 1–23.  
<https://doi.org/10.1002/advs.202100275>
- Duan, X., Liu, Y., You, X., Jiang, Z., Yang, Shaoxiang, Yang, Shaoqing, 2017. High-level expression and characterization of a novel cutinase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for butyl butyrate production. *Biotechnol. Biofuels* 10, 223.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0912-z>
- Environmental Protection Agency, 2016. Toxicity Estimation Software Tool (TEST).
- Estrada, S., Toscano, R.A., Mata, R., 1999. New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.* 62, 1175–1178. <https://doi.org/10.1021/np990061e>
- Figuroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Río-Portilla, F., Del Carmen González, M., Mata, R., 2011. Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26, 378–385.

<https://doi.org/10.3109/14756366.2010.518964>

Figuroa, M., González, M. del C., Rodríguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R., 2009. Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 2167–2174.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.079>

Flores-Bocanegra, L., Pérez-Vásquez, A., Torres-Piedra, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 2015.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. *Molecules* 20, 15330–15342.

<https://doi.org/10.3390/molecules200815330>

Flores Lozano, F., Cabeza Gómez, Á., Calarco Zaccari, E., 2021. *Endocrinología*, 8th ed. Méndez Editores, Mexico.

González-Medina, M., Naveja, J.J., Sánchez-Cruz, N., Medina-Franco, J.L., 2017. Open chemoinformatic resources to explore the structure, properties and chemical space of molecules. *RSC Adv.* 7, 54153–54163. <https://doi.org/10.1039/c7ra11831g>

Grimblat, N., Zanardi, M.M., Sarotti, A.M., 2015. Beyond DP4: An Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *J. Org. Chem.* 80, 12526–12534.

<https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02396>

Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2005. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* 71, 1099–1105. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873137>

Han, P., Zhou, P., Hu, S., Yang, S., Yan, Q., Jiang, Z., 2013. A novel multifunctional  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *malbranchea cinnamomea*: Biochemical characterization and three-dimensional structure. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170, 420–435.

<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0198-y>

Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. ofCheminformatics* 4, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.aim.2014.05.019>

- Harvey, A.L., Clark, R.L., Mackay, S.P., Johnston, B.F., 2010. Current strategies for drug discovery through natural products. *Expert Opin. Drug Discov.* 5, 559–568. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.488263>
- Haynes, S.W., Gao, X., Tang, Y., Walsh, C.T., 2013. Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: A two-enzyme pathway to the hexacyclic MDR export pump inhibitor ardeemin. *ACS Chem. Biol.* 8, 741–748. <https://doi.org/10.1021/cb3006787>
- Hongdusit, A., Fox, J.M., 2021. Optogenetic Analysis of Allosteric Control in Protein Tyrosine Phosphatases. *Biochemistry* 60, 254–258. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00841>
- IDF, 2021. IDF Diabetes Atlas, 10th ed, Diabetes Research and Clinical Practice. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.013>
- IDF, 2019. IDF Diabetes Atlas, Ninth. ed, IDF.
- INEGI, 2021. Características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2021.
- Jara Albarrán, A., Sánchez García-Cervigón, P., Arranz Martín, A., Andía Melero, V.M., 2010. *Endocrinología*, 2a ed. Madrid.
- Jimenez, A., Villarreal, C., Toscano, R.A., Cook, M., Arnason, J.T., Bye, R., Mata, R., 1998. Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae) Taken in part from the PhD and MS theses of C. Villarreal and M. A. Jiménez, respectively. *Phytochemistry* 49, 1981–1988. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)00364-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00364-1)
- Johnson, T.O., Ermolieff, J., Jirousek, M.R., 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 696–709. <https://doi.org/10.1038/nrd895>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohli, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

- Kanwal, A., Kanwar, N., Bharati, S., Srivastava, P., Singh, S.P., Amar, S., 2022. Exploring New Drug Targets for Type 2 Diabetes: Success, Challenges and Opportunities. *Biomedicines* 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020331>
- Kijjoo, A., Santos, S., Dethoup, T., Manoch, L., Almeida, A.P., Vasconcelos, M.H., Silva, A., Gales, L., Herz, W., 2011. Sartoryglabrin, Analogs of Ardeemins, from *Neosartorya Glabra*. *Nat. Prod. Commun.* 6, 807–812. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600615>
- Klein, S., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H., Scherer, P.E., 2022. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metab.* 34, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>
- Krishnan, N., Koveal, D., Miller, D.H., Xue, B., Akshinthala, S.D., Kragelj, J., Jensen, M.R., Gauss, C.M., Page, R., Blackledge, M., Muthuswamy, S.K., Peti, W., Tonks, N.K., 2014. Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* 10, 558–566. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1528>
- Kumar, A.P., Nguyen, M.N., Verma, C., Lukman, S., 2018. Structural analysis of protein tyrosine phosphatase 1B reveals potentially druggable allosteric binding sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 86, 301–321. <https://doi.org/10.1002/prot.25440>
- Leyte-Lugo, M., González-Andrade, M., González, M.D.C., Glenn, A.E., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R., 2012. (+)-Ascosalitoxin and vermelhotin, a calmodulin inhibitor, from an endophytic fungus isolated from *Hintonia latiflora* (1). *J. Nat. Prod.* 75, 1571–1577. <https://doi.org/10.1021/np300327y>
- Liu, R., Mathieu, C., Berthelet, J., Zhang, W., Dupret, J.M., Rodrigues Lima, F., 2022. Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): From Structure to Clinical Inhibitor Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23137027>
- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., Mata, R., 2015. Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 551–558. <https://doi.org/10.1111/jphp.12346>
- Marcarino, M.O., Zanardi, M.M., Cicetti, S., Sarotti, A.M., 2020. NMR calculations with quantum methods: Development of new tools for structural elucidation and beyond. *Acc. Chem. Res.* 53, 1922–1932. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00365>

- Martínez-Luis, S., González, M.C., Ulloa, M., Mata, R., 2005. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry* 66, 1012–1016.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.005>
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M.C., Lira-Rocha, A., Mata, R., 2006a. Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron* 62, 1817–1822. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.11.047>
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M.C., Lira-Rocha, A., Mata, R., 2006b. Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron* 62, 1817–1822. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.11.047>
- Medina-Franco, J.L., Sánchez-Cruz, N., López-López, E., Díaz-Eufracio, B.I., 2021. Progress on open chemoinformatic tools for expanding and exploring the chemical space. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* <https://doi.org/10.1007/s10822-021-00399-1>
- Mendes, G., De Menezes Oliveira, D., Kohlhoff, M., Rosa, C.A., De Almeida Alves, T.M., Zani, C.L., Rosa, L.H., Johann, S., Barros Cota, B., 2016. Alkaloidal metabolites from *Aspergillus felis* and their activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Phytochem. Lett.* 17, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.06.006>
- Morales-Sánchez, V., Rivero-Cruz, I., Laguna-Hernández, G., Salazar-Chávez, G., Mata, R., 2014. Chemical composition, potential toxicity, and quality control procedures of the crude drug of *Cyrtopodium macrobulbon*. *J. Ethnopharmacol.* 154, 790–797.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.006>
- Navarrete-Vazquez, G., Paoli, P., León-Rivera, I., Villalobos-Molina, R., Medina-Franco, J.L., Ortiz-Andrade, R., Estrada-Soto, S., Camici, G., Diaz-Coutiño, D., Gallardo-Ortiz, I., Martinez-Mayorga, K., Moreno-Díaz, H., 2009. Synthesis, in vitro and computational studies of protein tyrosine phosphatase 1B inhibition of a small library of 2-arylsulfonylaminobenzothiazoles with antihyperglycemic activity. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 3332–3341. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.042>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770–803.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>



- NIH, 2016a. National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases [WWW Document]. Diabetes Overv.
- NIH, 2016b. National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases [WWW Document]. Diabetes Overv. URL <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes> (accessed 9.18.22).
- Ning, C., Jiao, Y., Wang, J., Li, W., Zhou, J., Lee, Y.C., Ma, D.L., Leung, C.H., Zhu, R., David Wang, H.M., 2022. Recent advances in the managements of type 2 diabetes mellitus and natural hypoglycemic substances. *Food Sci. Hum. Wellness* 11, 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.004>
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pulido, R., 2016. Protein Tyrosine Phosphatases. BioCruces Health Research Institute, Springer Science, Bizkaia, Spain.
- Qian, S., Zhang, M., He, Y., Wang, W., Liu, S., 2016. Recent advances in the development of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for Type 2 diabetes. *Future Med. Chem.* 8, 1239–1258. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0064>
- Rangel-Grimaldo, M., Macías-Rubalcava, M.L., González-Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., Mata, R., 2020.  $\alpha$ -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.* 83, 675–683. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01108>
- Rebollar-Ramos, D., Macías-Ruvalcaba, M.L., Figueroa, M., Raja, H.A., González-Andrade, M., Mata, R., 2018. Additional  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea* (Leotiomycetes, Ascomycota). *J. Antibiot. (Tokyo)*. 71, 862–871. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0075-6>
- Rebollar-Ramos, D., Ovalle-Magallanes, B., Palacios-Espinosa, J.F., Macías-Rubalcava, M.L., Raja, H.A., González-Andrade, M., Mata, R., 2021.  $\alpha$ -Glucosidase and PTP-1B Inhibitors from *Malbranchea dendritica*. *ACS Omega* 6, 22969–22981.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03708>

Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J.A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R., Bye, R., Franzblau, S., Timmermann, B.N., 2010. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1117–1126.

<https://doi.org/10.1211/jpp.57.9.0007>

Rojas, I.S., Lotina-Hennsen, B., Mata, R., 2000. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. *J. Nat. Prod.* 63, 1396–1399. <https://doi.org/10.1021/np0001326>

Salinas-Arellano, E., Pérez-Vásquez, A., Rivero-Cruz, I., Torres-Colín, R., González-Andrade, M., Rangel-Grimaldo, M., Mata, R., 2020. Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *salvia amarissima* ortega. *Molecules* 25.

<https://doi.org/10.3390/molecules25153530>

Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K., Barford, D., 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423, 769–773. <https://doi.org/10.1038/nature01680>

Sander, T., Freyss, J., Von Korff, M., Rufener, C., 2015. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 460–473.

<https://doi.org/10.1021/ci500588j>

SarathKumar, B., Lakshmi, B., 2019. In silico investigations on the binding efficacy and allosteric mechanism of six different natural product compounds towards PTP1B inhibition through docking and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Model.* 25, 272.

<https://doi.org/10.1007/s00894-019-4172-7>

Seifried, A., Knobloch, G., Duraphe, P.S., Segerer, G., Manhard, J., Schindelin, H., Schultz, J., Gohla, A., 2014. Evolutionary and structural analyses of Mammalian Haloacid Dehalogenase-type Phosphatases AUM and Chronophin provide insight into the basis of their different substrate specificities. *J. Biol. Chem.* 289, 3416–3431.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503359>

Sharma, B., Xie, L., Yang, F., Wang, W., Zhou, Q., Xiang, M., Zhou, S., Lv, W., Jia, Y.,

Pokhrel, L., Shen, J., Xiao, Q., Gao, L., Deng, W., 2020. Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *Eur. J. Med. Chem.* 199, 112376. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112376>

Sharma, M., Mahajan, C., Bhatti, M.S., Chadha, B.S., 2016. Profiling and production of hemicellulases by thermophilic fungus *Malbranchea flava* and the role of xylanases in improved bioconversion of pretreated lignocellulosics to ethanol. *3 Biotech* 6, 30. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0325-2>

Shinde, R.N., Sobhia, M.E., 2013. Binding and discerning interactions of PTP1B allosteric inhibitors: Novel insights from molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* 45, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.08.001>

Sigler L., C.W., 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon* 4, 349–488.

Sigler, L., Hambleton, S., Flis, A.L., Paré, J.A., 2002. Auxarthron teleomorphs for *Malbranchea filamentosa* and *Malbranchea albolutea* and relationships within Auxarthron. *Stud. Mycol.* 2002, 111–122. <https://doi.org/10.1021/jp074635x>

Singh, S., Singh Grewal, A., Grover, R., Sharma, N., Chopra, B., Kumar Dhingra, A., Arora, S., Redhu, S., Lather, V., 2022. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorg. Chem.* 121, 105626. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>

Spector, T., Cleland, W.W., 1981. Meanings of  $K_i$  for conventional and alternate-substrate inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 30, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(81\)90277-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(81)90277-X)

Tonks, N.K., 2003. PTP1B: From the sidelines to the front lines! *FEBS Lett.* 546, 140–148. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00603-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00603-3)

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K. Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., 2021. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50, D439–D444.

- Verastegui-Omaña, B., Rebollar-Ramos, D., Pérez-Vásquez, A., Martínez, A.L., Madariaga-Mazón, A., Flores-Bocanegra, L., Mata, R., 2017.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea*. *J. Nat. Prod.* 80, 190–195.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00977>
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Fukushima, K., KAWAI, K., 2008. Two new furanone glycosides, malfilentosides A and B, from *Malbranchea filamentosa*. *Mycotoxines* 58, 1–6.
- Wakana, D., Hosoe, T., Wachi, H., Itabashi, T., Fukushima, K., Yaguchi, T., Kawai, K.I., 2009. The cytotoxic and antifungal activities of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 62, 217–219.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2009.9>
- Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K.I., Yaguchi, T., Fukushima, K., Goda, Y., Hosoe, T., 2014. Cytotoxic anthrasteroid glycosides, malsterosides A-C, from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 67, 585–588. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.43>
- WHO, 2017. Diabetes [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes> (accessed 3.14.19).
- Wiesmann, C., Barr, K.J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D.A., Shen, W., Fahr, B.J., Zhong, M., Taylor, L., Randall, M., McDowell, R.S., Hansen, S.K., 2004. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 730–737.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb803>
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., Woolsey, J., 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 34, 668–672. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj067>
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., Cao, D., 2021. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res.* 49, W5–W14.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- Yang, H.X., He, J., Zhang, F.L., Zhang, X.D., Li, Z.H., Feng, T., Ai, H.L., Liu, J.K., 2020.

Trichothecrotocins D–L, Antifungal Agents from a Potato-Associated *Trichothecium crotocinigenum*. *J. Nat. Prod.* 83, 2756–2763. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00695>

Yang, Y.L., Liao, W.Y., Liu, W.Y., Liaw, C.C., Shen, C.N., Huang, Z.Y., Wu, S.H., 2009. Discovery of new natural products by intact-cell mass spectrometry and lc-spe-nmr: malbranpyrroles, novel polyketides from thermophilic fungus *malbranchea sulfurea*. *Chem. - A Eur. J.* 15, 11573–11580. <https://doi.org/10.1002/chem.200901556>

## 10. APÉNDICE

Figura A1. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN correspondiente al compuesto <b>40</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> a 500 MHz. ....	84
Figura A2. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN correspondiente al compuesto <b>40</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> a 125 MHz. ....	84
Figura A3. Espectro de COSY del compuesto <b>40</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	85
Figura A4. Espectro de HSQC del compuesto <b>40</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	85
Figura A5. Espectro de HMBC del compuesto <b>40</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	86
Figura A6. Espectro de NOESY del compuesto <b>40</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	86
Figura A7. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del compuesto <b>42</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> a 500 MHz. ....	87
Figura A8. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto <b>42</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> a 125 MHz. ....	87
Figura A9. COSY del compuesto <b>42</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	88
Figura A10. HSQC del compuesto <b>42</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	88
Figura A11. HMBC del compuesto <b>42</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	89
Figura A12. NOESY del compuesto <b>42</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	89
Figura A13. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> a 700 MHz. ....	90
Figura A14. Espectro <sup>13</sup> C-RMN del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> a 175 MHz. ....	90
Figura A15. COSY del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> . ....	91
Figura A16. HSQC del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> . ....	91
Figura A17. HMBC del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> . ....	92
Figura A18. NOESY del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> . ....	92
Figura A19. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del compuesto <b>41</b> en CDCl <sub>3</sub> a 500 Hz, antes y después de la adición de D <sub>2</sub> O. ....	93
Figura A20. Predicción de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinética para las alboluteinas A-C empleando la SwissADME. ....	94
Figura A21. Curvas de CI <sub>50</sub> para los PN en la Tabla A2, se ajustaron usando el software Origin 8.0. ....	95
Figura A22. Selección de la huella digital molecular (descriptor) y su comparación del espacio químico. ....	98
Figura A23. Compuesto <b>E/Z 6L</b> , mezcla de diastereoisómeros en solución (proporción 6.4:3.6, <i>E/Z</i> ). ....	98
Figura A24. Docking de la vermelhotina <b>6a1L</b> con PTP1B (Q9PT91). ....	99
Figura A25. Docking de la vermelhotina <b>6a2L</b> con PTP1B (Q9PT91). ....	99
Figura A26. Docking de la vermelhotina <b>6b1L</b> con PTP1B (Q9PT91). ....	100
Figura A27. Docking de la vermelhotina <b>6b2L</b> con PTP1B (Q9PT91). ....	100
Figura A28. Interacciones en dos dimensiones entre PTP1B-ligandos ( <b>2L</b> , <b>4L</b> y <b>7L–11L</b> ); código AlphaFold: Q9PT9 .....	101

Figura A29. Predicción de interacciones entre PTP1B-ligandos en 3D, ligandos <b>2L</b> , <b>4L</b> y <b>7L-11L</b> ...	102
Figura A30. Predicción de propiedades fisicoquímicas y farmacocinética para los compuestos <b>1L-11L</b> empleando la SwissADME.....	103
Tabla A1. Análisis de probabilidad DP4+ para los dos niveles de teoría usado en la predicción del espectro de DC para el compuesto <b>41</b> mPW1PW91/6-31G+(d,p).....	107
Tabla A2. Resultados de la actividad inhibitoria de 99 PN utilizando un ensayo <i>in vitro</i> .....	108
Referencias de la Tabla A2 en orden alfabético .....	139
Tabla A3. Datos de pCl <sub>50</sub> de los compuestos más activos.....	145
Tabla A4. Parámetros teóricos de unión entre la PTP1B y los compuestos <b>2L</b> , <b>4L</b> , <b>7L-11L</b> .....	147
Tabla A5. Interacciones entre la PTP1B y los compuestos <b>2L</b> , <b>4L</b> , <b>7L-11L</b> .....	147
Tabla A6. Predicción de propiedades fitoquímicas para los compuestos <b>1L-11L</b> .....	148
Table A7. Predicciones relacionadas con Química medicinal para los compuestos <b>1L-11L</b> .....	149
Tabla A8. Predicción de propiedades farmacocinéticas relacionadas con la absorción y distribución de compuestos <b>1L-11L</b> , empleando SwissADME y ADMETlab 2.0.....	150
Tabla A9. Propiedades farmacocinéticas relacionadas con el metabolismo y la excreción de compuestos <b>1L-11L</b> , usando SwissADME y ADMETlab 2.0.....	151
Tabla A10. Propiedades toxicológicas de los compuestos <b>1L-11L</b> empleando DataWarrior.....	152
Tabla A11. Perfil de toxicidad estimado para moléculas seleccionadas ( <b>1L-11L</b> ).....	153
Tabla A12. Resumen de alertas ADMET para los compuestos más activos ( <b>1L-11L</b> ).....	154
11. PUBLICACIONES .....	155

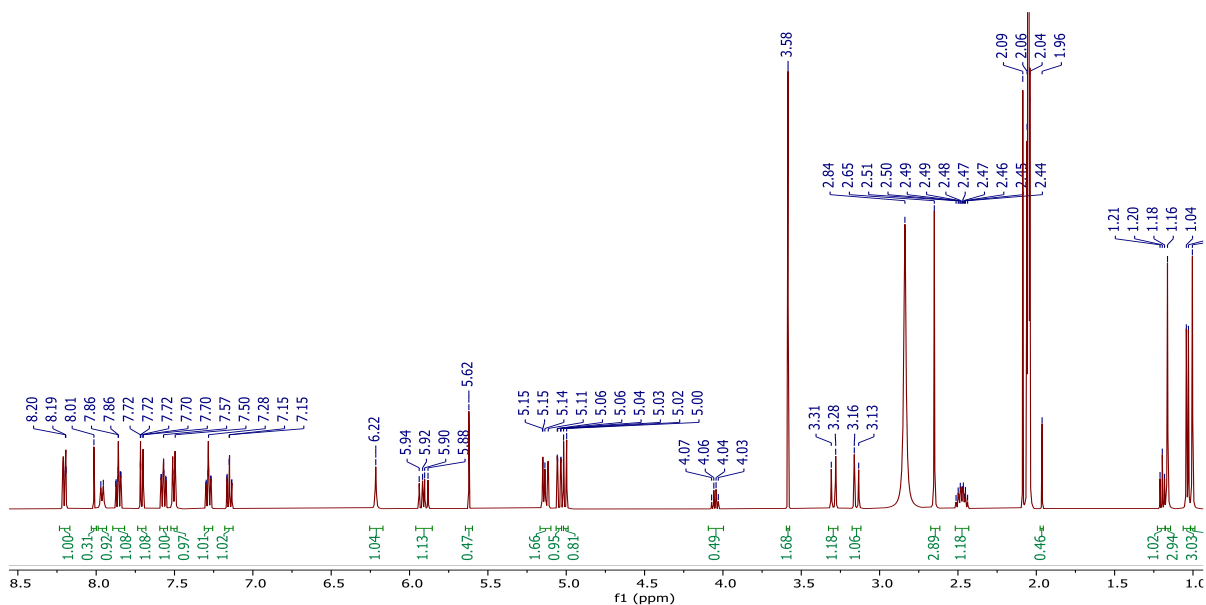


Figura A1. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN correspondiente al compuesto **40** en acetona- $d_6$  a 500 MHz.

$^1\text{H}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  8.20 (1H, ddd,  $J = 7.9, 1.5, 0.5$  Hz), 7.96 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.86 (1H, ddd,  $J = 8.3, 7.2, 1.6$  Hz), 7.73 – 7.69 (1H, m), 7.57 (1H, ddd,  $J = 8.1, 7.2, 1.2$  Hz), 7.50 (1H, dd,  $J = 7.6, 0.8$  Hz), 7.31 – 7.26 (1H, m), 7.15 (1H, td,  $J = 7.5, 1.1$  Hz), 5.91 (1H, dd,  $J = 17.4, 10.8$  Hz), 5.06 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz), 5.03 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz), 5.01 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz), 3.22 (3H, dd,  $J = 73.4, 14.0$  Hz), 2.48 (1H, ddt,  $J = 13.5, 9.8, 6.7$  Hz), 1.20 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.04 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz), 0.80 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz)

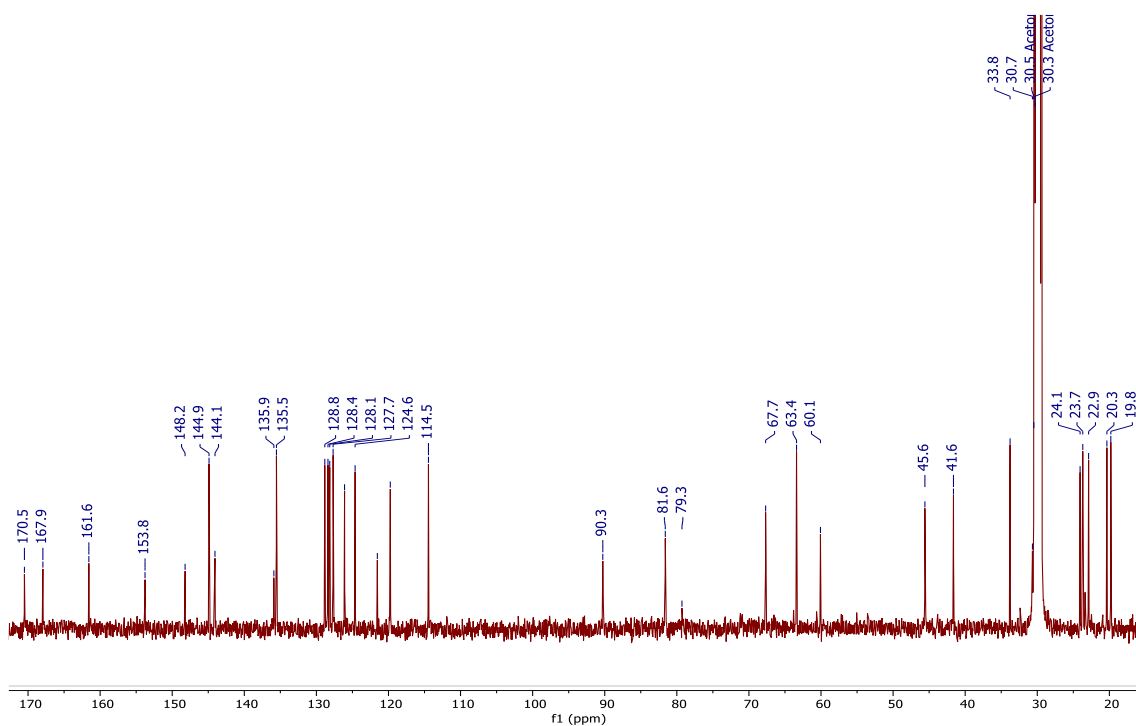


Figura A2. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN correspondiente al compuesto **40** en acetona- $d_6$  a 125 MHz.



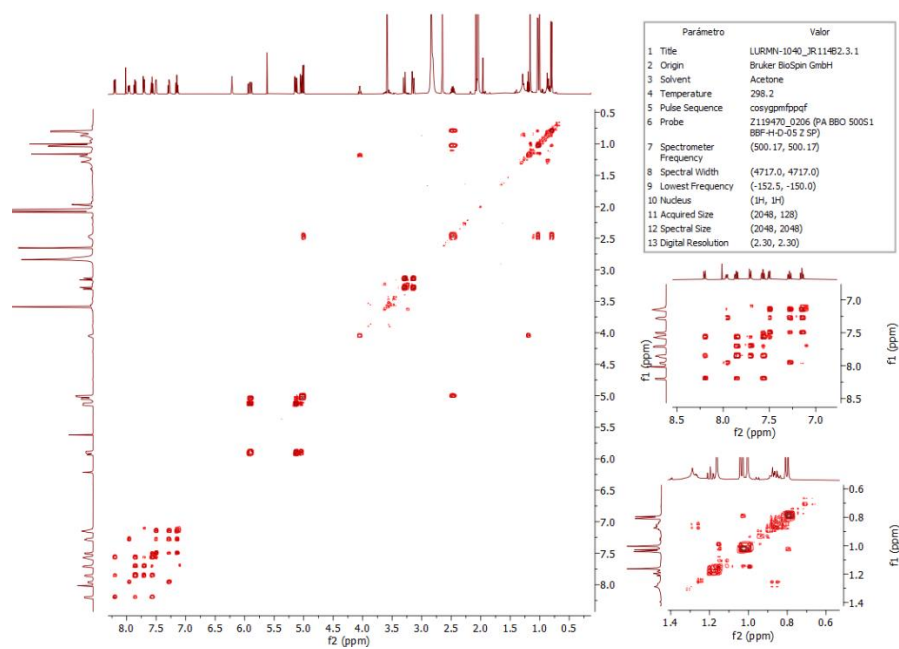


Figura A3. Espectro de COSY del compuesto **40** en acetona- $d_6$ .

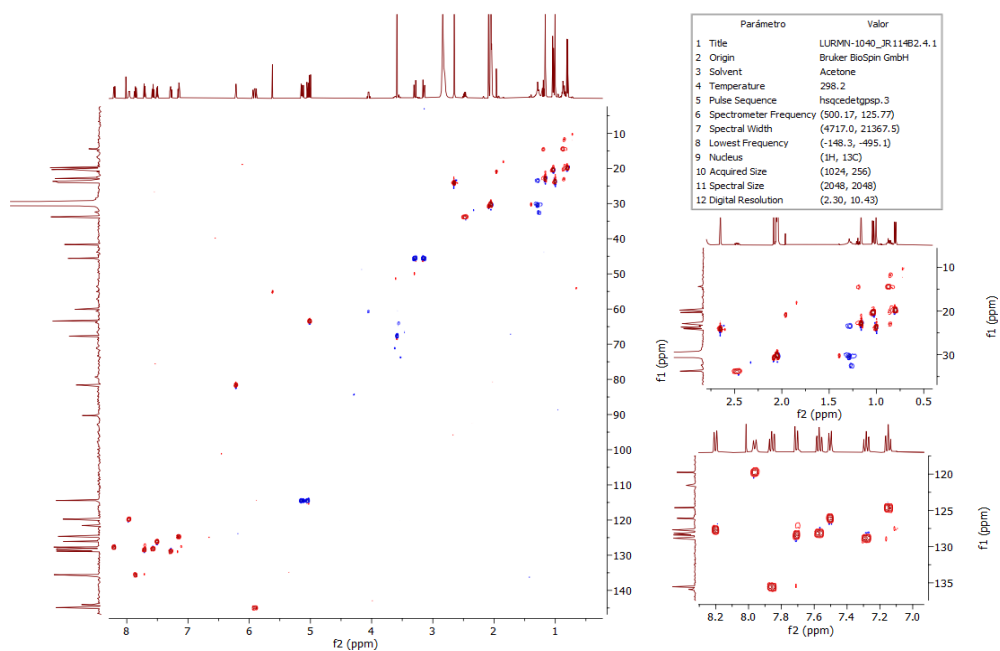


Figura A4. Espectro de HSQC del compuesto **40** en acetona- $d_6$ .

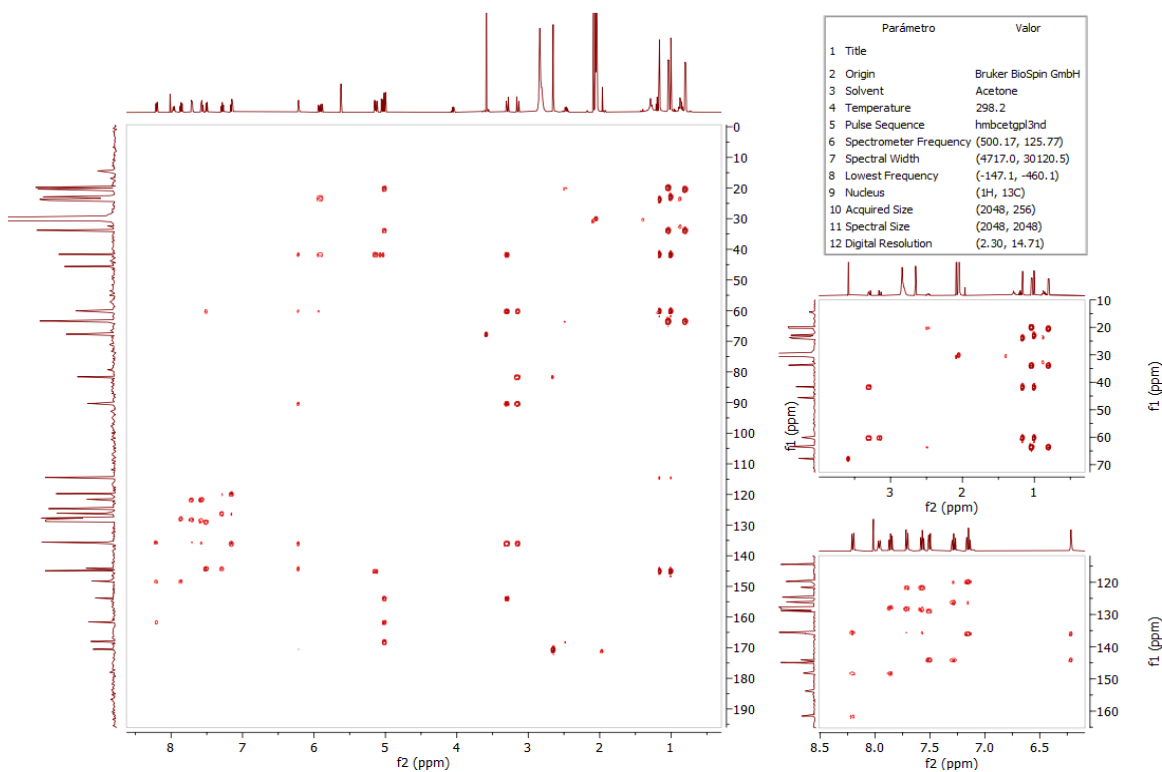


Figura A5. Espectro de HMBC del compuesto **40** en acetona- $d_6$ .

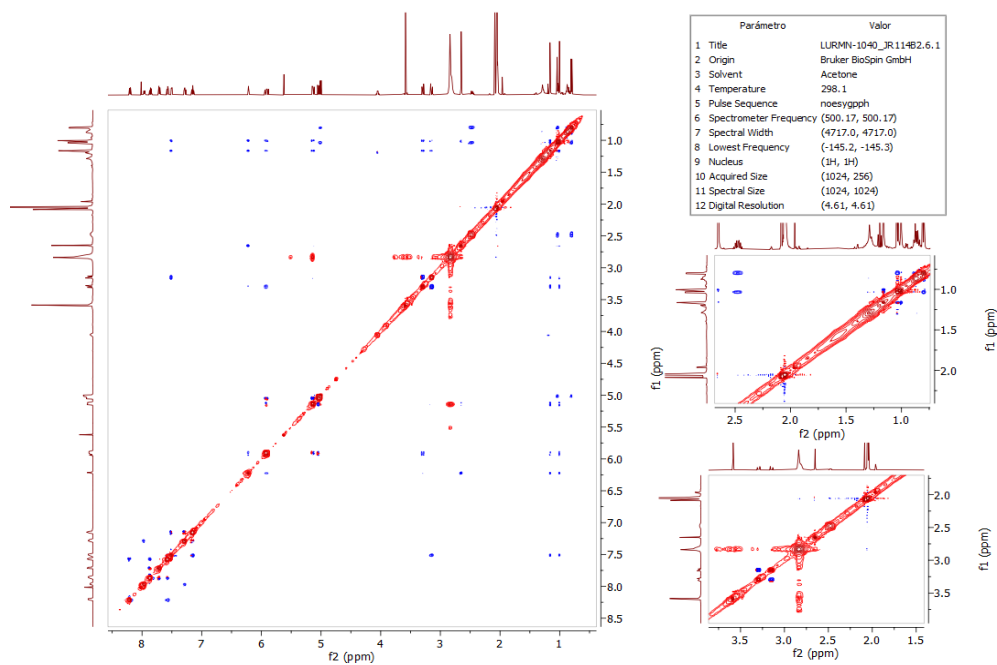


Figura A6. Espectro de NOESY del compuesto **40** en acetona- $d_6$ .



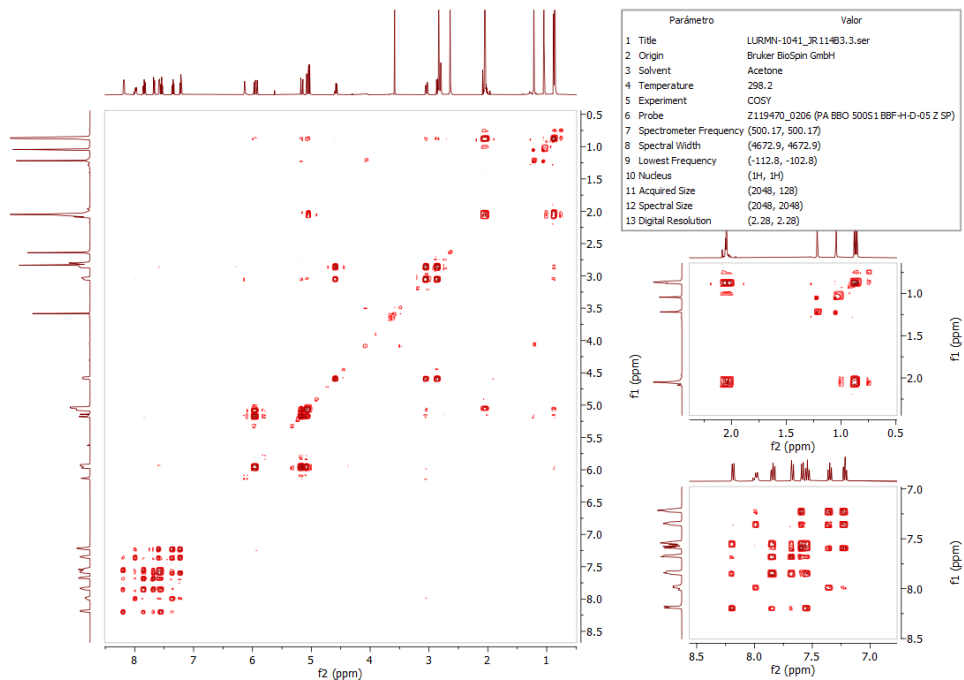


Figura A9. COSY del compuesto **42** en acetona- $d_6$ .

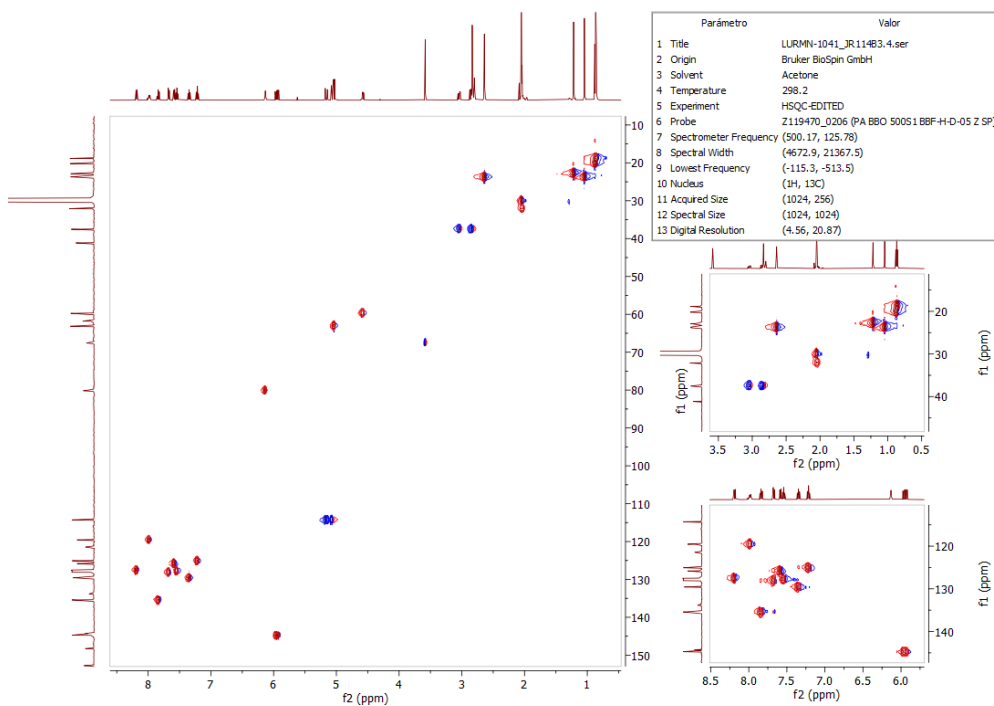


Figura A10. HSQC del compuesto **42** en acetona- $d_6$ .

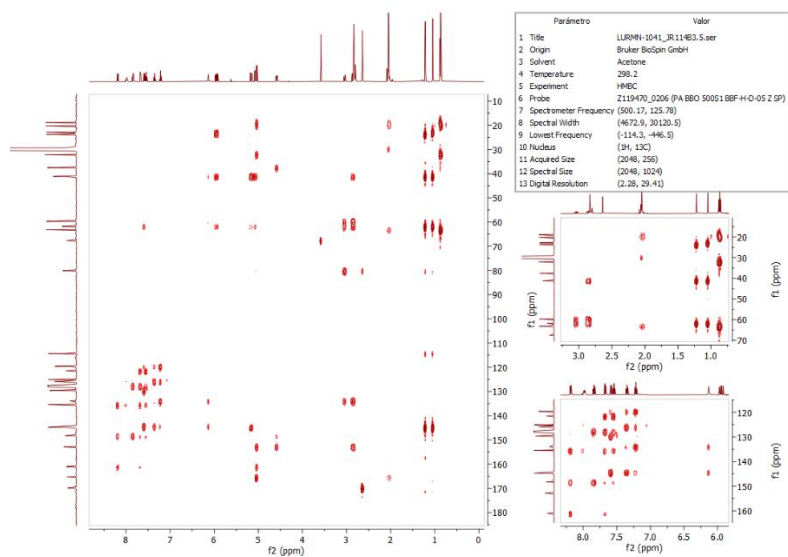


Figura A11. HMBC del compuesto **42** en acetona- $d_6$ .

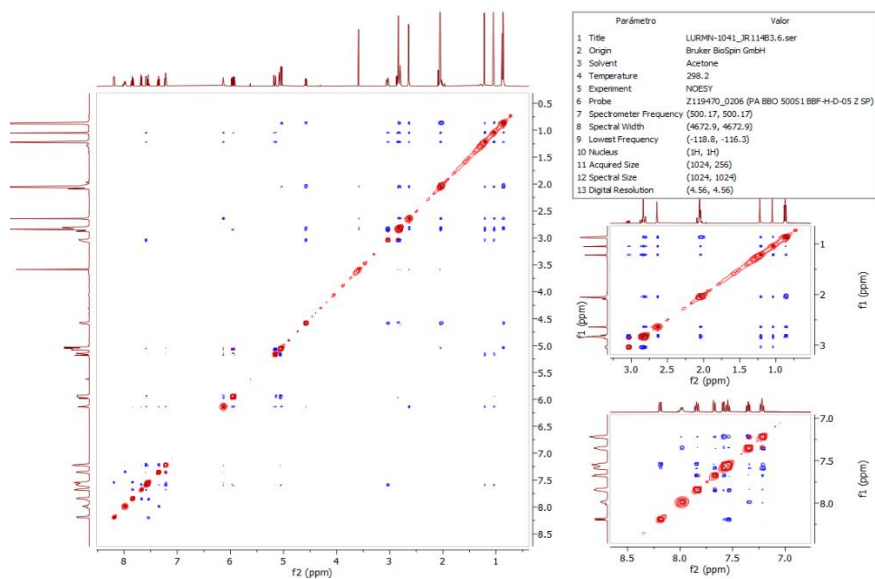


Figura A12. NOESY del compuesto **42** en acetona- $d_6$ .

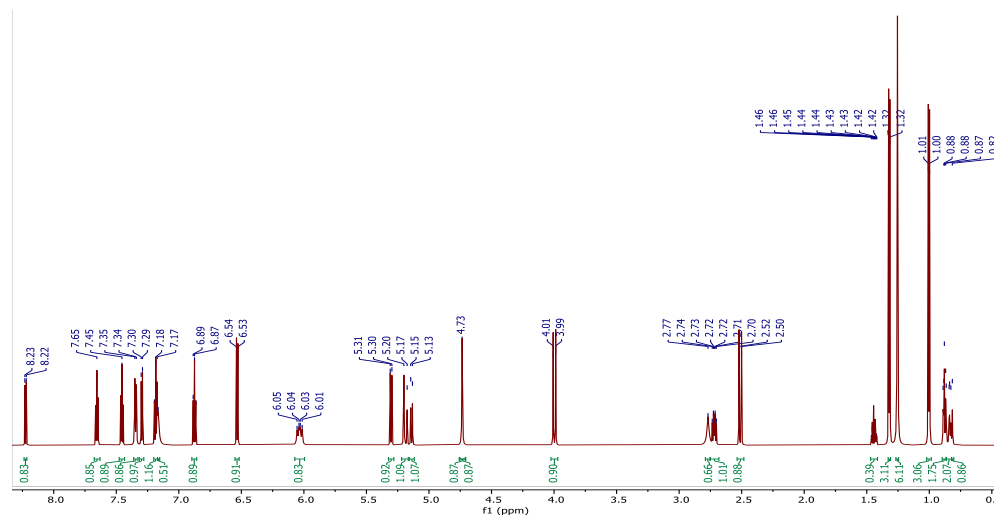


Figura A13. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **41** en  $\text{CDCl}_3$  a 700 MHz.

$^1\text{H}$ NMR (Chloroform-d, 700 MHz)  $\delta$  8.23 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz), 7.65 (1H, td,  $J = 6.9, 1.1$  Hz), 7.45 (1H, td,  $J = 7.0, 1.1$  Hz), 7.35 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.30 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz), 7.18 (2H, td,  $J = 7.7, 0.7$  Hz), 7.17 (1H, s), 6.87 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz), 6.53 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 6.03 (1H, dd,  $J = 17.7, 10.8$  Hz), 5.30 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz), 5.19 (1H, d,  $J = 18.3$  Hz), 5.14 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz), 4.73 (1H, s), 4.00 (1H, d,  $J = 14.1$  Hz), 2.77 (1H, s), 2.72 (1H, dt,  $J = 9.5, 6.7$  Hz), 2.51 (1H, d,  $J = 14.1$  Hz), 1.48 – 1.41 (0H, m), 1.32 (4H, d,  $J = 6.7$  Hz), 1.25 (7H, s), 1.00 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz)

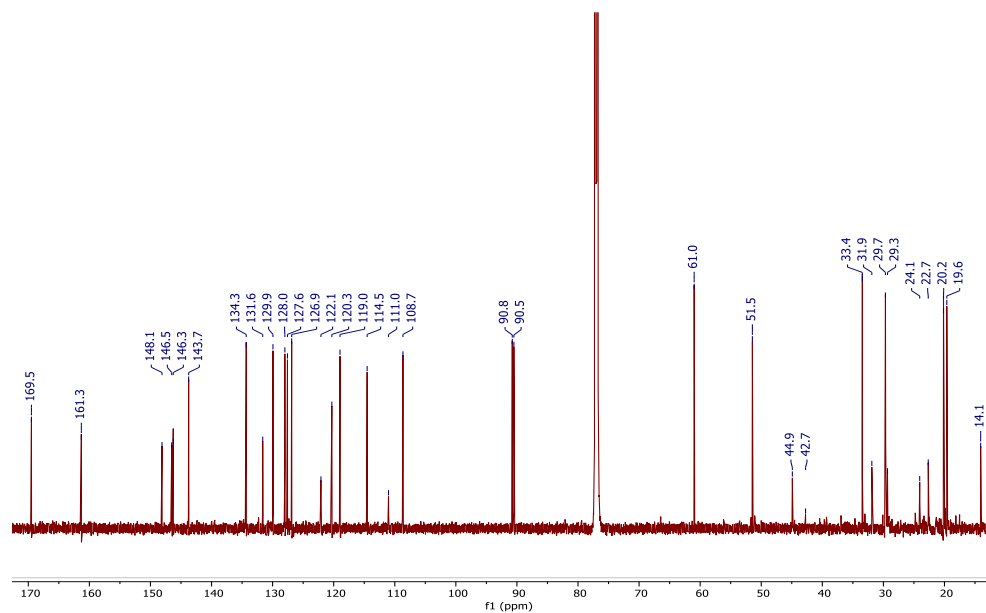


Figura A14. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **41** en  $\text{CDCl}_3$  a 175 MHz.

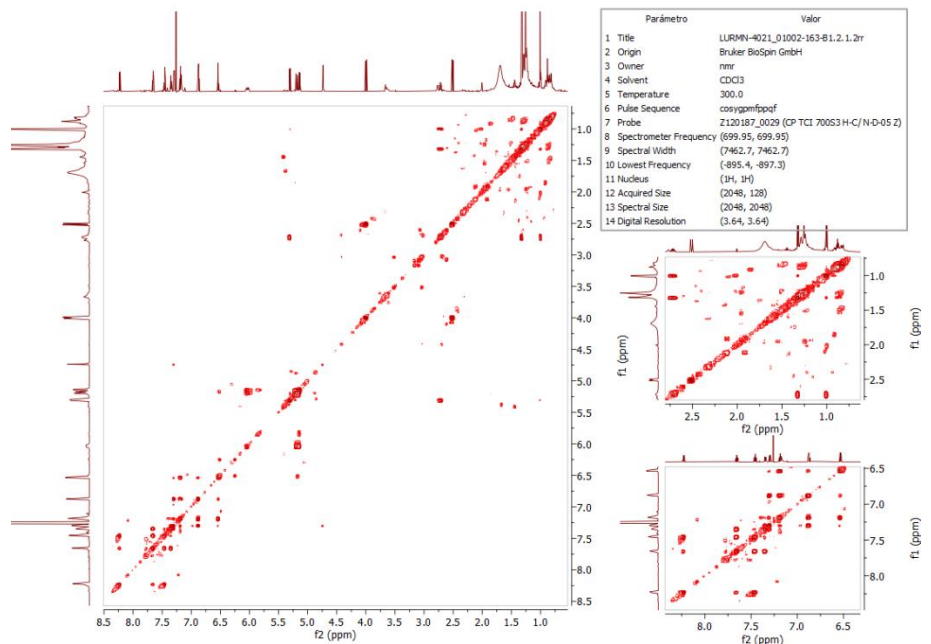


Figura A15. COSY del compuesto **41** en CDCl<sub>3</sub>.

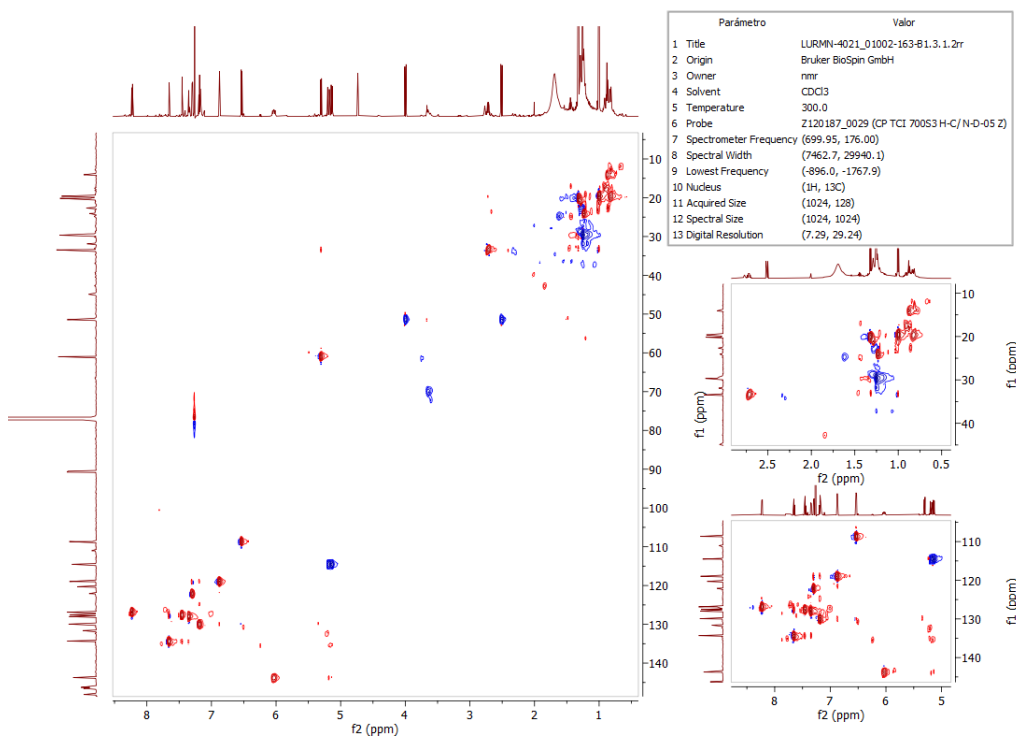


Figura A16. HSQC del compuesto **41** en CDCl<sub>3</sub>.

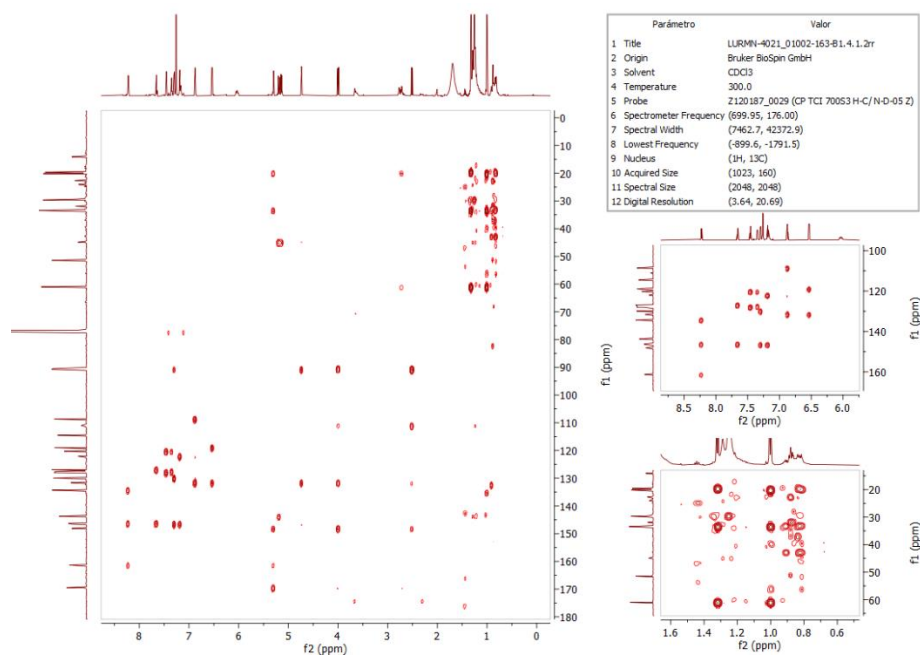


Figura A17. HMBC del compuesto **41** en  $\text{CDCl}_3$ .

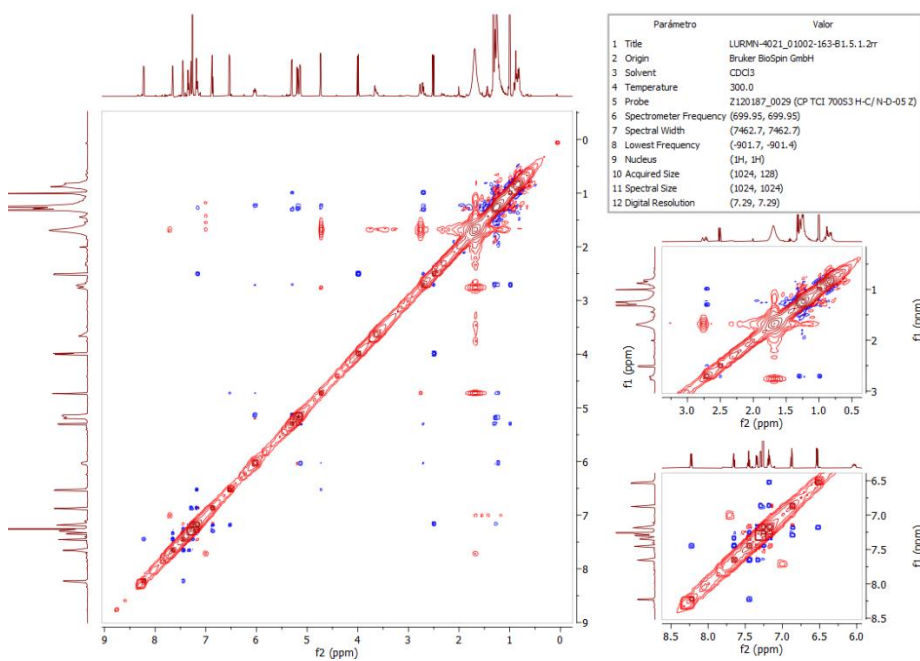
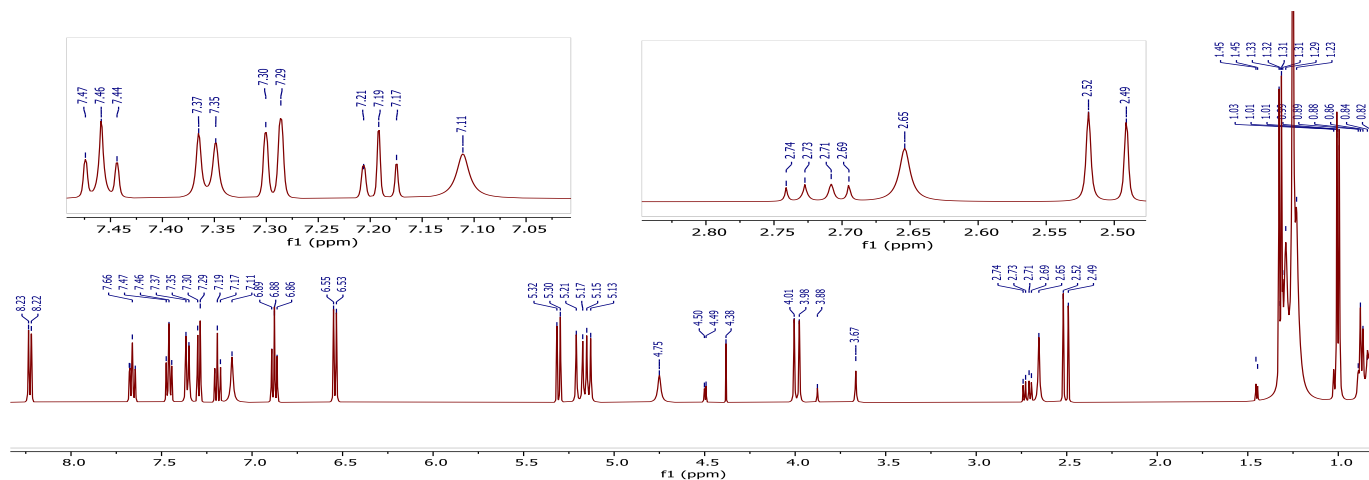


Figura A18. NOESY del compuesto **41** en  $\text{CDCl}_3$ .



Antes de la adición de agua deuterada (D<sub>2</sub>O)



Después de la adición de D<sub>2</sub>O

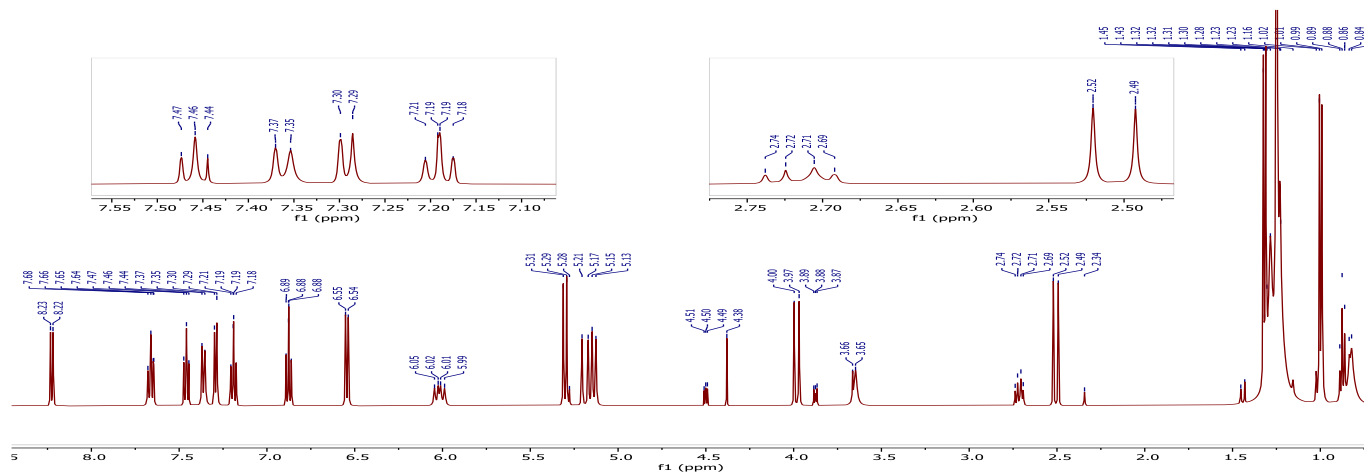


Figura A19. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto **41** en CDCl<sub>3</sub> a 500 Hz, antes y después de la adición de D<sub>2</sub>O.



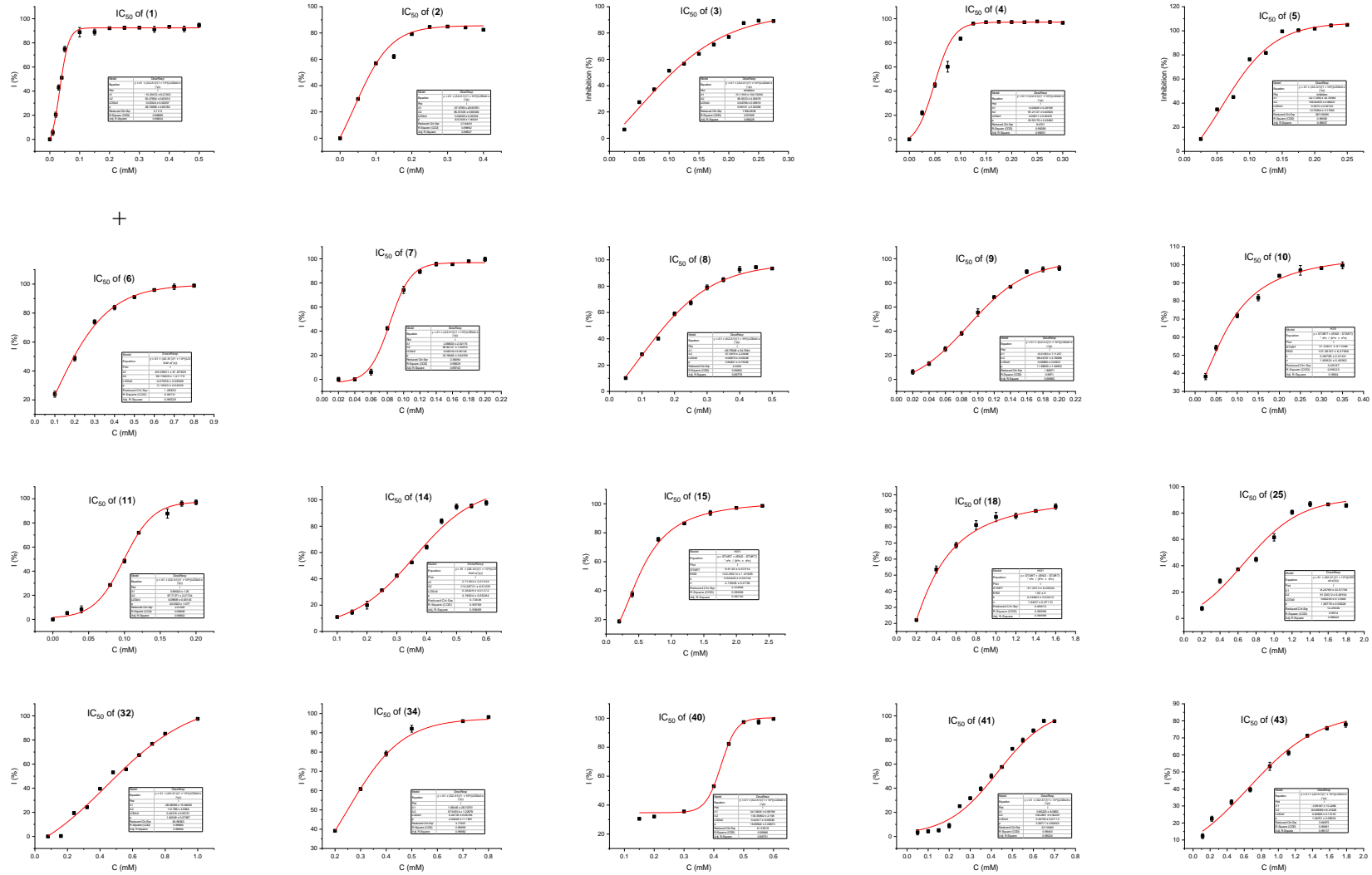


Figura A21. Curvas de CI<sub>50</sub> para los PNs en la Tabla A2, se ajustaron usando el software Origin 8.0.

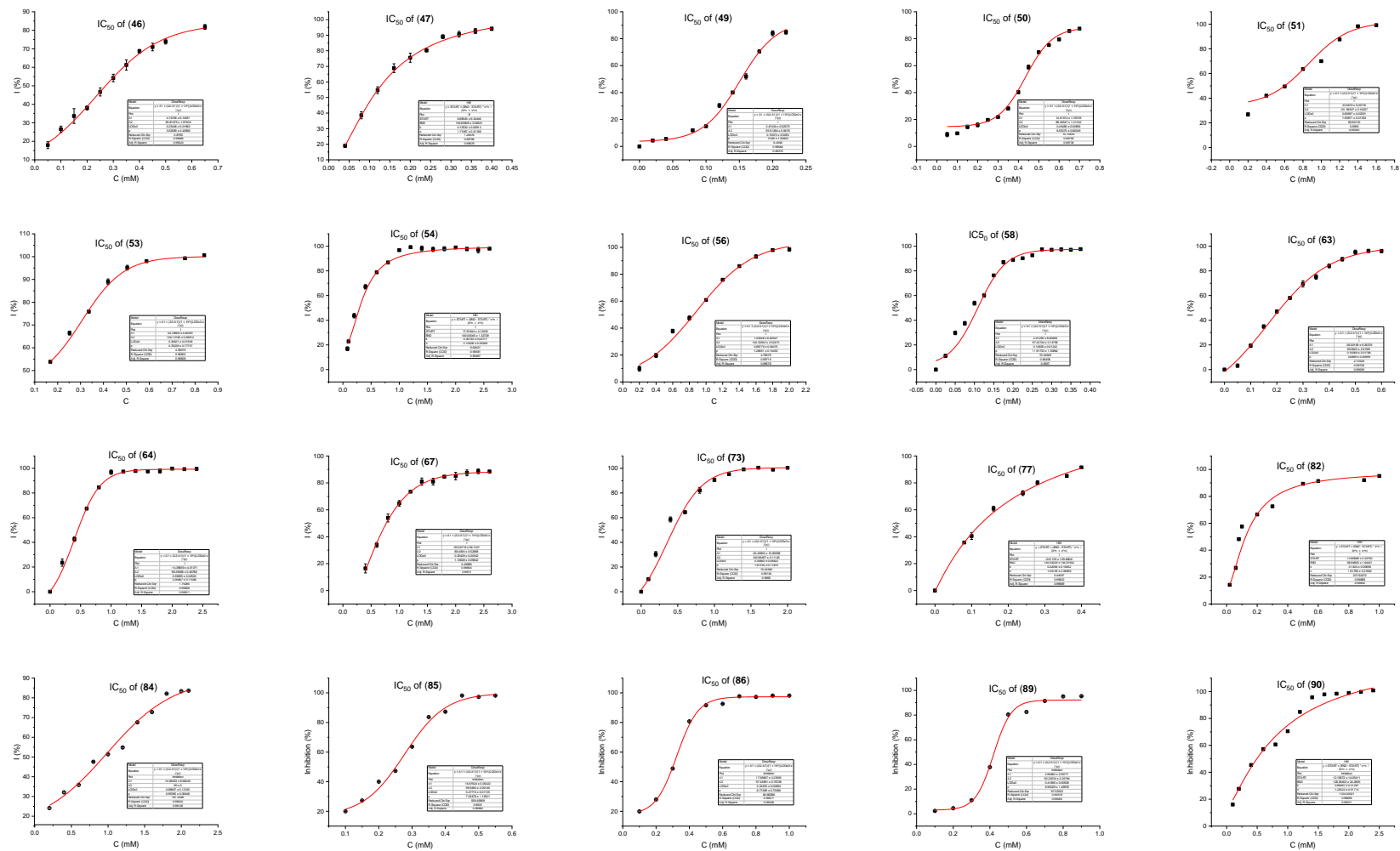


Figura A21. Curvas de CI<sub>50</sub> para los PN en la Tabla A2, se ajustaron usando el software Origin 8.0 (cont.).



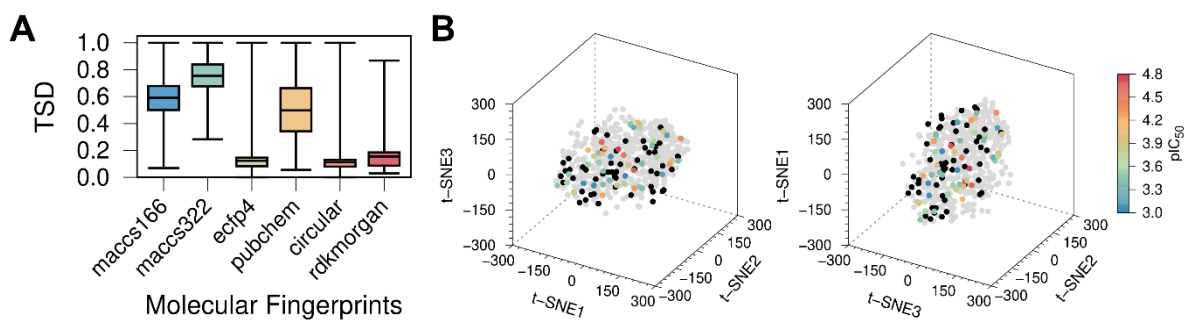


Figura A22. Selección de la huella digital molecular (descriptor) y su comparación del espacio químico.

(A) Huella digital molecular seleccionada para el espacio químico entre BIOFAQUIM y la librería de PN usando gráficas de distribución acumulada de Tanimoto (TSD); (B) Proyección del espacio químico utilizando t-SNE3.

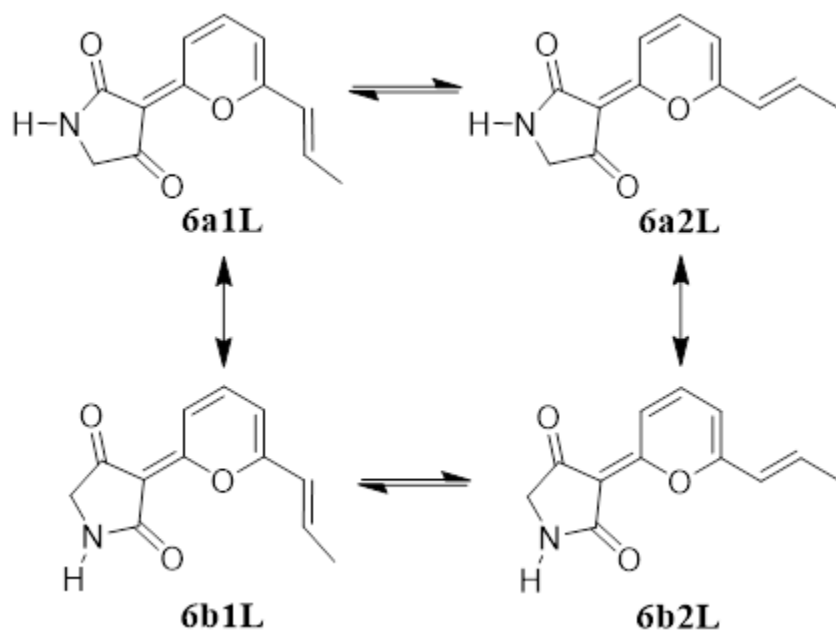


Figura A23. Compuesto *E/Z* 6L, mezcla de diastereoisómeros en solución (proporción 6.4:3.6, *E/Z*).

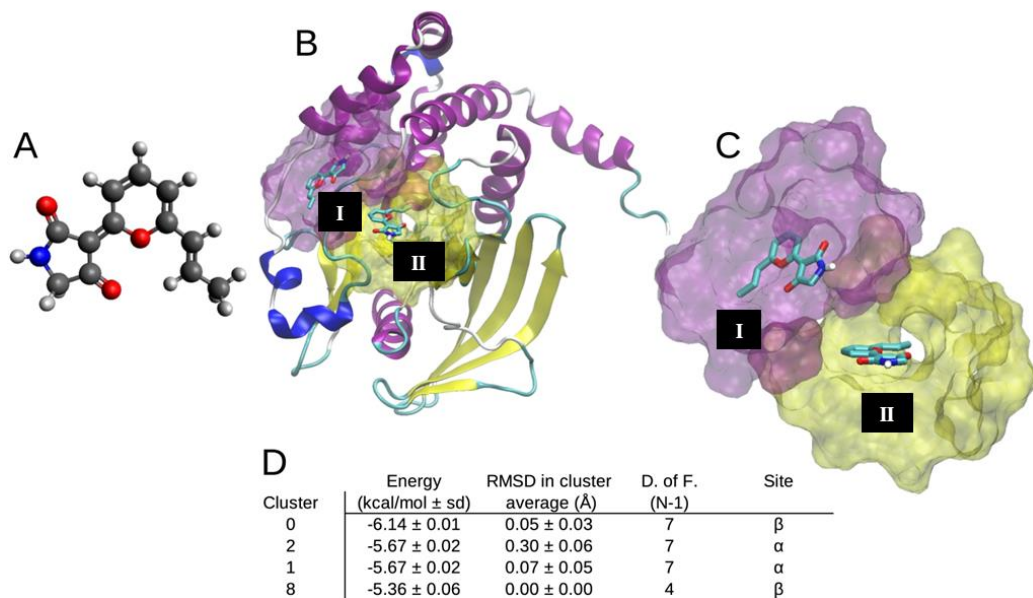


Figura A24. Docking de la vermelhotina **6a1L** con PTP1B (Q9PT91).

(A) Modelo tridimensional de **6a1L**; (B) Cavidades marcadas como superficies translúcidas en magenta (I) y amarilla (II); (C) Segunda pose de más baja energía; (D) Poses de más baja energía para el isómero **6a1L**.

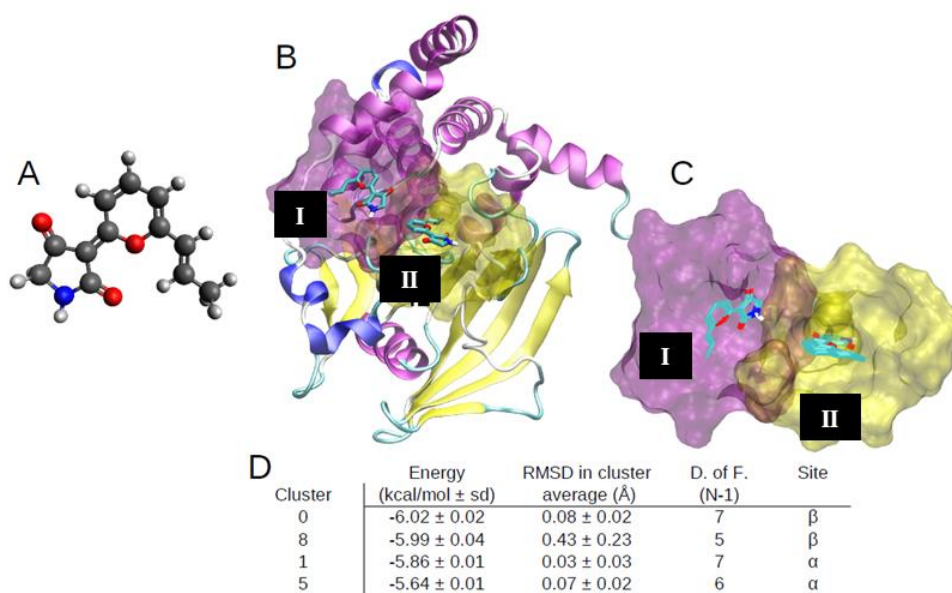


Figura A25. Docking de la vermelhotina **6a2L** con PTP1B (Q9PT91).

(A) Modelo tridimensional de **6a2L**; (B) Cavidades marcadas como superficies translúcidas, magenta (I) y amarilla (II); (C) Segunda pose de más baja energía; (D) Poses de más baja energía para el isómero **6a2L**.

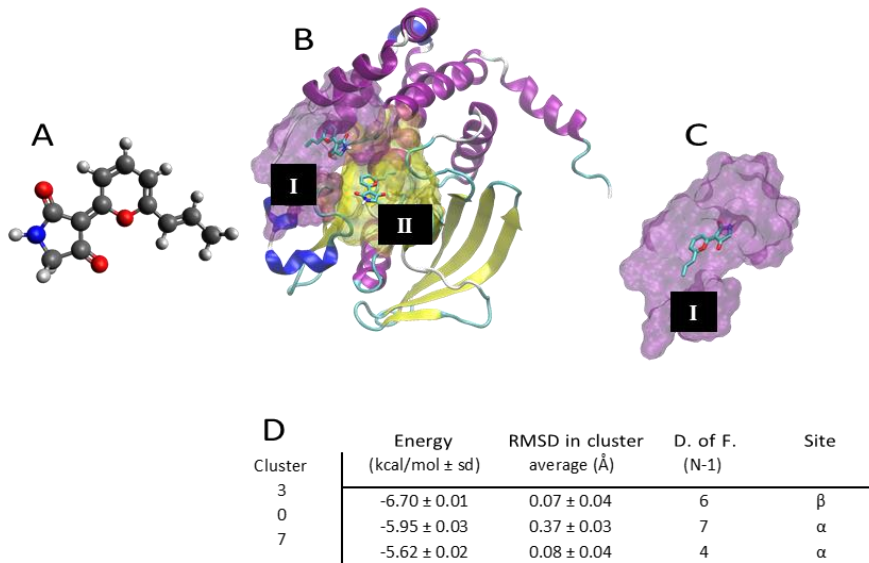


Figura A26. Docking de la vermelhotina **6b1L** con PTP1B (Q9PT91).

(A) Modelo tridimensional de **6b1L**; (B) Cavidades marcadas como superficies translúcidas, magenta (I) y amarilla (II); (C) Segunda pose de más baja energía; (D) Poses de más baja energía para el isómero **6b1L**.

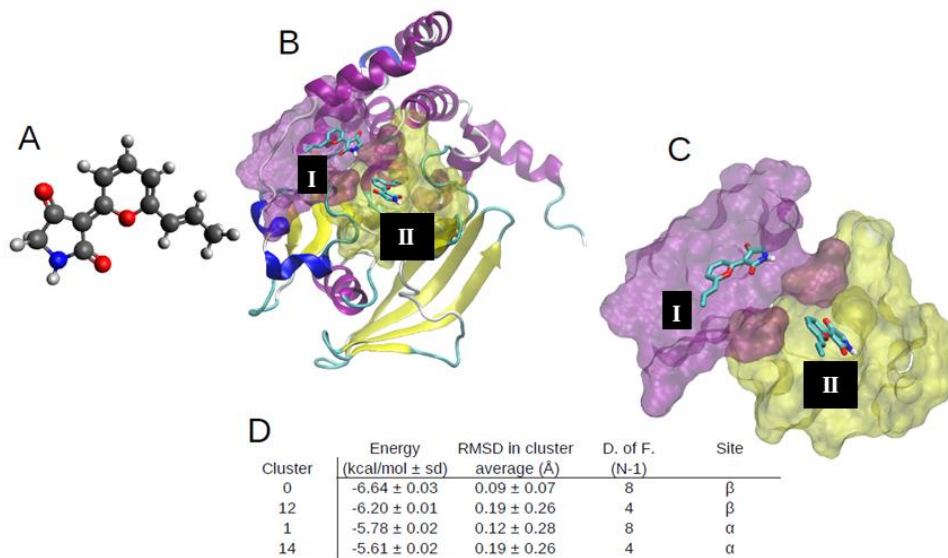


Figura A27. Docking de la vermelhotina **6b2L** con PTP1B (Q9PT91).

(A) Modelo tridimensional de **6b2L**; (B) Cavidades marcadas como superficies translúcidas, magenta (I) y amarilla (II); (C) Segunda pose de más baja energía; (D) Poses de más baja energía para el isómero **6b2L**.



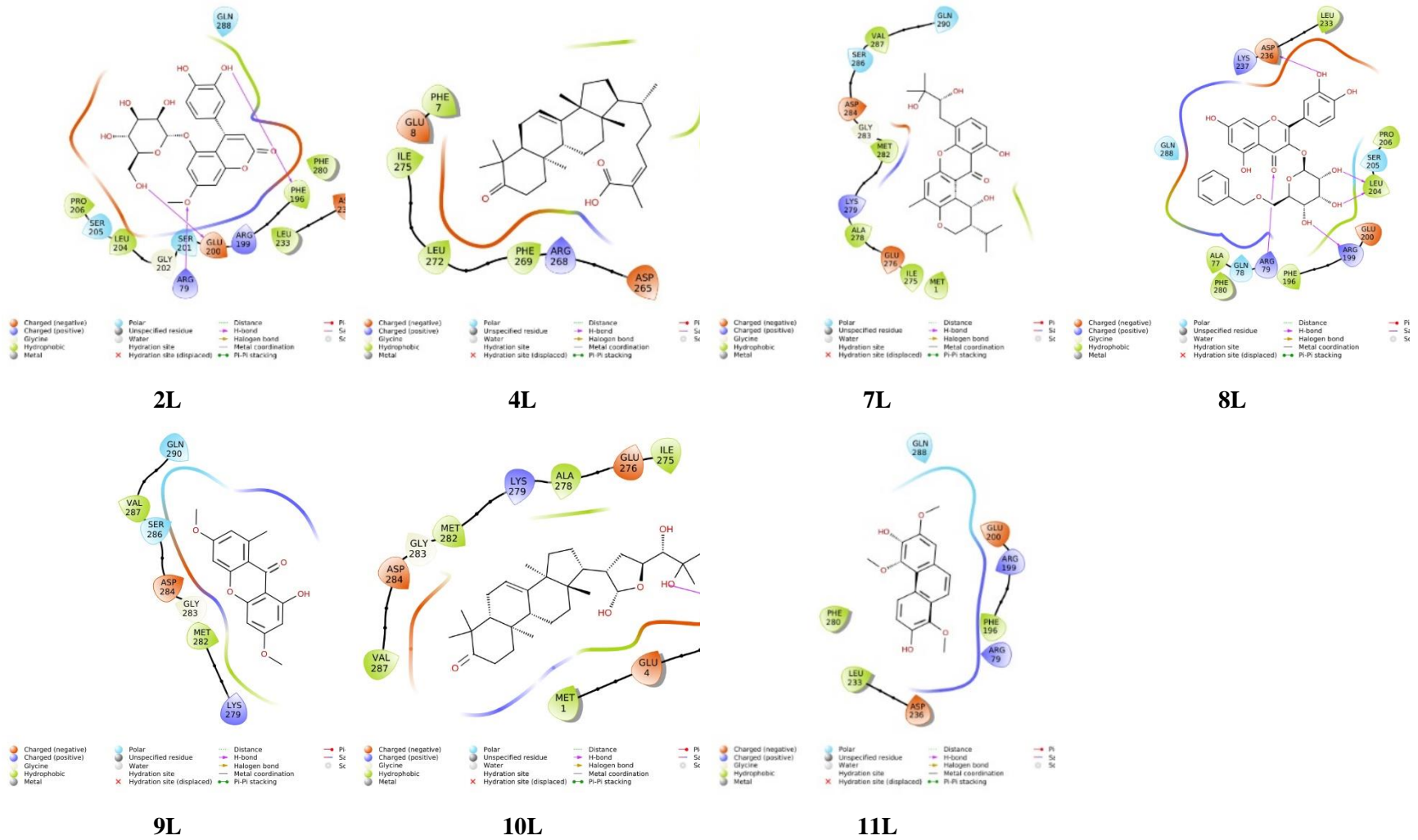


Figura A28. Interacciones en dos dimensiones entre PTP1B-ligandos (2L, 4L y 7L–11L); código AlphaFold: Q9PT9

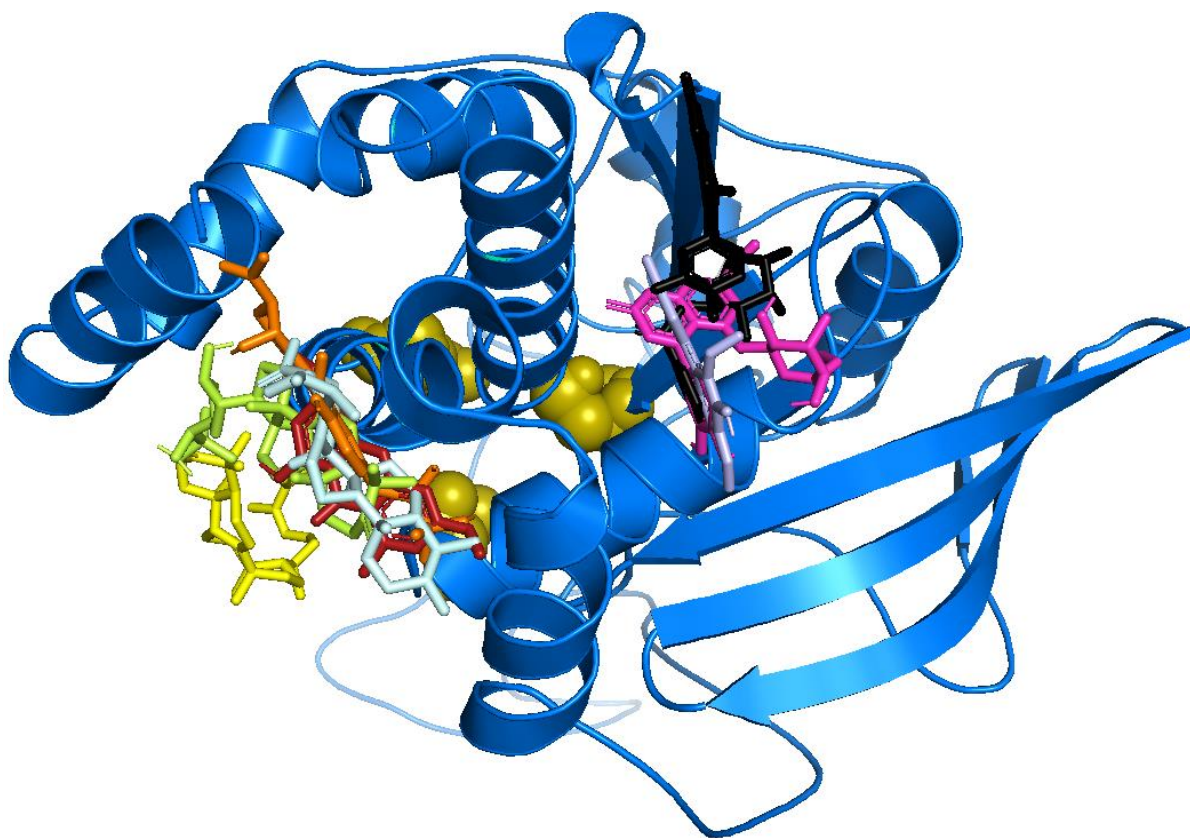


Figura A29. Predicción de interacciones entre PTP1B-ligandos en 3D, ligandos **2L**, **4L** y **7L–11L**. En el centro se muestra el diagrama de cintas de la PTP1B, el sitio activo se presenta en esferas de color verde oliva, los compuestos están en líneas: rosa (**2L**), amarillo (**4L**), naranja (**7L**), negro (**8L**), rojo ladrillo (**9L**), limón (**10L**), violeta (**11L**) y AU (blanco).

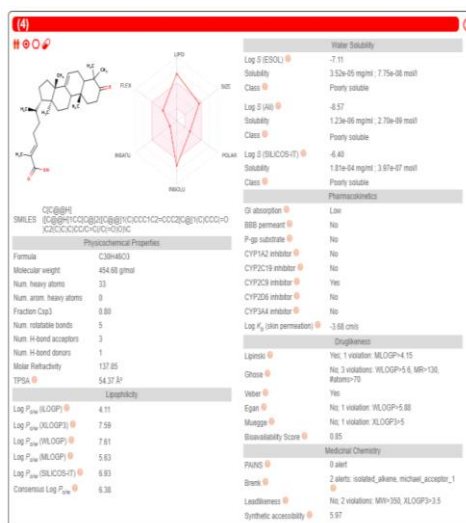
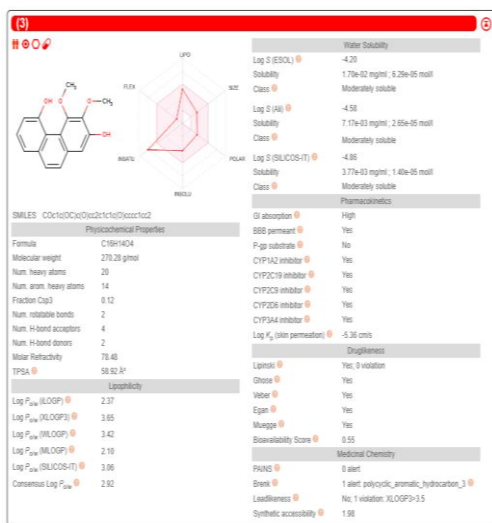
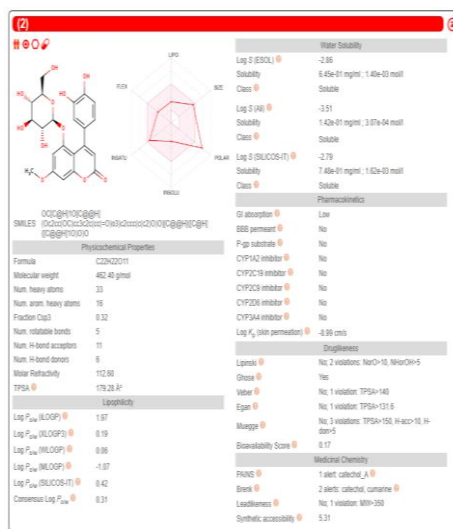
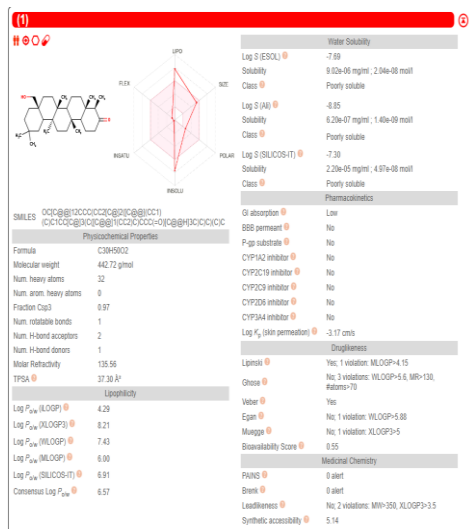


Figura A30. Predicción de propiedades fisicoquímicas y farmacocinética para los compuestos **1L–11L** empleando la SwissADME.

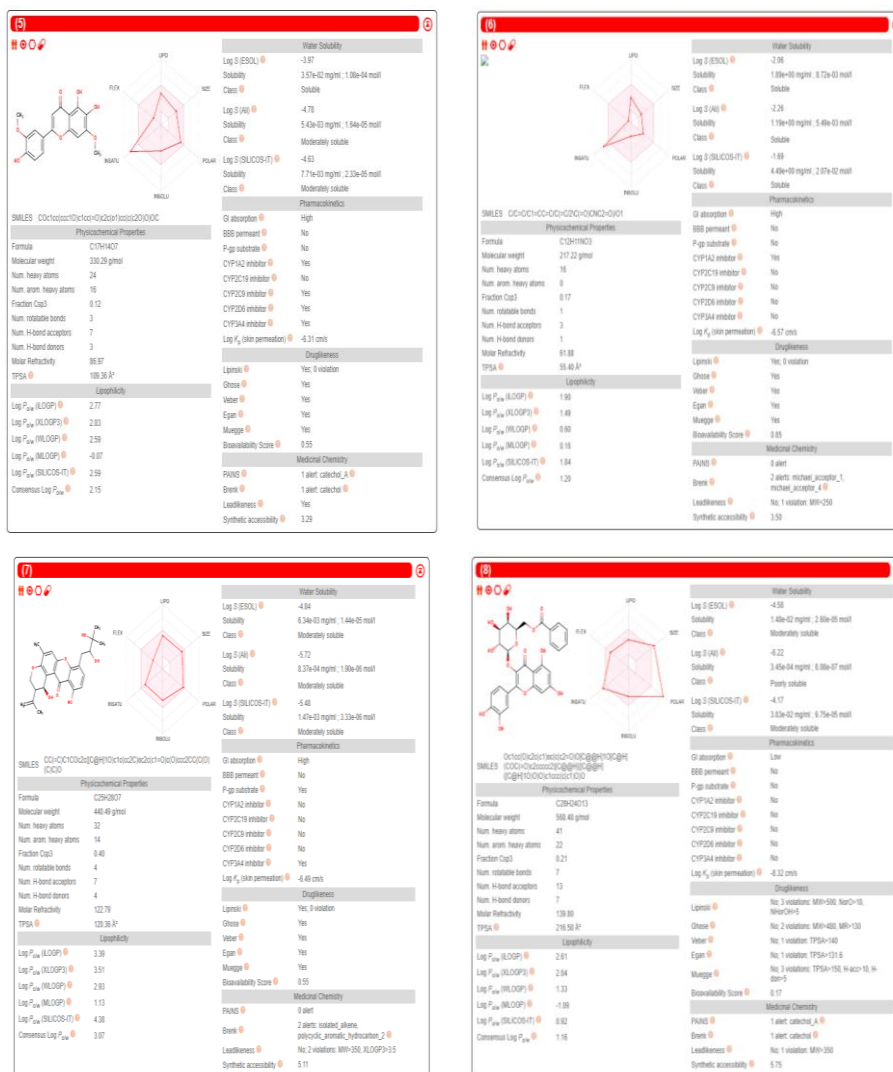


Figura A30. Predicción de propiedades fisicoquímicas y farmacocinética para los compuestos 1L–11L empleando la SwissADME (cont.).

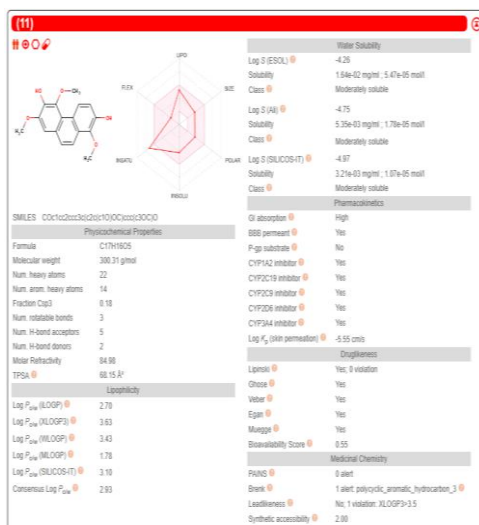
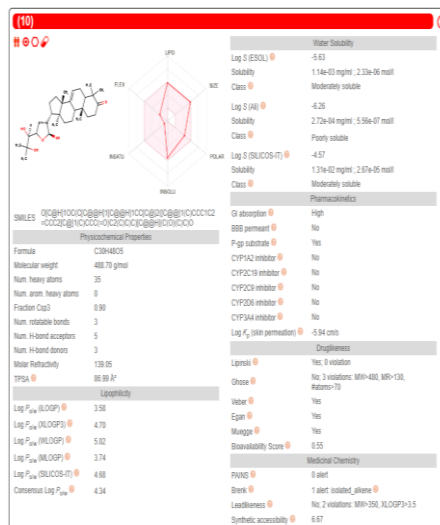
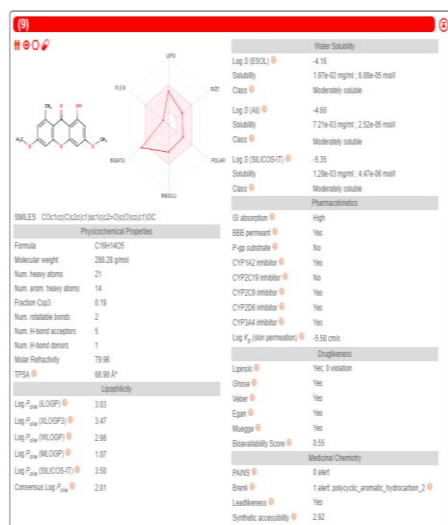


Figura A30. Predicción de propiedades fisicoquímicas y farmacocinética para los compuestos 1L–11L empleando la SwissADME (cont.).

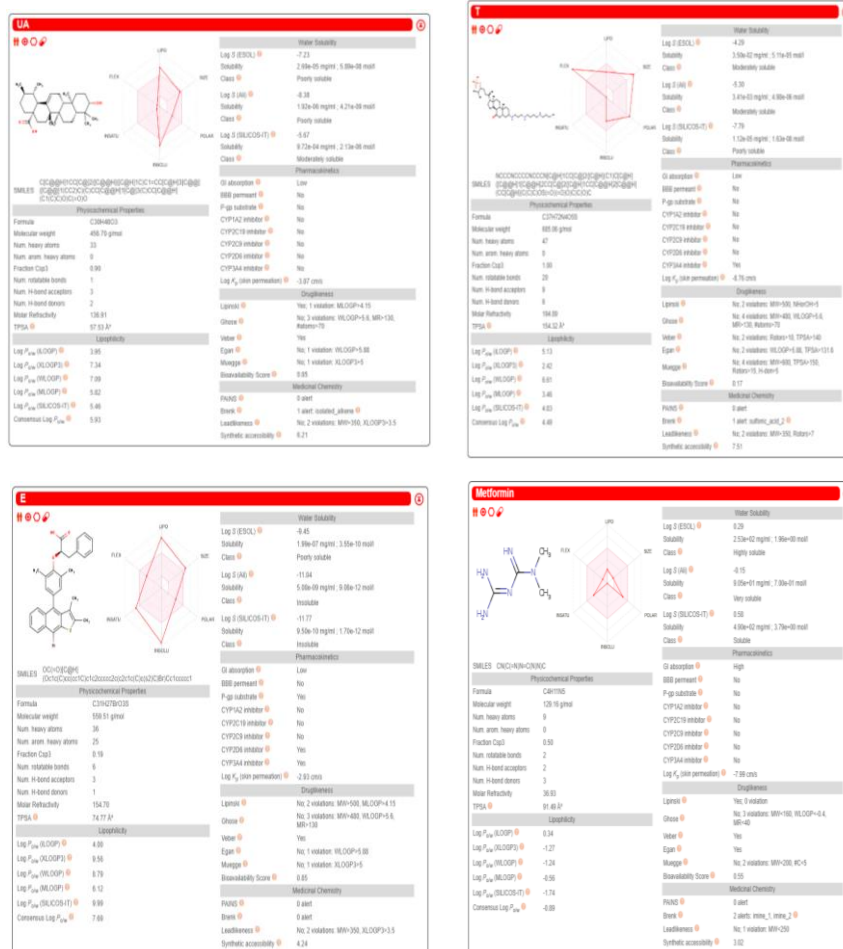


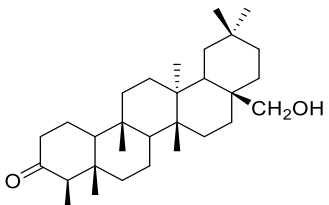
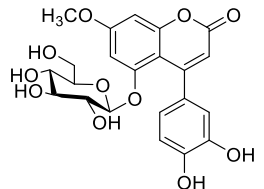
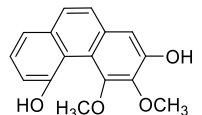
Figura A30. Predicción de propiedades fisicoquímicas y farmacocinética para los compuestos 1L–11L empleando la SwissADME (cont.).



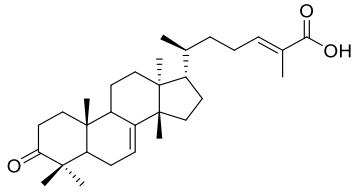
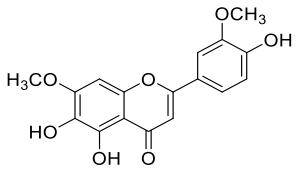
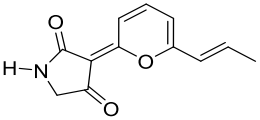
Tabla A1. Análisis de probabilidad DP4+ para los dos niveles de teoría usado en la predicción del espectro de DC para el compuesto **41** mPW1PW91/6-31G+(d,p).

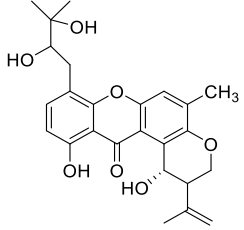
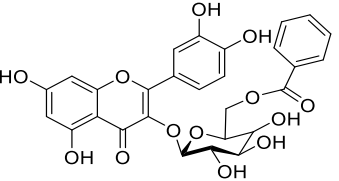
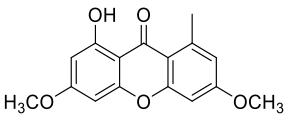
Functional		Solvent?	Basis Set				Type of Data
mPW1PW91		PCM	6-31+G(d,p)				Shielding Tensors
		DP4+	0.02%	0.00%	99.98%	0.00%	-
Nuclei	sp2?	Experimental	Isomer 1	Isomer 2	Isomer 3	Isomer 4	Isomer 5
H	x	7.30	24.0874906	23.7636838	23.7616403	24.0888703	
C	x	122.10	75.9121944	72.365399	72.3234454	75.9214721	
C	x	108.70	87.4272878	86.4862981	86.4761536	87.3903179	
C	x	131.60	66.24916	68.2891389	68.4678493	66.2614475	
C	x	119.00	77.6989847	78.863599	78.8550237	77.7068053	
C	x	129.90	69.2557667	66.3100519	66.2319031	69.2566876	
C	x	146.50	47.8837553	48.9104877	49.0000196	47.8737677	
H	x	6.87	24.4083676	24.3073006	24.3139562	24.4100721	
H	x	7.18	24.0055181	23.8629155	23.8710428	24.0069807	
H	x	6.53	24.4903316	24.3689007	24.3678653	24.4933713	
C		90.80	104.32862	105.740272	105.555697	104.331601	
C		111.00	96.5862247	101.640474	102.119793	96.5871102	
C		51.50	154.950302	146.874103	146.942655	154.963481	
H		4.00	27.271559	28.5841122	27.9532141	29.2813927	
H		2.51	29.2837915	27.9140621	28.5747109	27.2737699	
C		44.90	145.388103	146.207345	145.829271	145.371376	
C		29.70	171.451982	167.704552	174.627703	167.529783	
H		1.25	30.5245436	29.9622167	30.7918194	30.7482151	
H		1.25	31.3897597	30.2397227	29.6644229	29.4994328	
H		1.25	30.8176459	30.9574679	30.458471	30.2183349	
C		29.70	167.542384	174.637175	168.679396	171.482672	
H		1.25	29.491844	29.6619808	30.9277242	30.8186796	
H		1.25	30.2300851	30.522689	30.1904977	31.3833148	
H		1.25	30.7460913	30.7595617	29.9267804	30.518885	
C		143.70	44.6036228	51.7767198	51.8438222	44.6401261	
H		6.03	24.5941737	24.573186	24.5610185	24.6101309	
C	x	114.50	84.3304715	83.4908646	83.9103762	84.3530147	
H	x	5.19	25.8633924	26.1086128	26.0987653	25.8714801	
H	x	5.14	26.0090322	26.030471	26.049163	26.0117108	
C		90.50	94.1867392	106.613826	106.508483	94.193838	
C	x	169.50	29.8536992	26.0982763	25.225163	29.8603679	
C		61.00	132.134849	124.995217	125.566091	132.145936	
H		5.30	26.1013138	26.2403898	26.3122215	26.103805	
C	x	148.10	44.1619743	44.4901437	44.6460712	44.16168	
C	x	161.30	36.8486603	35.7568672	35.7730326	36.8535588	
C	x	120.30	77.0046439	74.6548079	74.8114348	77.009826	
C	x	134.30	64.4690381	64.5372961	64.4718555	64.4731604	
C	x	146.30	50.9532447	52.6362823	52.5286515	50.9583676	
C	x	126.90	69.9569883	69.5554845	69.6008398	69.9582492	
C	x	127.60	72.2476137	71.4543594	71.4662348	72.250068	
C	x	128.00	70.7716791	70.5492235	70.5253402	70.7763329	
H	x	8.23	22.8536127	22.7897946	22.7961929	22.8551935	
H	x	7.45	23.7266959	23.6636212	23.6618325	23.7280235	
H	x	7.35	23.4743893	23.5250146	23.5174504	23.4761255	
H	x	7.65	23.4355412	23.3727794	23.3728461	23.4369748	
C		33.40	159.250736	163.125277	161.959504	159.262474	
H		2.72	28.5282338	27.0879311	27.335781	28.5281744	
C		20.20	176.438305	173.148907	176.765915	175.718716	
H		1.32	30.5072471	29.6931485	30.2946057	30.4913983	
H		1.32	30.7889443	30.4007266	30.368725	29.8666438	
H		1.32	30.8278241	30.4732977	29.8841032	30.510469	
C		19.60	175.709036	177.648743	173.798465	176.457128	
H		1.00	30.4899085	29.847435	29.7772695	30.7936663	
H		1.00	30.5086313	30.5371161	30.4584903	30.5109512	
H		1.00	29.8633424	30.2578167	30.641272	30.8307399	

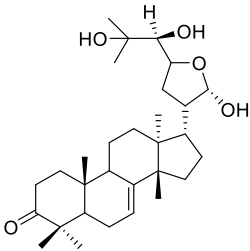
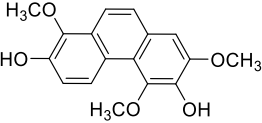
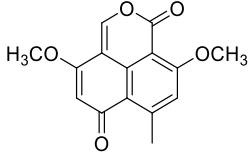
Tabla A2. Resultados de la actividad inhibitoria de 99 PN utilizando un ensayo *in vitro*.

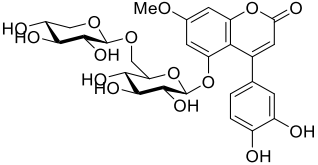
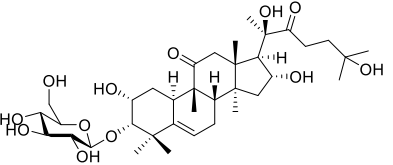
No	NAME	%I <sup>1</sup> (0.2 mM, 1 mM)	S	Compound type	Source/extract	Reference
1L	 Canophyllol	$95.54 \pm 1.82$ $98.59 \pm 0.28$	MS	Triterpenoid friedelane	Stem bark and root of <i>Hippocratea excelsa</i> Kunth (syn.: <i>Semialarium</i> <i>mexicanum</i> (Miers) Menega) (Celastraceae) Hexane extract	Calzada, et al., 1991
2L	 5-O-(β-D-Glucopyranosyl)-7-methoxy-3'-4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin	$42.48 \pm 1.16$ $95.13 \pm 0.54$	S	4-Phenylcoumarin	Stem bark of <i>Hintonia</i> <i>latiflora</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Bullock. (Rubiaceae) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	Guerrero-Analco, et al., 2005
3L	 Phenanthrene	$70.62 \pm 0.58$ $97.4 \pm 0.69$	MS	Phenanthrene	Whole plant of <i>Maxillaria densa</i> Lindl. (Orchidaceae)	Estrada, et al., 1999

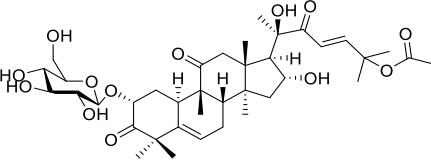
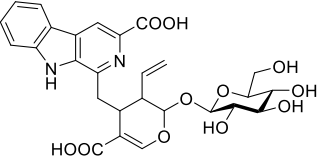
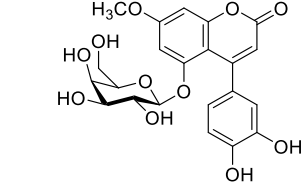


					CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	
	3,4-Dimethoxy-2,5-phenanthrenediol					
<b>4L</b>		73.69 ± 2.31 111.54 ± 1.19	MS	Triterpenoid tirucallane	Stem bark of <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl. (Anacardiaceae)	Rivero-Cruz, et al., 2005
	Masticadienonic acid				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	
<b>5L</b>		59.55 ± 1.18 104.4 ± 2.49	MS	Flavonoid flavone	Aerial parts of <i>Salvia amarissima</i> Ortega (syn.: <i>Salvia circinnata</i> Cav. (Lamiaceae)	Salinas-Arellano, et al., 2020
	4',5,6-Trihydroxy-3',7-dimethoxyflavone				Ethyl acetate fraction from the infusion Endophytic fungus MEXU 26343	
<b>6L</b>		77.07 ± 0.13 92.82 ± 2.7	MS	Pyrrolidine-2,4-dione	isolated from leaves of <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Moc. ex	Leyte-Lugo, et al., 2012
	<i>E/Z</i> -vermelhotin					

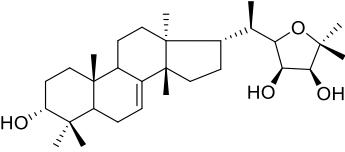
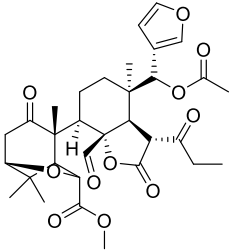
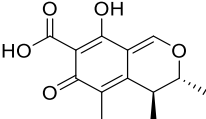
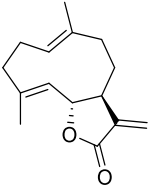
					DC.) Bull. (Rubiaceae). CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	
<b>7L</b>	 <p>Tajixanthone hydrate</p>	$97.49 \pm 1.58$ $97.86 \pm 0.84$	S	Xanthone	<i>Emericella</i> sp. strain 25379, isolated from the surface of a Coral CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	Figueroa, et al., 2009
<b>8L</b>	 <p>Quercetin-3-O-(6''-benzoyl)-β-D-galactoside</p>	$58.14 \pm 2.26$ $96.82 \pm 0.51$	S	Flavonoid Flavonol	Branches and leaves of <i>Vauquelinia</i> <i>corymbosa</i> Corrêa ex Humb. & Bonpl. (Rosaceae)	Flores-Bocanegra, et al., 2015
<b>9L</b>	 <p>Lichexanthone</p>	$52.71 \pm 0.53$ $95.37 \pm 3.08$	MS	Xanthone	Ethyl acetate fraction from the infusion Air-dried lichen material of <i>Parmotrema</i> <i>tinctorum</i> Nyl. (Hale) (Parmeliaceae)	Rojas et al., 2000

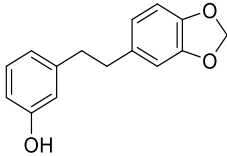
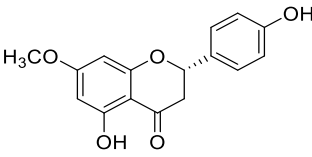
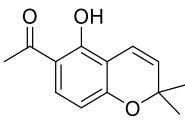
<b>10L</b>		$57.08 \pm 1.66$ $99.51 \pm 0.99$	MS	Protolimonoid	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract Seeds of <i>Guarea grandiflora</i> Steud. (syn.: <i>Guarea macrophylla</i> Vahl) (Meliaceae)	Jiménez, et al., 1998
	Melianodiol				Hexane-CHCl <sub>3</sub> (1:1) extract	
<b>11L</b>		$87.05 \pm 0.91$ $99.89 \pm 0.16$	S	Phenanthrene	Pseudobulbs of <i>Cyrtopodium macrobulbon</i> (Lex.) G.A. Romero & Carnevali (Orchidaceae) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	Morales-Sánchez, et al., 2014
	Confusarin					
<b>12L</b>		$38.47 \pm 7.36$ $65.94 \pm 8.46$	I	Polyketide benzo[de]isochromene	<i>Sporormiella minimoides</i> S.I. Ahmed & Cain (Sporormiaceae), an endophytic fungus	Leyte-Lugo, et al., 2013
	3,6-Dimethoxy-8-methyl-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> - benzo[de]isochromene-1,9-dione					

					from <i>Hintonia latiflora</i> (Rubiaceae)	
					CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	
						
<b>13L</b>	5-O-[β-D-Xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin	50.14 ± 5.9 86.46 ± 3.32	S	4-Phenylcoumarin	Stem bark of <i>H. latiflora</i>	Guerrero-Analco, et al., 2007
					CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	
						
<b>14L</b>	3-O-β-D-Glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F	56.13 ± 4.18 94.59 ± 3.14	MS	Triterpenoid cucurbitane	1. Stem bark of <i>H. standleyana</i>	Guerrero-Analco, et al., 2005
					2. Stem bark of <i>H. latiflora</i>	Mata, et al., 1990
					MeOH extract	

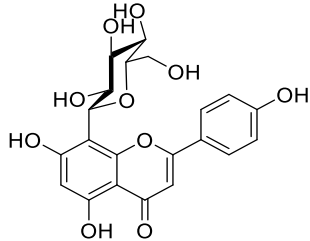
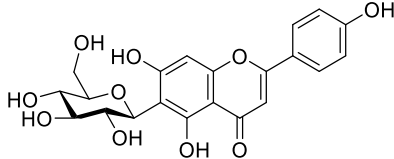
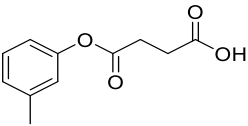
15L	 <p>Arvenin I</p>	$70.15 \pm 17.42$ $96.32 \pm 2.63$	S	Triterpenoid cucurbitane	Aerial parts of <i>Cigarrilla mexicana</i> (Zucc. & Mart. ex DC.) Aiello (syn.: <i>Nernstia mexicana</i> (Zucc. & Mart. ex DC.) Urb) (Rubiaceae) MeOH extract	Mata, et al., 1988a
16L	 <p>Desoxycordifolinic acid</p>	$55.44 \pm 32.22$ $84.92 \pm 19.42$	S	Alkaloid	Stem bark of <i>H.</i> <i>standleyana</i> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract.	Déciga-Campos, et al., 2006
17L	 <p>5-<i>O</i>-β-D-Galactopyranosyl-7- methoxy-3',4'-dihydroxy-4- phenylcoumarin</p>	$6.03 \pm 0.85$ $14.48 \pm 0.9$	S	4-Phenylcoumarin	Stem bark of <i>H.</i> <i>standleyana</i> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH extract.	Cristians, et al., 2009

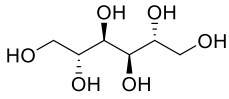
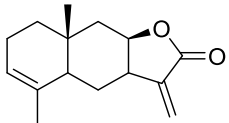
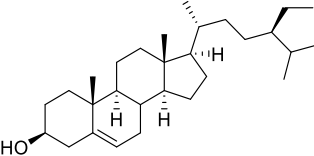
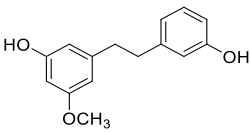
<b>18L</b>		$2.68 \pm 37.39$ $95.87 \pm 0.41$	S	4-Phenylcoumarin	Stem bark of <i>H. standleyana</i>  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract.	Cristians, et al., 2009
<b>19L</b>		$1.61 \pm 3.58$ $22.01 \pm 7.7$	S	Triterpenoid dammarane	Synthetic analog of 20( <i>S</i> )-dammar- 13(17),24-diene-3 $\beta$ -yl acetate (Isolated of <i>Stevia salicifolia</i> Car.)	Mata, et al., 1991a
<b>20L</b>		$31.66 \pm 3.43$ $49.04 \pm 7.17$	MS	Limonoid	Seeds of <i>G. grandiflora</i>  $\text{Hexane-CHCl}_3$ (1:1) extract	Jimenez, et al., 1998

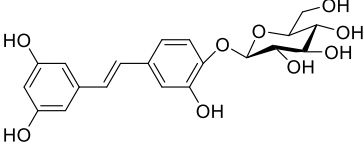
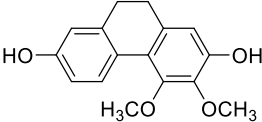
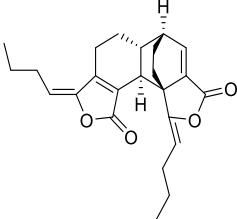
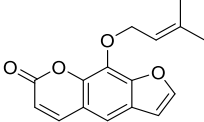
21L		$87.52 \pm 7.11$ $90.19 \pm 2.94$	I	Protolimonoid	Wood of <i>Cedrela odorata</i> L. (Meliaceae) CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	Achnine, et al., 1998
22L		$-29.83 \pm 7.95$ $27.67 \pm 12.75$	I	Limonoid	Stem bark <i>Cedrela salvadorensis</i> Standl. (Meliaceae). CHCl <sub>3</sub> extract	Segura, et al., 1994
23L		$35.88 \pm 4.92$ $79.83 \pm 0.88$	MS	Polyketide	Coprophilous Fungus <i>Guanomyces polythrix</i> M.C. González, Hanlin & Ulloa (Chaetomiaceae) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	Macias, et al., 2000
24L		$72.56 \pm 1.3$ $88.22 \pm 4.51$	MS	Sesquiterpene lactone	Roots of <i>Cosmos pringlei</i> B.L.Rob. & Fernald (Asteraceae)	Mata, et al., 2002

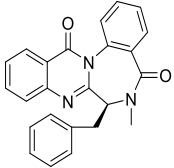
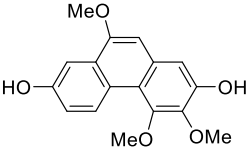
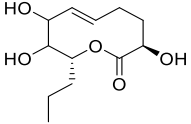
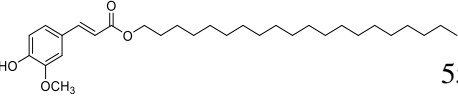
					CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH extract (1:1)	
	Costunolide					
						
<b>25L</b>		35.82 ± 3.52 107.56 ± 2.58	MS	Stilbenoid	Synthetic analog of gigantol	Reyes-Ramírez, et al., 2011
	Phenol, 3-[2-(1,3-benzodioxol-5- yl)ethyl]-]					
						
<b>26L</b>		36.49 ± 0.04 59.88 ± 10.2	MS	Flavonoid flavanone	Aereal parts of <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. (Sapindaceae)	Mata et al., 1991b
	Sakuranetin				CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	
						
<b>27L</b>		-7.18 ± 5.46 36.08 ± 11.99	MS	Chromene	Aerial parts of <i>Calea ternifolia</i> Kunth (Asteraceae)	Escandon-Rivera, et al., 2017
	Desmethylisoencecalin				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	

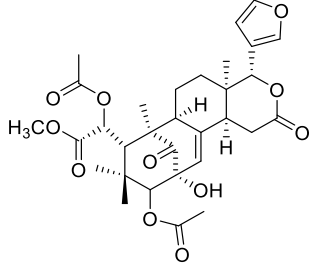
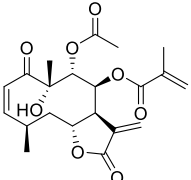
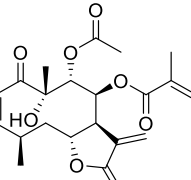


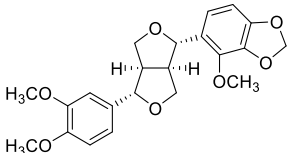
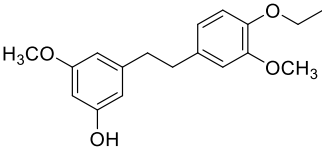
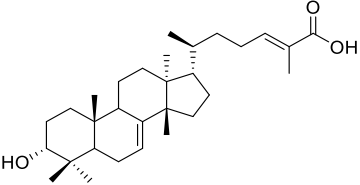
28L		$53.3 \pm 7.41$ $80.18 \pm 5.15$	S	Flavonoid flavone	1. Whole plant of <i>Nidema boothii</i> (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae) $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) extract 2. Whole plant of <i>Epidendrum rigidum</i> Jacq. (Orchidaceae). $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) extract	Hernández- Romero, et al., 2004  Hernández- Romero, et al., 2005
29L		$52.26 \pm 1.11$ $74.76 \pm 4.32$	S	Flavonoid flavone	2. Whole plant of <i>E.</i> <i>rigidum</i> $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) extract	Hernández- Romero, et al., 2005
30L		$34.01 \pm 3.25$ $67.66 \pm 3.76$	S	Phenyl succinate	A reaction intermediate in synthesis of derivatives.	Reyes-Ramírez, et al., 2011

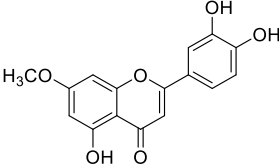
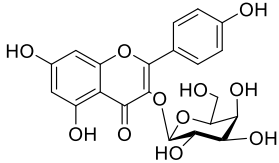
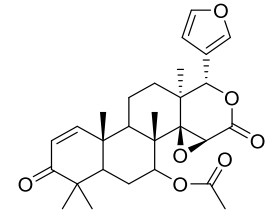
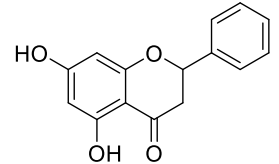
31L		$26.3 \pm 6.56$ $69.08 \pm 5.84$	S	Polyol	Stem bark of <i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Roem. et Schult. (Rubiaceae). Methanol extract	Mata, et al., 1987
32L		$58.33 \pm 4.07$ $100.01 \pm 0.3$	MS	Sesquiterpene lactone	Roots of <i>Ratibida</i> <i>mexicana</i> (S.Watson) W. M. Sharp (Asteraceae) Methanol extract	Calera, et al., 1995
33L		$12.5 \pm 1.39$ $62.5 \pm 7.34$	I	Steroid	Roots of <i>Cosmos</i> <i>pringlei</i> B.L.Rob. & Fernald (Asteraceae) $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract (1:1)	Mata, et al., 2002
34L		$47.23 \pm 1.15$ $98.01 \pm 0.9$	S	Stilbenoid	Pseudobulbs of <i>C.</i> <i>macrobulbon</i> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ extract	Morales-Sánchez, et al., 2014

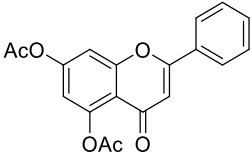
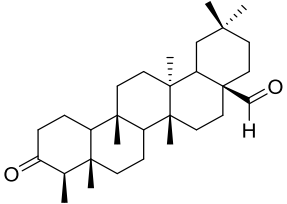
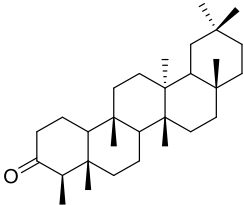
<b>36L</b>		$24.44 \pm 3.6$ $41.52 \pm 3.52$	S	Stilbenoid	Roots of <i>Rumex</i> <i>hymenosepalus</i> Torr. (Polygonaceae) $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) extract	Rivero-Cruz, et al., 2005
<b>37L</b>		$20.90 \pm 3.04$ $27.89 \pm 4.53$	MS	Phenanthrene	Whole plant of <i>M.</i> <i>densa</i> $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) extract	Estrada et al., 1999
<b>38L</b>		$32.75 \pm 2.47$ $60.3 \pm 4.69$	I	Phthalide	Roots of <i>Ligusticum</i> <i>porteri</i> J.M. Coult. & Rose (Apiaceae). $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract	Brindis, et al., 2011
<b>39L</b>		$37.96 \pm 2.01$ $90.3 \pm 0.12$	S	Furanocoumarin	Aerial parts of <i>Esenbeckia</i> <i>yaaxhokob</i> Lundell (Rutaceae) $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract	Mata, et al., 1998

40L	 <p>Benzomalvin A</p>	$92.43 \pm 1.98$ $99.55 \pm 0.36$	MS	Tripeptide	fungus <i>Penicillium</i> <i>spathulatum</i> Frisvad & Samson (Trichocomaceae). CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH extract	Del Valle, et al., 2016
41L	 <p>Gymnopusin</p>	$43.78 \pm 0.45$ $97.14 \pm 0.44$	MS	Phenanthrene	Whole plant of <i>M.</i> <i>densa</i> CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	Valencias-Islas, et al., 2002 Estrada, et al., 1999
42L	 <p>Herbarumin II</p>	$28.6 \pm 1.02$ $63.05 \pm 2.4$	S	Nonenolide	Fungus <i>Phoma</i> <i>herbarum</i> Westend (Sphaeropsidaceae) [syn. <i>Phoma</i> <i>pigmentivora</i> Masee] Ethyl acetate extract	Rivero-Cruz, et al., 2000
43L	 <p>Eicosyl 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamate</p>	$55.82 \pm 3.24$ $98.68 \pm 0.87$	S	Phenylpropanoid	Whole plant of <i>M.</i> <i>densa</i> CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	Rodriguez Lizana, 1998

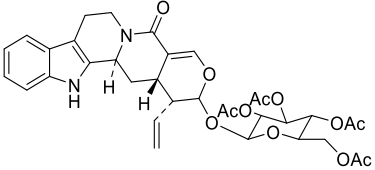
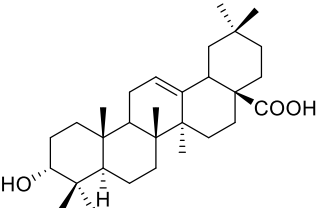
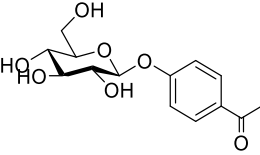
44L		$53.4 \pm 1.26$ $84.38 \pm 5.17$	I	Limonoid	Seeds of <i>Swietenia humilis</i> Zucc. (Meliaceae) MeOH extract	Segura-Correa, et al, 1993
Humilinolide D						
45L		$39.05 \pm 2.32$ $77.16 \pm 0.87$	I	Sesquiterpene lactone	Aerial parts of <i>C. ternifolia</i> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract (1:1)	Escandón-Rivera, et al., 2017
Calein C						
46L		$65.87 \pm 1.34$ $95.15 \pm 3.35$	MS	Sesquiterpene lactone	Aerial parts of <i>C. ternifolia</i> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract (1:1)	Escandón-Rivera, et al., 2017
Calein A						

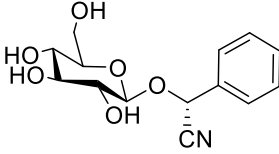
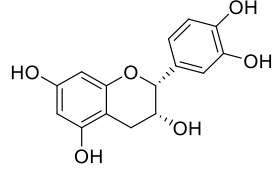
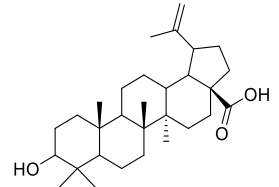
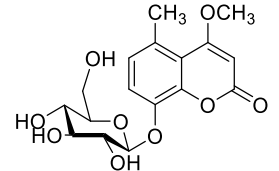
47L		$94.02 \pm 1.01$ $93.84 \pm 0.86$	MS	Lignane	Whole plant of <i>Leucophyllum</i> <i>ambiguum</i> Bonpl (Scrophulariaceae) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	Rojas, et al., 2003
48L		$89.36 \pm 1.58$ $92.72 \pm 1.96$	I	Stilbenoid	Synthetic analog of gigantol	Reyes-Ramírez, et al., 2011
49L		$90.32 \pm 1.21$ $91.06 \pm 1.34$	MS	Triterpenoid tirucallane	Stem bark of <i>A.</i> <i>adstringens</i> (Anacardaceae) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	Rivero-Cruz, et al., 2005
3α-Hydroxymasticadienonic acid						

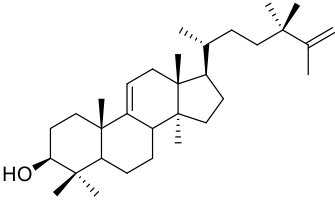
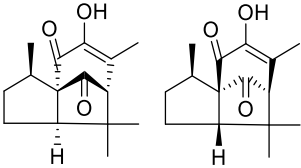
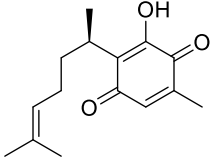
50L		$88.59 \pm 2.25$ $95.08 \pm 2.94$	MS	Flavonoid flavone	Stem bark of <i>H. latiflora</i> Methanol extract	Mata, et al., 1990
51L	<p data-bbox="449 472 651 495">7-Methylfluteolin</p> 	$95.67 \pm 2.71$ $124.76 \pm 0.4$	MS	Flavonoid flavonol	Leaves of <i>Hydrangea seemannii</i> L. Riley (Hydrangeaceae) Ethyl acetate fraction from the infusion	Pérez-Vásquez, et al., 2020
52L	<p data-bbox="506 756 598 779">Trifolin</p> 	$71.44 \pm 2.45$ $73.43 \pm 5.94$	MS	Limonoid	Seeds of <i>G. grandiflora</i> Hexane-CHCl <sub>3</sub> (1:1) extract	Jimenez, et al., 1998
53L	<p data-bbox="499 1089 604 1112">Gedunin</p> 	$86.62 \pm 3.45$ $96.61 \pm 1.4$	MS	Flavonoid flavanone	Aerial parts of <i>Chenopodium graveolens</i> Willd. (syn.: <i>Dysphania graveolens</i> Mosyakin)	Mata, et al., 1986

	Pinocembrin				& Clemants) (Amaranthaceae) CHCl <sub>3</sub> extract	
54L		$79.03 \pm 1.31$ $97.81 \pm 1.49$	MS	Flavonoid flavone	Aerial parts of <i>C. graveolens</i> CHCl <sub>3</sub> extract	Mata, et al., 1986
	5,7-Diacetylchrysin					
55L		$92.91 \pm 1.49$ $77.23 \pm 3.48$	MS	Triterpenoid friedelane	Stem bark and root of <i>H. excelsa</i> Hexane extract	Calzada, et al., 1991
	Canophyllal					
56L		$84.92 \pm 2.89$ $104.67 \pm 2.08$	MS	Triterpenoid friedelane	Stem bark and root of <i>H. excelsa</i> Hexane extract	Calzada, et al., 1991
	Friedelin					

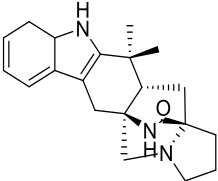
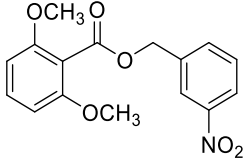
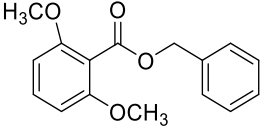


57L		$86.82 \pm 0.84$ $109.16 \pm 1.6$	I	Alkaloid	Synthetic analog of strictosamide isolated of <i>Simira mexicana</i> (Bullock) Steyerm. (Rubiaceae)	Albor Calderon, 1989
	Tetraacetyl strictosamide				Leaves of <i>Celaenodendron mexicanum</i> Standl. (Syn.: <i>Piranhea mexicana</i> (Standl.) Radcl.-Sm. (Picrodendraceae)	
58L		$95.61 \pm 1.32$ $105.54 \pm 3.06$	MS	Triterpenoid oleanane	(Syn.: <i>Piranhea mexicana</i> (Standl.) Radcl.-Sm. (Picrodendraceae)	del Rayo Camacho, et al., 2000
	3- <i>epi</i> -Oleanolic acid				CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	
59L		$93.78 \pm 0.7$ $94.81 \pm 1.1$	S	Phenolic glycoside	Branches and leaves of <i>V. corymbosa</i> Ethyl acetate fraction from the infusion	Flores-Bocanegra, et al., 2015
	Picein					

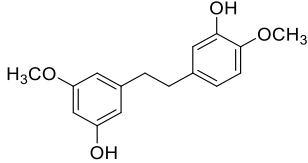
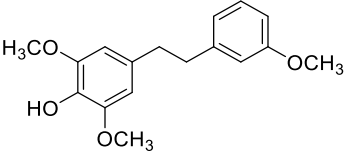
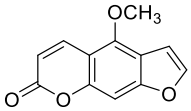
60L		$93.05 \pm 0.88$ $85.42 \pm 2.96$	S	Cyanogenic glycoside	Branches and leaves of <i>V. corymbosa</i> Ethyl acetate fraction from the infusion	Flores-Bocanegra, et al., 2015
61L		$68.74 \pm 1.73$ $89.39 \pm 2.54$	S	Flavonoid 2,3- <i>cis</i> -flavan-3-ol	Branches and leaves of <i>V. corymbosa</i> Ethyl acetate fraction from the infusion	Flores-Bocanegra, et al., 2015
62L		$95.19 \pm 1.06$ $93.31 \pm 3.31$	S	Triterpenoid lupane	Branches and leaves of <i>V. corymbosa</i> Ethyl acetate fraction from the infusion	Flores-Bocanegra, et al., 2015
63L		$96.52 \pm 0.15$ $99.24 \pm 0.65$	S	Coumarin	Roots of <i>Acourtia thurberi</i> (A. Gray) Reveal & R.M. King (Asteraceae) Hexane extract	Martínez, et al., 2017

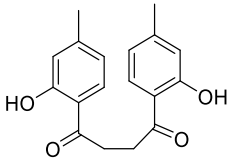
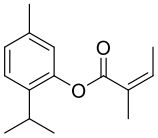
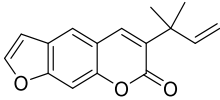
	8- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-4-methoxy-5-methyl-coumarin						
<b>64L</b>		$9.94 \pm 6.31$ $95 \pm 5.84$	MS	Triterpenoid lanostane	Whole plants of <i>Scaphyglottis livida</i> (Lindley) Schltr. (Orchidaceae)	Estrada, et al., 2002	
	5 $\alpha$ -lanosta-24,24-dimethyl-9(11),25-dien-3 $\beta$ -ol				CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract		
<b>65L</b>		$-3.62 \pm 0.6$ $62.11 \pm 16.44$	MS	Sesquiterpenoids	Roots of <i>A. thurberi</i>	Martínez, et al., 2017	
	$\alpha/\beta$ -Pipitzol				Hexane extract		
<b>66L</b>		$84.45 \pm 4.27$ $88.44 \pm 4.03$	I	Sesquiterpenoid	Roots of <i>A. thurberi</i>	Martínez, et al., 2017	
	Perezone				Hexane extract		

<b>67L</b>		$92.6 \pm 1.51$ $95.84 \pm 0.36$	S	4-Phenylcoumarin	Stem bark of <i>E. caribaeum</i>  MeOH extract	Mata, et al., 1987
<b>68L</b>		$-5.26 \pm 13.31$ $65.71 \pm 1.78$	MS	Flavonoid flavanone	Synthetic analog of Pinostrobin, isolated from <i>C. graveolens</i>	Mata, et al., 1986
<b>69L</b>		$87.88 \pm 10.41$ $122.02 \pm 8.79$	I	Alkaloid	Fungal strain <i>Malbranchea aurantiaca</i> Sigler & Carmichael (Myxotrichaceae)	Figueroa, et al., 2008
	Malbrancheamide B				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	

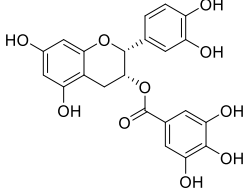
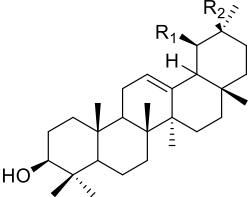
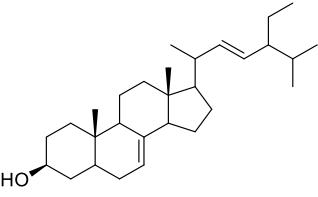
<b>70L</b>		$66.73 \pm 2.72$ $95.45 \pm 0.67$	S	Alkaloid	<i>M. aurantiaca</i>  CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> extract	Figueroa, et al., 2008
<b>71L</b>	Premalbrancheamide    3'-Nitrobenzyl 2,6-dimethoxybenzoate	$-16.77 \pm 4.63$ $91.9 \pm 0.39$	MS	Benzyl benzoate	Synthetic analog of benzyl benzoates from <i>Brickellia</i> <i>veronicifolia</i>	Rivero-Cruz, et al., 2007
<b>72L</b>	  Benzyl 2,6-dimethoxybenzoate	$3.24 \pm 0.79$ $92.49 \pm 0.88$	MS	Benzyl benzoate	Aerial parts of <i>Brickellia</i> <i>veronicifolia</i> (Kunth) A. Gray (Asteraceae)  CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	Rivero-Cruz, et al., 2007

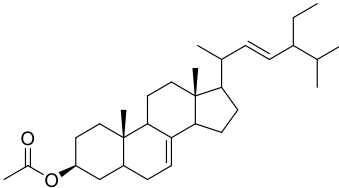
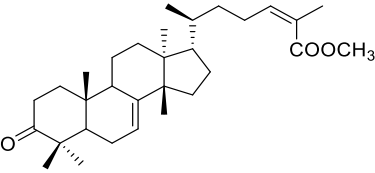
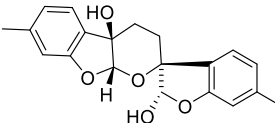
<b>73L</b>		$57.56 \pm 3.8$ $95 \pm 0.54$	S	4-Phenylcoumarin	Stem bark of <i>H. standleyana</i>  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH extract	Guerrero-Analco, et al., 2005
<b>74L</b>		$38.46 \pm 3.2$ $92.85 \pm 0.77$	I	Flavonoid flavonol	Leaves of <i>Hyptis albida</i> Kunth (Lamiaceae)	Rojas, et al., 1992
<b>75L</b>		$56.07 \pm 12.42$ $94.96 \pm 1.85$	MS	4-Phenylcoumarin	Semisynthetic derivative prepared by hydrolysis	Mata, et al., 1987

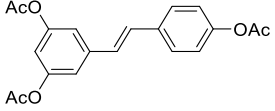
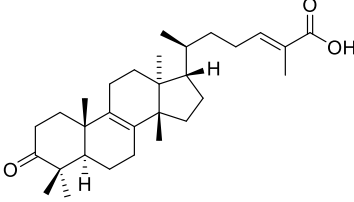
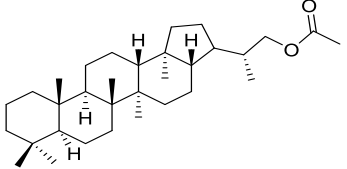
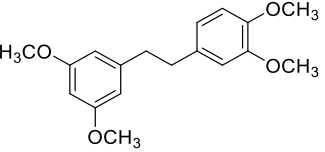
<b>76L</b>		$65.42 \pm 2.33$ $54.01 \pm 3.49$	S	Stilbenoid	Whole plants of <i>S. livida</i>  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) extract	Estrada, et al., 1999
<b>77L</b>	 <p data-bbox="499 467 604 495">Gigantol</p>	$93.48 \pm 0.35$ $100.21 \pm 0.78$	MS	Stilbenoid	Synthetic analog of gigantol	Reyes-Ramirez, et al., 2011 Hernández- Romero, et al., 2005
<b>78L</b>	 <p data-bbox="443 1105 667 1133">5-Methoxypsoralen</p>	$65.64 \pm 2.64$ $49.04 \pm 3.35$	MS	Furanocoumarin	Aerial parts of <i>Arracacia toluensis</i> <i>var. multifida</i> (S. Watson) Mathias & Constance (Apiaceae)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) extract	Figueroa, et al., 2007

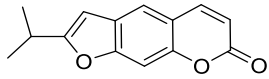
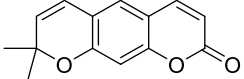
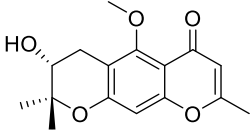
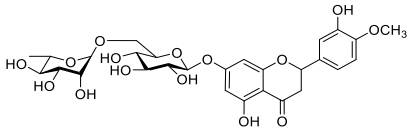
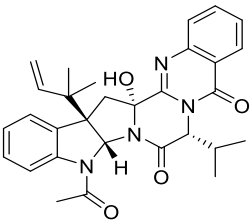
<b>79L</b>		$25.07 \pm 2.90$ $79.09 \pm 1.79$	MS Thymol derivative	Aerial parts of <i>Hofmeisteria schaffneri</i> (A. Gray) R. M. King & H. Rob. Pérez-Vásquez, et al., 2005 (Asteraceae)
	Hofmeisterin II			$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) extract
<b>80L</b>		$58.17 \pm 1.4$ $46.58 \pm 1.79$	S Thymol derivative	Aerial parts of <i>H. schaffneri</i> Pérez-Vásquez, et al., 2005 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) extract
	Thymol angelate			Roots of <i>Stauranthus perforatus</i> Liebm. (Rutaceae) Anaya, et al., 2005
<b>81L</b>		$58.75 \pm 4.31$ $34.88 \pm 2.87$	MS Furanocoumarin	$\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) extract
	Chalepensis			

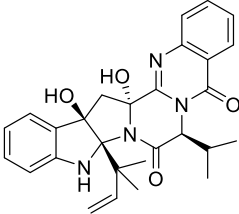
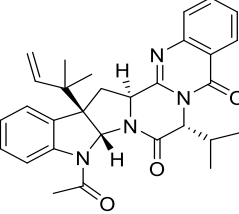
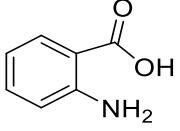


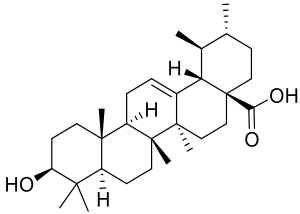
82L		$94.85 \pm 0.5$ $96.69 \pm 0.83$	S	Flavonoid 2,3- <i>cis</i> -flavan-3-ol	Roots of <i>R.</i> <i>hymenosepalus</i> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH extract	Rivero-Cruz, et al., 2005
(-)-Epicatechin 3- <i>O</i> -gallate		$64.07 \pm 3.99$ $98.47 \pm 1.39$	I	Triterpenoids Ursane/oleanane	Root bark of <i>H.</i> <i>excelsa</i> Methanol extract	Navarrete, et al., 2002
83L	$\alpha$ : R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = H $\beta$ : R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>					
$\alpha/\beta$ -Amyrin		$63.12 \pm 1.16$ $96.6 \pm 0.44$	MS	Sterol	Aerial parts of <i>C.</i> <i>filaginoides</i> CHCl <sub>3</sub> -MeOH extract	Mata, et al., 1997
84L	$\alpha$ -Spinasterol					

85L		$91.33 \pm 2.67$ $99.95 \pm 1.66$	MS	Sterol	Synthetic analog of $\alpha$ -Spinasterol isolated of <i>C. filaginoides</i> Mata, et al., 1997
86L	<p data-bbox="428 488 674 516"><math>\alpha</math>-Spinasterol acetate</p> 	$96.94 \pm 0.73$ $100.71 \pm 0.43$	S	Triterpenoid tirucallane	Stem bark of <i>A. adstringens</i> Rivero-Cruz, et al., 2005  Hexane extract
87L	<p data-bbox="365 781 737 854">Methyl ester of masticadienonic acid</p>  <p data-bbox="390 1073 705 1260">3',4',4a',9a'-tetrahydro-6,7'-dimethylspiro[benzofuran-3(2<i>H</i>),2'-pyrano[2,3-<i>b</i>]benzofuran]-2,4a'-diol</p>	$49.48 \pm 1.63$ $70.93 \pm 4.61$	S	Thymol derivative	Aerial parts of <i>H. schaffneri</i> Pérez-Vásquez, et al., 2005  CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract

<b>88L</b>	 <p>Acetyl analog of 5-[(<i>E</i>)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol</p>	<p>34.54 ± 2.42 45.12 ± 7.09</p>	I	Stilbenoid	<p>Synthetic analog of resveratrol 4'-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside isolated of <i>R. hymenosepalus</i></p>	<p>Rivero-Cruz, et al., 2005</p>
<b>89L</b>	 <p>Isomasticadienonic acid</p>	<p>96.19 ± 0.73 101.05 ± 0.48</p>	MS	<p>Triterpenoid lanostane</p>	<p>Stem bark of <i>A. adstringens</i> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH extract</p>	<p>Rivero-Cruz, et al., 2005</p>
<b>90L</b>	 <p>21α-<i>H</i>-Hopane acetate</p>	<p>89.16 ± 0.46 98.02 ± 1.36</p>	MS	<p>Triterpenoid lupane</p>	<p><i>P. tinctorum</i> CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) extract</p>	<p>Rojas et al., 2002</p>
<b>91L</b>	 <p>Synthetic analog of gigantol using Wittig reaction</p>	<p>58.72 ± 3.16 95.13 ± 2.43</p>	MS	Stilbene	<p>Synthetic analog of gigantol using Wittig reaction</p>	<p>Hernández-Romero, et al., 2005</p>

	3,3',4',5'-Tetramethoxybibenzyl					
<b>92L</b>		96.35 ± 0.96 90.78 ± 1.28	MS	Furanocoumarin	Roots of <i>S. perforatus</i> L CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	Anaya, et al., 2005
<b>93L</b>	2'-Isopropyl psoralene 	67.34 ± 2.72 96.99 ± 1.06	MS	Pyranocoumarin	Roots of <i>S. perforatus</i> CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1) extract	Anaya, et al., 2005
<b>94L</b>	Xanthyletin 	92.6 ± 1.36 96.54 ± 0.68	S	Pyranochromone	Synthetic analog of (-)-hamaudol	Valencia-Islas, et al., 2002
<b>95L</b>	(+)-5-Methoxyhamaudol 	88.62 ± 1.54 84.62 ± 0.47	S	Flavonoid flavanone	Aerial parts of <i>E. yaaxhokob</i> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) extract	Mata, et al., 1998
<b>96L</b>	Hesperidin 		S	Alkaloid Diketopiperazine	Fungal strain <i>Malbranchea albolutea</i> Sigler & J.W.Carmich. (Onygenaceae)	Díaz-Rojas, et al., 2021

			AcOEt extract		
	Albolutein A				
97L		S	Alkaloid Diketopiperazine	<i>M. albolutea</i> AcOEt extract	Díaz-Rojas, et al., 2021
	Albolutein B				
98L		S	Alkaloid Diketopiperazine	<i>M. albolutea</i> AcOEt extract	Díaz-Rojas, et al., 2021
	Albolutein C				
99L		S	<i>o</i> -Aminobenzoic acid	<i>M. albolutea</i> AcOEt extract	Díaz-Rojas, et al., 2021
	<i>o</i> -Anthranilic acid				

<b>UA</b>		77.94 ± 0.89	S	Triterpene ursane	Branches and leaves of <i>V. corymbosa</i> Ethyl acetate fraction from infusion	Flores-Bocanegra, et al., 2015
Ursolic acid						

## Referencias de la Tabla A2 en orden alfabético

- Achnine, L., Mata, R., Iglesias-Prieto, R., Lotina-Hennsen, B. (1998). Impairment of photosystem II donor side by the natural product odoratol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 5313–5317.
- Albor Calderón C. 1989. Estudio fitoquímico de tres rubiaceas usadas en medicina tradicional: *Randia echinocarpa*, *Exostema mexicanum* y *Simira mexicana*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico.
- Anaya, A. L., Macías-Rubalcava, M., Cruz-Ortega, R., García-Santana, C., Sánchez-Monterrubio, P. N., Hernández-Bautista, B. E., Mata, R. (2005). Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry*, 66, 487–494.
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., Mata, R. (2011). (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of natural products*, 74, 314–320.
- Calera, M. R., Soto, F., Sanchez, P., Bye, R., Hernandez-Bautista, B., Anaya, A. L., Lotina-Hennsen B., Mata, R. (1995). Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry*, 40, 419–425.
- Calzada, F., Mata, R., López, R., Linares, E., Bye, R., Barreto, V., del Rio, F. (1991). Friedelanes and Triterpenoid Quinone Methides from *Hippocratea excelsa* L. *Planta Medica*, 57, 194–195.
- Cristians, S., Guerrero-Analco, J. A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R. (2009). Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *Journal of Natural Products*, 72, 408–413.
- Déciga-Campos, M., Guerrero-Analco, J. A., Quijano, L., Mata, R. (2006). Antinociceptive activity of 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83, 342–348.
- Del Valle, P., Martínez, A. L., Figueroa, M., Raja, H. A., Mata, R. (2016). Alkaloids from the fungus *Penicillium spathulatum* as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Planta medica*, 82, 1286–1294.

- Del Rayo Camacho, M., Mata, R., Castaneda, P., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Croft, S. L., Phillipson, J. D. (2000). Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta medica*, 66, 463–468.
- Díaz-Rojas, M., Raja, H., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Mata, R. (2021). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry*, 184, 112664.
- Escandón-Rivera, S., Pérez-Vásquez, A., Navarrete, A., Hernández, M., Linares, E., Bye, R., Mata, R. (2017). Anti-hyperglycemic activity of major compounds from *Calea ternifolia*. *Molecules*, 22, 289.
- Estrada, S., Toscano, R. A., Mata, R. (1999). New Phenanthrene Derivatives from *Maxillaria densa*. *Journal of natural products*, 62, 1175–1178.
- Estrada S., Rojas A., Mathison Y., Israel A., Mata R. (1999). (+). Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyls from *Scaphyglottis livida*. *Planta Medica*, 65, 109–114.
- Estrada, S., Acevedo, L., Rodríguez, M., Toscano, R., Mata, R. (2002). New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* and *Nidema boothii*. *Natural Product Letters*, 16, 81–86.
- Flores-Bocanegra L, Pérez-Vásquez A, Torres-Piedra M, Bye R, Linares E, Mata R.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. *Molecules*. 2015; 20(8):15330-15342.
- Figueroa M., Rivero-Cruz I., Rivero-Cruz B., Bye R., Navarrete A., Mata R. (2007). Constituents, biological activities and quality control parameters of the crude extract and essential oil from *Arracacia toluensis* var. *multifida*, *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 125–131.
- Figueroa M., González M. del C., Rachel Mata (2008). Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, *Natural Product Research*, 22, 709–714.
- Figueroa, M., González, M. del C., Rodríguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M., Cerda-García-Rojas, C. M., Mata, R. (2009). Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2167–2174.
- Guerrero-Analco, J. A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. (2005). Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica*, 71, 1099–1105.



- Guerrero-Analco, J., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*, 68, 2087–2095.
- Hernández-Romero, Y., Rojas, J. I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R. (2004). Spasmolytic Effects, Mode of Action, and Structure– Activity Relationships of Stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of natural products*, 67, 160–167.
- Hernández-Romero, Y., Acevedo, L., de Los Ángeles Sánchez, M., Shier, W. T., Abbas, H. K., Mata, R. (2005). Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 6276–6280.
- Jimenez, A., Villarreal, C., Toscano, R. A., Cook, M., Arnason, J. T., Bye, R., Mata, R. (1998). Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 49, 12981–1988.
- Leyte-Lugo, M., González-Andrade, M., González, M. del C., Glenn, A. E., Cerda-García-Rojas, C. M., & Mata, R. (2012). (+)-Ascosalitoxin and Vermelhotin, a Calmodulin Inhibitor, from an Endophytic Fungus Isolated from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*, 75, 1571–1577.
- Leyte-Lugo M., Mario Figueroa, María del Carmen González, Anthony E. Glenn, Martín González-Andrade, Rachel Mata, ‘Corrigendum to “Metabolites from the endophytic fungus *Sporormiella minimoides* isolated from *Hintonia latiflora*” [Phytochemistry 96 (2013) 273–278]’, *Phytochemistry*, 98, 2014.
- Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Mata, R. (2000). Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Journal of natural products*, 63, 757–761.
- Martínez, A. L., Madariaga-Mazón, A., Rivero-Cruz, I., Bye, R., Mata, R. (2017). Antidiabetic and antihyperalgesic effects of a decoction and compounds from *Acourtia thurberi*. *Planta Medica*, 234, 534–544.
- Mata R., Navarrete A., Alvarez A., Pereda-Miranda R., Delgado G., Romo de Vivar A. (1986). Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*, *Phytochemistry*, 26, 191–193.
- Mata, R., Calzada, F., Garcia, M. R., Reguero, M. T. (1987). Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of natural products*, 50, 866–871.

- Mata, R., Castañeda, P., Camacho, M. D. R., Delgado, G. (1988). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, V. Cucurbitacin glucosides from *Cigarrilla mexicana*. *Journal of natural products*, 51, 836–839.
- Mata R., Camac Camacho M., Cervera E., Bye R., Linares E. (1990). Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*, *Phytochemistry*, 29, 2037–2040.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R., Bye, R., Linares, E. (1991a). A dammarane from *Stevia salicifolia*. *Phytochemistry*, 30, 3822–3823.
- Mata, R., Contreras, J. L., Crisanto, D., Pereda-Miranda, R., Castañeda, P., Del Rio, F. (1991b). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XVIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa*. *Journal of natural products*, 54, 913–917.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Bye R., Linares, E. (1997). Smooth Muscle Relaxing Flavonoids and Terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica*, 63, 31–35.
- Mata R., Macías M. L., Rojas I. S., Lotina-Hennsen B., Toscano R. A. Anaya A. L. (1998). Phytotoxic compounds from *Esenbeckia Yaxhoob*. *Phytochemistry* 49, 441–449.
- Mata, R., Rivero-Cruz, I., Rivero-Cruz, B., Bye, R., Timmermann, B. N. (2002). Sesquiterpene lactones and phenylpropanoids from *Cosmos pringlei*. *Journal of natural products*, 1030–1032.
- Morales-Sánchez, V., Rivero-Cruz, I., Laguna-Hernández, G., Salazar-Chávez, G., Mata, R. (2014). Chemical composition, potential toxicity, and quality control procedures of the crude drug of *Cyrtopodium macrobulbon*. *Journal of ethnopharmacology*, 154, 790–797.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L., Reyes-Trejo, L. (2002). Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 383–388.
- Pérez-Vásquez, A., Reyes, A., Linares, E., Bye, R., Mata, R. (2005). Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and Synthesis of 2'-(2''-Hydroxy-4''-methylphenyl)-2'-oxoethyl Acetate. *Journal of Natural Products*, 68, 959–962.
- Pérez-Vásquez, A., Aguilar-Cruz, R., Bye, R., Linares, E., Rivero-Cruz, I. (2020). UHPLC-MS Analysis of Polyphenols in the Aqueous Extract of *Hydrangea seemannii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 7–11.

- Rivero-Cruz, F., García-Aguirre, G., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. Conformational behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma herbarum* (2000) *Tetrahedron*, 56, 5337-5344.
- Reyes-Ramírez, A., Leyte-Lugo, M., Figueroa, M., Serrano-Alba, T., González-Andrade, M., Mata, R. (2011). Synthesis, biological evaluation, and docking studies of gigantol analogs as calmodulin inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 46, 2699–2708.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R., Bye., Franzblau S., Barbara N Timmermann, B. N. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of pharmacy and Pharmacology*, 57, 1117–1126.
- Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R. (2007). Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, 68, 1147–1155.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 35, 275–283.
- Rojas, S., Acevedo, L., Macías, M., Toscano, R. A., Bye, R., Timmermann, B., Mata, R. (2003). Calmodulin Inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*. *Journal of Natural Products*, 66, 221–224.
- Rodríguez Lizana, M. (1998). Triterpenoides de las especies *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae) y *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schitr. (Orchidaceae). Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico. <http://132.248.9.195/pdbis/263825/Index.html>.
- Valencia-Islas, N., Abbas, H., Bye, R., Toscano, R., Mata, R. (2002). Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *Journal of Natural Products* 65 (6), 828–83.
- Valencia-Islas, N. A., Paul, R. N., Shier, W. T., Mata, R., Abbas, H. K. (2002). Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna pausicostata*) frond and root tissues. *Phytochemistry*, 61, 141–148.
- Segura, R., Calderón, J., Toscano, R., Gutiérrez, A., Mata, R. (1994). Cedrelanolide I, a new limonoid from *Cedrela salvadorensis*. *Tetrahedron letters*, 35, 3427–3440.
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A. L., Hernandez-Bautista, B., Villena, R., Soriano-Garcia, M., Bye R., Linares, E. (1993). New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *Journal of Natural Products*, 56, 1567–1574.

Salinas-Arellano E., Pérez-Vásquez A., Rivero-Cruz I., Torres-Colin R., González-Andrade M., Rangel-Grimaldo M., Mata R. (2020). Flavonoids and Terpenoids with PTP-1B Inhibitory Properties from the Infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules*, 25 (15), 3530.

Tabla A3. Datos de pCI<sub>50</sub> de los compuestos más activos.

No	Nombre del PN	CI <sub>50</sub> (μM)	pCI <sub>50</sub> (M)	r <sup>2</sup> , χ <sup>2</sup>	Modelo	ΔA
1L	Canophyllol	33.2 ± 0.003	4.48	0.997, 3.1	DoseResp	0.2
2L	5- <i>O</i> -(β-D-Glucopyranosyl)-7-methoxy-3'-4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin	40.4 ± 0.02	4.39	0.999, 27	DoseResp	0.3
3L	3,4-Dimethoxy-2,5-phenanthrenediol	47.7 ± 0.1	4.32	0.975, 1	DoseResp	0.3
4L	Masticadienonic acid	49.1 ± 0.004	4.31	0.993, 4.5	DoseResp	0.4
5L	4',5,6-Trihydroxy-3',7-dimethoxyflavone	57.3 ± 0.02	4.24	0.991, 1.9	DoseResp	0.4
6L	<i>E/Z</i> -vermelhotin	79.6 ± 0.1	4.10	0.997, 1.3	DoseResp	0.6
7L	Tajixanthone hydrate	83.2 ± 0.001	4.08	0.999, 2.4	DoseResp	0.6
8L	Quercetin-3- <i>O</i> -(6''-benzoyl)-β-D-galactoside	88.8 ± 0.05	4.05	0.998, 4.3	DoseResp	0.6
9L	Lichexanthone	88.8 ± 0.005	4.05	0.997, 1.9	DoseResp	0.6
10L	Melianodiol	92.1 ± 0.04	4.04	0.992, 3.5	Hill1	0.6
11L	Confusarin	99.1 ± 0.001	4.00	0.999, 2.1	DoseResp	0.7
14L	3- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F	358.3 ± 0.012	3.45	0.998, 4.7	DoseResp	1.2
15L	Arvenin I	564.3 ± 0.041	3.25	0.999, 2.2	Hill1	1.4
18L	6''- <i>O</i> -Acetyl-5- <i>O</i> -β-D-galactopyranosyl-7,4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin	348.6 ± 0.03	3.46	0.999, 0.7	Hill1	1.2
25L	Phenol, 3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)ethyl]-]	662.1 ± 0.13	3.18	0.994, 12	DoseResp	1.5
32L	Isoalloalantolactone	443.2 ± 0.05	3.35	0.999, 65	DoseResp	1.3
34L	Batatasin III	247.4 ± 0.07	3.61	0.999, 3.8	DoseResp	1.1
40L	Benzomalvin A	424.2 ± 0.005	3.37	0.999, 41	DoseResp	1.3
41L	Gymnopusin	431.4 ± 0.01	3.37	0.994, 3.1	DoseResp	1.3
43L	Eicosyl 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamate	648.3 ± 0.13	3.19	0.995, 3.6	DoseResp	1.5
46L	Calein A	234.5 ± 0.02	3.63	0.997, 0.9	DoseResp	1.0
47L	2'-Methoxykobusin	125.3 ± 0.009	3.90	0.998, 1.2	Hill1	0.8
49L	3α-Hydroxymasticadienonic acid	150.7 ± 0.005	3.82	0.996, 6.4	DoseResp	0.8
50L	7-Methyluteolin	434.9 ± 0.008	3.36	0.998, 15	DoseResp	1.3
51L	Trifolin	859 ± 0.3	3.07	0.996, 90	DoseResp	1.6

53L	Pinocembrin	306.2 ± 0.02	3.51	0.999, 4.4	DoseResp	1.1
54L	5,7-Diacetylchrysin	361.8 ± 0.04	3.44	0.996, 9.6	Hill1	1.2
56L	Friedelin	887.8 ± 0.04	3.05	0.997, 4.8	DoseResp	1.6
58L	3- <i>epi</i> -Oleanolic acid	108.6 ± 0.01	3.96	0.965, 70	DoseResp	0.7
63L	8- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-4-methoxy-5-methyl-coumarin	165.7 ± 0.02	3.78	0.998, 2.7	DoseResp	0.9
64L	5 $\alpha$ -lanosta-24,24-dimethyl-9(11),25-dien-3 $\beta$ -ol	398.5 ± 0.03	3.40	0.998, 1,8	DoseResp	1.3
67L	6''-O-acetyl-5-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin	254.3 ± 0.2	3.59	0.998, 0.4	DoseResp	1.1
73L	5-O- $\beta$ -D-Apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-7-metoxi-3'-4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin	358.6 ± 0.07	3.45	0.997, 19.2	DoseResp	1.2
77L	4-Hydroxy-3,3',5-trimethoxybibenzyl	221 ± 0.1	3.66	0.998, 5.4	Hill1	1.0
82L	(-)-Epicatechin 3-O-gallate	142.4 ± 0.007	3.85	0.999, 2	Hill1	0.8
84L	$\alpha$ -Spinasterol	989.1 ± 0.14	3.00	0.985, 0.1	DoseResp	1.7
85L	$\alpha$ -Spinasterol acetate	277.2 ± 0.01	3.56	0.993, 0.1	DoseResp	1.1
86L	Methyl ester of masticadienonic acid	324.5 ± 0.001	3.49	0.997, 60	DoseResp	1.2
89L	Isomasticadienonic acid	419 ± 0.01	3.38	0.994, 1	DoseResp	1.3
90L	21- $\alpha$ -H-Hopane acetate	883.9 ± 0.2	3.05	0.987, 1	Hill1	1.6
91L	3,3',4',5-Tetramethoxybibenzyl	419.5 ± 0.006	3.38	0.996, 1	DoseResp	1.3
93L	Xanthyletin	864.6 ± 0.15	3.06	0.988, 1	Hill1	1.6
94L	(+)-5-Methoxyhamaudol	298.5 ± 0.15	3.53	0.97, 1	Hill1	1.1
96L	Albolutein A	19.1 ± 1.4	4.72		Hill1	-0.1
97L	Albolutein B	25.8 ± 25.8	4.59		Hill1	0.1
98L	Albolutein C	129.5 ± 2.6	3.89		Hill1	0.8
99L	<i>o</i> -Anthranilic acid	12.5 ± 0.003	4.90		Hill1	-0.2
UA	Ursolic acid	21.8 ± 0.004	4.66	0.996, 1	DoseResp	0.0

Tabla A4. Parámetros teóricos de unión entre la PTP1B y los compuestos **2L**, **4L**, **7L–11L**.

	$\Delta G_T$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$K_{IT}$ (mM)
<b>PTP1B-2L</b>	-7.02	6.84
<b>PTP1B-4L</b>	-6.51	16.24
<b>PTP1B-7L</b>	-6.87	8.82
<b>PTP1B-8L</b>	-7.19	5.13
<b>PTP1B-9L</b>	-5.73	60.89
<b>PTP1B-10L</b>	-6.88	8.68
<b>PTP1B-11L</b>	-5.2	149.45
<b>PTP1B-AU</b>	-6.73	11.19

Tabla A5. Interacciones entre la PTP1B y los compuestos **2L**, **4L**, **7L–11L**.

<b>Complejo</b>	<b>Residuos de interacción</b>
<b>PTP1B-2L</b>	Arg79, Phe196, Aeg199, Glu200, Ser201, Gly202, Leu204, Ser205, Pro206, Leu233, Asp236, Phe280, Gln288
<b>PTP1B-4L</b>	Phe7, Glu8, Val184, Pro185, Glu186, Pro188, Asp265, Arg268, Phe269, Leu272, Ile275
<b>PTP1B-7L</b>	Met1, Ile275, Glu276, Ala278, Lys279, Met282, Gly283, Asp284, Ser286, Val287, Gln290
<b>PTP1B-8L</b>	Ala77, Gln78, Arg79, Phe196, Arg199, Glu200, Leu204, Ser205, Pro206, Leu233, Asp236, Lys237, Phe280, Gln288
<b>PTP1B-9L</b>	Lys279, Met282, Gly283, Asp284, Ser286, Val287, Gln290
<b>PTP1B-10L</b>	Met1, Glu4, Phe7, Glu8, Ile275, Glu276, Ala278, Lys279, Met282, Gly286, Asp284, Val287
<b>PTP1B-11L</b>	Arg79, Phe196, Arg199, Glu200, Leu233, Asp236, Phe280, Gln288
<b>PTP1B-UA</b>	Lys279, Met282, Gly283, Asp284, Ser286, Val287, Gln290

Tabla A6. Predicción de propiedades fitoquímicas para los compuestos **1L–11L**.

Predicciones usando DataWarrior, SwissADME y ADMETlab 2.0.

No.	MW ≤ 500g/mol	FCsp <sup>3</sup> >0.25	#RB < 10	#HBA < 10	#HBD < 5	TPSA < 140Å	Log P < 5	2- < LogD < 5	Score de Biodisponibilidad (0.85)
1L	442.72	0.97	1	2	1	37.3	6.57	4.39	0.55
2L	462.4	0.32	5	11	6	179.28	0.31	0.261	0.17
3L	270.28	0.12	2	4	2	58.92	2.92	3.285	0.55
4L	454.68	0.8	5	3	1	54.37	6.38	5.077	0.85
5L	330.29	0.12	3	7	3	109.36	2.15	2.206	0.55
6L	217.22	0.17	1	3	1	55.4	1.2	0.728	0.85
7L	440.49	0.4	4	7	4	120.36	3.07	2.787	0.55
8L	568.48	0.21	7	13	7	216.58	1.16	1.56	0.17
9L	286.28	0.19	2	5	1	68.9	2.81	3.003	0.55
10L	488.7	0.9	3	5	3	86.99	4.34	4.014	0.55
11L	300.31	0.18	3	5	2	68.15	2.93	3.172	0.55
UA*	456.7	0.9	1	3	2	57.53	5.93	5.267	0.85
T*	685.06	1	20	9	6	154.32	4.49	3.632	0.17
E*	559.51	0.19	6	3	1	74.77	7.69	5.065	0.85
M*	129.16	0.5	2	2	3	91.49	-0.89	-2.054	0.55

\*Controles positivos, AU (ácido ursólico), T (trodosquemina), E (ertiprotafib) y M (metformina).



Table A7. Predicciones relacionadas con Química medicinal para los compuestos **1L–11L**.

Calculadas empleando DataWarrior, SwissADME y ADMETlab 2.0. Los datos muestran el número de infracciones en cada regla de Química medicinal evaluada; en el caso de los toxicóforos, PAINS y Brenk se muestran el número de fragmento problemáticos.

No	Toxicóforos	PAINS	Brenk	Lipinski	Triángulo dorado	Alertas (QM)
1L	0	0	0	1	0	1
2L	3	1	2	2	0	8
3L	2	0	1	0	0	3
4L	1	0	2	1	1	5
5L	2	1	1	0	0	4
6LL	0	0	2	0	0	2
7	2	0	2	0	0	4
8L	2	1	1	3	1	8
9L	2	0	1	0	0	3
10L	0	0	1	0	0	1
11L	2	0	1	0	0	3
UA*	0	0	1	1	1	3
T*	0	0	1	2	1	4
E*	1	0	0	2	1	4
M*	1	0	2	0	1	4

\*Controles positivos, AU (ácido ursólico), T (troscuquemina), E (ertiprotafib) y M (metformina).

Tabla A8. Predicción de propiedades farmacocinéticas relacionadas con la absorción y distribución de compuestos **1L–11L**, empleando SwissADME y ADMETlab 2.0.

No.	GI absorción	ABSORCIÓN (A)			DISTRIBUCIÓN (D)			Alertas (AD)
		BBB permeabilidad	P-gp sustato	Caco-2 $\geq$ -5.15	PPB $\leq$ 90	VD (0.04-20 L/g)	Fu $\geq$ 20 %	
1L	Low	No	No	-5.205	96.32%	1.345	2.05%	2
2L	Low	No	No	-6.203	86.71%	0.733	12.70%	4
3L	High	Yes	No	-4.908	96.09%	0.516	5.82%	2
4L	Low	No	No	-5.073	96.77%	0.716	2.24%	3
5L	High	No	No	-4.985	92.51%	0.689	14.23%	1
6L	High	No	No	-4.622	69.95%	0.642	36.30%	1
7L	High	No	Yes	-4.977	90.43%	0.922	7.00%	2
8L	Low	No	No	-6.295	98.05%	0.639	5.63%	2
9L	High	Yes	No	-4.883	89.01%	0.946	10.38%	3
10L	High	No	Yes	-4.759	93.24%	1.434	6.36%	2
11L	High	Yes	No	-4.959	88.67%	0.484	13.76%	3
UA*	Low	No	No	-5.396	97.44%	0.672	2.43%	3
T*	Low	No	No	-6.031	59.36%	0.505	36.76%	3
E*	Low	No	Yes	-4.972	102.46%	0.383	0.37%	3
M*	High	No	No	-6.259	5.83%	1.16	74.15%	2

\*Controles positivos, AU (ácido ursólico), T (trodosquemina), E (ertiprotafib) y M (metformina).

Tabla A9. Propiedades farmacocinéticas relacionadas con el metabolismo y la excreción de compuestos **1L–11L**, usando SwissADME y ADMETlab 2.0.

No.	METABOLISMO (M)					EXCRECIÓN (E)		
	Inhibición					CL <sub>≥15</sub>	T <sub>1/2</sub>	Alertas
	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	mL/min/kg	largo ↓	(ME)
1L	No	No	No	No	No	19.382	0.06	0
2L	No	No	No	No	No	9.802	0.78	2
3L	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	10.186	0.57	7
4L	No	No	Yes	No	No	5.916	2.00	2
5L	Yes	No	Yes	Yes	Yes	5.568	0.88	6
6L	Yes	No	No	No	No	1.814	0.55	3
7L	No	No	No	No	Yes	3.828	0.13	2
8L	No	No	No	No	No	5.702	0.90	2
9L	Yes	No	Yes	Yes	Yes	3.78	0.36	6
10L	No	No	No	No	No	10.243	0.15	1
11L	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	9.842	0.74	7
UA*	No	No	No	No	No	3.538	0.07	1
T*	No	No	No	No	Yes	4.342	0.04	2
E*	No	No	No	Yes	Yes	2.11	0.03	3
M*	No	No	No	No	No	3.504	0.47	2

\*Controles positivos, AU (ácido ursólico), T (trofusquemina), E (ertiprotafib) y M (metformina).

Tabla A10. Propiedades toxicológicas de los compuestos 1L–11L empleando DataWarrior.

<b>TOXICIDAS (T)</b>					
<b>No.</b>	<b>Mutagénico</b>	<b>Tumorogénicos</b>	<b>Teratogénico</b>	<b>Irritante</b>	<b>Alertas (T)</b>
1L	none	none	none	none	0
2L	none	none	high	none	1
3L	low	low	none	none	2
4L	none	none	none	none	0
5L	high	none	none	none	1
6L	none	none	none	none	0
7L	high	none	low	none	2
8L	none	none	none	high	1
9L	high	none	high	none	2
10L	none	none	none	none	0
11L	low	low	none	none	2
UA*	none	none	none	none	0
T*	none	none	none	none	0
E*	none	high	none	none	1
M*	none	none	low	none	1

\*Controles positivos, AU (ácido ursólico), T (troscuquemina), E (ertiprotafib) y M (metformina).

Tabla A11. Perfil de toxicidad estimado para moléculas seleccionadas (1L–11L).

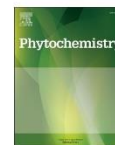
Softwares empleados: DataWarrior v.5.5.0 y ICM v. 3.9 (Molsoft). Los valores de DL<sub>50</sub> se estimaron usando el software T.E.S.T. v. 5.1 (EPA USA).

ID	TOX Score	TOX CLASS	MOL CACO2	MOLL D50	MOL PAINS	MOLPGP inhibitor	Mutagenic	Tumorigenic	Reproductive Effective	Irritant	DL50 (TEST)	Tox_Names
1	0.00	0.53	-4.74	2.19	0.07	0.99	none	none	none	none	2873.99	
2	1.17	0.33	-5.90	2.34	0.71	0.28	none	none	high	none	906.12	coumarin; quinone-like
3	2.12	0.82	-4.87	2.26	0.67	0.09	low	low	none	none	1074.47	Phenanthrene and phenanthrene containing compounds; Phenanthrenes; polycyclic; resorcinol; α-Naphthols
4	1.79	0.53	-4.97	2.06	0.06	0.90	none	none	none	none	567.13	Carboxylic acids; Michael acceptor
5	1.17	0.41	-5.26	1.82	0.52	0.56	high	none	none	none	247.80	quinone-like; resorcinol
6	0.29	0.42	-4.85	1.59	0.15	0.01	none	none	none	none	1611.74	thione
7	0.00	0.37	-5.47	1.44	0.35	0.01	high	none	low	none	381.27	
8	1.21	0.44	-5.90	1.49	0.91	0.14	none	none	none	none	886.13	quinone- like;resorcinol
9	0.32	0.49	-4.76	1.89	0.24	0.26	high	none	high	none	45.31	resorcinol
10	0.00	0.53	-5.06	2.03	0.10	0.14	none	none	none	none	171.41	
11	1.30	0.87	-4.97	1.46	0.53	0.13	low	low	none	none	881.76	Phenanthrene and phenanthrene containing compounds; Phenanthrenes; polycyclic

Tabla A12. Resumen de alertas ADMET para los compuestos más activos (1L–11L).

<b>ALERTAS</b>				
<b>No</b>	<b>QM</b>	<b>AD</b>	<b>MET</b>	<b>TOTAL</b>
1L	1	2	0	3
2L	8	4	3	15
3L	3	2	9	14
4L	5	3	2	10
5L	4	1	7	12
6L	2	1	3	6
7L	4	2	4	10
8L	8	2	3	13
9L	3	3	8	14
10L	1	2	1	4
11L	3	3	9	15
UA*	3	3	1	7
T*	4	3	2	9
E*	4	3	4	11
M*	4	2	3	9

\*Controles positivos, AU (ácido ursólico), T (trodosquemina), E (ertiprotafib) y M (metformina).



## Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*<sup>☆</sup>

Miriam Díaz-Rojas<sup>a</sup>, Huzefa Raja<sup>b</sup>, Martin González-Andrade<sup>c</sup>, José Rivera-Chávez<sup>d</sup>, Manuel Rangel-Grimaldo<sup>a</sup>, Isabel Rivero-Cruz<sup>a</sup>, Rachel Mata<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, 27412, NC, USA

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Malbranchea albolutea*  
Onygenaceae  
Diabetes  
Ardecmins  
Protein tyrosine phosphatase 1B  
Alboluteins A-C

### ABSTRACT

From solid rice-based cultures of *Malbranchea albolutea*, three undescribed ardecmins and sartoryglabrin analogs were discovered and named alboluteins A-C. 1H-Indole-3-carbaldehyde, and anthranilic acid were also isolated. 1D and 2D-NMR techniques, as well as DFT-calculated chemical shifts, allowed characterizing alboluteins A-C. Testing these compounds against PTP1B indicated their inhibitory activity with IC<sub>50</sub>'s ranging from 19 to 129 μM (ursolic acid IC<sub>50</sub> = 29.8 μM, positive control). Kinetic analysis revealed that albolutein C behaved as a non-competitive inhibitor. Docking studies of alboluteins A-C into the crystal structure of PTP1B (PDB ID: 1T49) predicted that all compounds prefer to bind at the allosteric site of the enzyme, with K<sub>i</sub> values of 2.02 × 10<sup>-4</sup>, 1.31 × 10<sup>-4</sup>, and 2.67 × 10<sup>-4</sup> mM, respectively. Molecular dynamic studies indicated that the active compounds remained tied to the enzyme with good binding energy.

### 1. Introduction

*Malbranchea albolutea* Sigler & J.W. Carmich. [Onygenaceae; syn. *Auxarthron alboluteum* Sigler & Hambleton] (Fig. S1) is a keratinophilic fungus isolated from soil worldwide (Sigler and Carmichael, 1976). Based on our preliminary sequencing analysis and the literature, it appears that the asexual genus *Malbranchea* is polyphyletic showing phylogenetic affiliations to both Onygenaceae (Eurotiomycetes) (Sigler et al., 2002; Sarroco et al., 2015) as well as Myxotrichaceae (Leotiomycetes, incertae sedis) (Rebollar-Ramos et al., 2018). In this study, we use the name *Malbranchea* instead of *Auxarthron* due to historical priority (see section 4.2); *Malbranchea* Saccardo 1882 would have a priority over its teleomorphic name, *Auxarthron* G.F. Orr and Kuehn 1963 based in One Fungus = One Name (1F1N) (Hawksworth et al., 2011; Taylor, 2011), in accordance with the recent changes concerning pleomorphic fungi in the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. Although there are no chemical or pharmacological investigations on *M. albolutea*, other genus species biosynthesize different classes of bioactive compounds. Hence, *M. aurantiaca* Sigler & J.W.

Carmich. and *M. graminicola* Sigler & J. Lacey produce malbrancheamides and related indole terpenoid alkaloids with vasorelaxant and calmodulin inhibitor properties (Martínez-Luis et al., 2006; Ding et al., 2008; Figueroa et al., 2008, 2011; Watts et al., 2011; Madariaga-Mazón et al., 2015; Fraley et al., 2017; Beyett et al., 2019). *M. aurantiaca* produces phytotoxic eremophilanes (Martínez-Luis et al., 2005). From *M. flavorosea* Sigler & J.W. Carmich. a few polyketides and dipeptides with α-glucosidase inhibitory activity has been isolated (Verastegui-Omaña et al., 2017; Rebollar-Ramos et al., 2018). *M. cinnamomea* (Lib.) Oorschot & de Hoog produces benzoquinones and hydroquinones with antimicrobial, cytotoxic, or antiviral properties (Schlegel et al., 2003; Graefe et al., 2004). *M. filamentosa* Sigler & J.W. Carmich. contains smooth muscle relaxant glycosylated triterpenoids (Wakana et al., 2008), cytotoxic anthrasteroids (Wakana et al., 2014), antifungal sesquiterpenoids (Wakana et al., 2009), amauromine (Wakana et al., 2008), and vasodilating aromatic compounds (Clark et al., 2005; Hosoe et al., 2005; Wakana et al., 2008). *M. sulfurea* (Miehe) Sigler & J. W. Carmich. a few cytotoxic pyrrole alkaloids were obtained (Yang et al., 2009). Rangel-Grimaldo et al. (2020) reported the presence of

<sup>☆</sup> Taken in part for the PhD thesis of Miriam Díaz-Rojas.

\* Corresponding author.

E-mail address: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx) (R. Mata).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112664>

Received 5 November 2020; Received in revised form 4 January 2021; Accepted 6 January 2021

Available online 29 January 2021

0031-9422/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.





formulae were deduced as  $C_{30}H_{32}N_4O_4$  and  $C_{30}H_{32}N_4O_3$ , respectively based on their protonated molecular ion peaks in HRESIMS. The IR spectrum in both cases indicated the presence of amide carbonyl ( $\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ ), and imine ( $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$ ) functional groups. In **1**, extra signals for the hydroxyl ( $3330$  and  $1270\text{ cm}^{-1}$ ) group were observed. The NMR data (Tables 1 and 2, and Figs. S2–S13) of both compounds showed a close relationship to those of sartoryglabrin B (Kijjoo et al., 2011) and 5-*N*-acetyl-8 $\beta$ -isopropyl-ardeemin (Mendes et al., 2016) which contain a hexahydropirrololo[2,3-*b*]indole fused to a quinazolinone scaffold substituted at the benzylic ring junction with a reverse-prenyl group. The only difference between **1** and sartoryglabrin B is the nature of the substituent at C-8. In **1** this substituent is an isopropyl moiety [ $\delta_{\text{H}}$  2.48 (dq  $J = 9.8, 6.7\text{ Hz}$ , H-17), 0.80 (d,  $J = 6.7\text{ Hz}$ , H-17a), 1.04 (d,  $J = 6.7\text{ Hz}$ , H-17b)/ $\delta_{\text{C}}$  33.8 (C-17), 19.8 (C-17a) and 20.3 (C-17b)], while in sartoryglabrin B it is an isobutyl unit (Kijjoo et al., 2011). On the other hand, compounds **1** and **3** differ only in the presence of a hydroxyl group at C-15b [ $\delta_{\text{H}}$  4.58 (dd,  $J = 5.9, 10.6\text{ Hz}$ )/ $\delta_{\text{C}}$  59.7 (C-15b)] in **1**, which is consistent with the paramagnetic shift of C-16a in **1** ( $\Delta\delta_{\text{C}16a} \mathbf{1} - \delta_{\text{C}16a} \mathbf{3} = 30.6$ ) respect to **3** (Tables 1 and 2). HMBC (Tables 1 and 2, Figs. S6 and S12) and HSQC (Figs. S5 and S11) analyses supported all the assignments and confirmed the placement of one

**Table 1**  
NMR data for albolutein A (**1**) in acetone- $d_6$ ,  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (125 MHz).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC	NOESY
1	124.6	7.50 (dd, 7.6, 1.1)	3, 4a	2,3
2	126.1	7.15 (ddd, 8.1, 7.6, 1.4)	3, 4a	1,4
3	128.8	7.28 (ddd, 8.1, 7.6, 1.1)	2, 4a, 16a	1
4	119.7	7.96 (dd, 8, 1.4)		2
4a	144.1			
5				
5a	81.6	6.22 (s)	4a, 15b, 16b	19, 21, 22, 24
7	167.9			
8	63.4	5.01 (d, 9.8)	7, 10, 15a, 17, 17b	17a, 17b
10	161.6			
10a	121.5			
11	127.7	8.20 (dd, 7.9, 1.5)	10, 10a, 13	12
12	128.1	7.57 (ddd, 8.1, 7.9, 1.2)	14a	11, 13
13	135.5	7.86 (ddd, 8.1, 8.0, 1.5)	10a, 11	12, 14
14	128.4	7.71 (dd, 8.0, 1.2)	14a	13
14a	148.2			
15a	153.8			
15b	90.3		5a, 16a, 16 $\beta$	17a
16	45.6	$\alpha$ : 3.15 (d, 14.0) $\beta$ : 3.29 (d, 14.0)	15a, 15b, 16a, 16b, 18	15b 21,22
16a	60.1			
16b	135.9			
17	33.8	2.48 (dq, 13.5, 9.8, 6.7)	8, 17a, 17b	8, 17, 17a
17a	19.8	0.80 (d, 6.7)	8, 17, 17b	8,15b
17b	20.3	1.04 (d, 6.7)	8, 17, 17a	8,17a
18	41.6			
19	144.9	5.91 (dd, 17.4, 10.8)	21, 22	3, 5a, 16, 18, 20 $\alpha$ , 21
20	114.5	$\alpha$ : 5.05 (dd, 10.8, 1.1) $\beta$ : 5.13 (dd, 17.4, 1.1)	18	19
21	23.7	1.00 (s)	18, 19, 22	3, 5a, 16, 19, 20 $\alpha$ , 21
22	22.9	1.16 (s)	18, 19, 22	3, 5a, 16, 19, 20 $\beta$ , 22
23	170.5			
24	24.1	2.65 (s)	23	5a
15b-OH		2.84 (s)		16 $\alpha$ , 17a

Assignments based on the analysis of the HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) and HMBC experiments;  $J$  values (Hz) in parentheses.

**Table 2**  
NMR data for albolutein C (**3**) in acetone- $d_6$ ,  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (125 MHz).

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC	NOESY
1	125.8	7.59 (dd, 7.7, 1.3)	3, 4a, 16a	2, 16 $\beta$
2	125.1	7.22 (ddd, 7.7, 7.8, 1.1)	2, 4	3
3	129.6	7.35 (ddd, 8.0, 7.8, 1.3)	2, 4, 4a	2
4	119.6	7.98 (dd, 8.0, 1.1)	2,3	3
4a	144.3			
5				
5a	80.2	6.13 (s)	4a, 19	15b, 19, 20 $\alpha$ , 21, 22, 24
7	165.3		8	
8	63.1	5.04 (d, 8.4)	7, 10, 15a, 17, 17a	17, 17a, 17b
10	161.0			
10a	121.4			
11	127.5	8.19 (dd, 8.1, 1.6)	10, 10a, 13	12
12	127.8	7.54 (ddd, 8.1, 7.1, 1.2)	11, 13, 14a	11
13	135.4	7.84 (ddd, 8.5, 7.1, 1.6)	10a, 12	12, 14
14	128.1	7.67 (dd, 8.5, 1.2)	12, 13, 14	13
14a	148.3			
15a	152.8			
15b	59.7	4.58 (dd, 10.6, 5.9)	15a, 15b, 16	16, 17, 17a, 17b
16	37.5	$\alpha$ : 3.04 (d, 5.9) $\beta$ : 2.85 (d, 10.6)	15a, 15 $\beta$ , 16 $\beta$ , 18 16a, 16b, 5a	17, 22, 24 16, 17, 21, 22
16a	61.8			
16b	133.9			
17	32.1	2.05 (m)	17a, 17b	17a, 17b, 22, 23
17a	18.8	0.87 (t)	8, 17	8, 15b, 16, 17
17b	20.2	0.87 (t)	8, 17, 17b	8, 15b, 16, 17
18	41.1			
19	144.7	5.95 (dd, 17.4, 10.8)	16a, 18, 22	16a, 20 $\alpha$ , 20 $\beta$
20	114.3	$\alpha$ : 5.07 (dd, 10.8, 1.2) $\beta$ : 5.16 (dd, 17.4, 1.1)	15a, 18 18, 19	20 $\beta$ 20a, 21, 22
21	23.9	1.22 (s)	16a, 18, 19, 22	1
22	22.9	1.05 (s)	16a, 18, 19, 21	1
23	169.9			
24	23.7	2.64 (s)	5a, 23	17, 21, 22

Assignments based on the analysis of the HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) and HMBC experiments;  $J$  values (Hz) in parentheses.

hydroxyl group at C-15b in compound **1**. The NOESY (Tables 1 and 2, Figs. S7 and S13) correlations supported the relative stereochemistry for both **1** and **3** whose spectra showed similar interactions. Thus, in the case of **1**, the NOESY correlations  $\delta_{\text{H}}$  6.22 (H-5a)/ $\delta_{\text{H}}$  1.10 (H-21), 1.16 (H-22), 5.01 (H-19), 5.04 (H-8), and 5.13 (H-20 $\beta$ ) placed the reverse prenyl moiety and H-5a in the same side of the molecule. On the other hand, the correlations  $\delta_{\text{H}}$  2.84 (OH-15b)/ $\delta_{\text{H}}$  1.04 (H-17b) placed the hydroxyl group on the same side as the isopropyl unit. Compound **3** showed almost identical NOESY interactions as compound **1** plus strong interactions of the signal at  $\delta_{\text{H}}$  4.58 (H-15b) with those at  $\delta_{\text{H}}$  2.05 (H-17) and  $\delta_{\text{H}}$  0.87 (H-17a and H-17b), which placed the isopropyl and H-15b on the same side of the molecule. The absolute configuration at the chiral centers in **1** and **3** was established by comparing the experimental and theoretical electronic circular dichroism (ECD) spectra calculated at B3LYP/6-31G+(d) level of theory for the most probable diastereoisomers. Compound **1** exhibited two positive Cotton effects at  $\lambda_{\text{max}}$  213 and 251 nm, and a negative one at  $\lambda_{\text{max}}$  226 nm, which correlates well with the calculated 5a*S*,8*R*,15*bR*,16*aR* isomer (Fig. 2a). The ECD calculated for the corresponding enantiomer 5a*R*,8*S*,15*bS*,16*aS* showed opposite cotton effects (Fig. 2a). Following the same strategy, albolutein C (**3**) was characterized as the 5a*R*,8*R*,15*bS*,16*aR* isomer (Fig. 2b). The cotton effects of compounds **1** and **3** were identical.

Mendes et al. (2016) reported a compound named

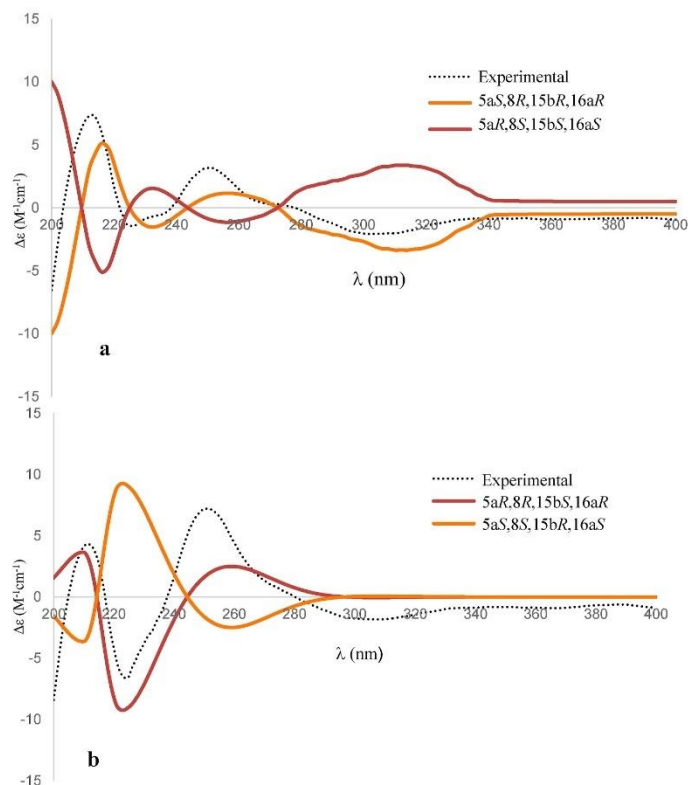


Fig. 2. Comparison of the experimental ECD spectrum of **1** (black dotted) with calculated for the enantiomers **5aS,8R,15bR,16aR** (orange) and **5aR,8S,15bS,16aS** (red) [a]. Comparison of the experimental ECD spectrum of **3** (black dotted) with calculated for the enantiomers **5aR,8R,15bS,16aR** (red) and **5aS,8S,15bR,16aS** (orange) [b]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

5-*N*-acetyl-8 $\beta$ -isopropyl-ardeemin whose NMR data is very similar to that of compound **3**; the name proposed by these authors implied the  $\beta$  orientation of the isopropyl but the structure depicted in their manuscript, and the NOESY correlations between H-15a and H-17 meant an  $\alpha$  disposition. On the other hand, Mendes et al. (2016) did not establish the absolute configuration at their compound's stereogenic centers. Finally, it is important to point out that the name 5-*N*-acetyl-8 $\beta$ -isopropyl-ardeemin must be revised since it was proposed after *N*-acetylardeemin, which possesses a  $\beta$  methyl group at C-8 (Mendes et al., 2016).

Compound **2** was isolated as a glassy white solid, and its molecular formula deduced as  $C_{28}H_{30}N_4O_4$ , based on the protonated molecular ion at  $m/z$  487.2321 in the HRESIMS spectrum. The IR spectrum of **2** showed absorption at 3335 and  $1633\text{ cm}^{-1}$  consistent with the presence of hydroxyl and imine groups in the molecule. 1D and 2D NMR data (Table 3, Figs. S14–S20) for this compound showed similar characteristics to those of **1** and **3**, revealing the same tripeptide scaffold and the presence of a reverse prenyl unit. However, there were significant differences. First, the NMR spectra lack signals for an *N*-acetyl residue; second, the spectra contained signals consistent with two tertiary carbinol groups at  $\delta_C$  90.5 (C-15b) and 90.8 (C-16a) in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, and at  $\delta_H$  2.77 (OH-15b) and 7.17 (OH-16a) in the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum. Finally, the HMBC and NOESY correlations in the

hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole portion (Table 2) were different. In the case of the HMBC experiment, the cross-peaks  $\delta_H$  7.30 (H-1)/ $\delta_C$  90.8 (C-16a), and  $\delta_H$  4.73 (NH-5)/ $\delta_C$  131.6 (C-16b) placed one of the hydroxyl group at C-16a; the correlations  $\delta_H$  4.00 and 2.51 (H-16 $\alpha$  and H-16 $\beta$ )/ $\delta_C$  111.0 (C-5a), and  $\delta_H$  1.25 (H-21 and H-22)/ $\delta_C$  111.0 (C-5a) and  $\delta_H$  6.03 (H-19)/111.0 (C-5a) situated the reverse prenyl group at C-5a; the correlations  $\delta_H$  4.00 and 2.51 (H-16 $\alpha$  and H-16 $\beta$ )/ $\delta_C$  90.5 (C-15b) located the second hydroxyl group at C-15b; finally, the correlations  $\delta_H$  5.30 (H-8)/ $\delta_C$  33.4 (C-17) confirmed the presence of the isopropyl at C-8 as compound **1**. The relative configuration of **2** was determined as depicted in Fig. 1 based upon the NOESY correlations described in Table 3. In particular, the cross-peaks between the signal at  $\delta_H$  7.17 (OH-16a) with those at  $\delta_H$  1.25 (H-21 and H-22) and 2.51 (H-16 $\beta$ ) indicated that the OH group at C-16a and the reverse prenyl moiety were on the same face of the molecule. On the other hand, the correlations between H-17 and H-19 placed the isopropyl moiety on the same side of the reverse prenyl grouping. This arrangement of the substituents allowed four diastereoisomers, namely, **5aR,8R,15bR,16aR**; **5aS,8S,15bS,16aS**; **5aR,8R,15bS,16aS**, and **5aS,8S,15bR,16aR**.

In order to discriminate between the four diastereoisomers, computational predictions of NMR isotropic shielding tensors of all isomers were carried out using the GIAO method at the mPW1PW91/6-311G+(d,p), and B3LYP/6-31G+(d,p) levels with the conductor polarizable

**Table 3**

NMR spectrum for albolutein B (**2**) in CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H (700 MHz) and <sup>13</sup>C (175 MHz). Assignments based on the analysis of the HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) and HMBC experiments; *J* values (Hz) in parentheses.

Position	$\delta_c$	$\delta_H$	HMBC	NOESY
1	122.1	7.30 (dd, 7.2, 0.7)	3, 4a, 16a	3, 4, 16 $\beta$
2	119.0	6.87 (ddd, 7.8, 7.2, 0.7)	1, 4, 16a, 16b	1
3	129.9	7.18 (ddd, 7.8, 7.2, 0.7)	1, 4, 16b	2, 4
4	108.7	6.53 (dd, 7.2, 0.7)	1, 2, 16b	5
4a	146.5			
5		4.73 (s, N-H)	4a, 16a, 16b, 18	4, 19, 21, 22
5a	111.0			
7	169.5			
8	61.0	5.30 (d, 9.5)	7, 10, 15a, 17, 17a, 17b	17, 17a, 17b
10	161.3			
10a	120.3			
11	126.9	8.23 (dd, 8.0, 1.6)	10, 13, 14a	12
12	127.6	7.45 (ddd, 8.0, 7.1, 1.6)	10a, 13, 14	13
13	134.3	7.65 (ddd (8.2, 7.1, 1.6)	11, 14a	12, 14
14	128.0	7.35 (dd, 8.2, 1.6)	10a, 12	13
14a	146.3			
15a	148.1			
15b	90.5		16 $\alpha$	
16	51.5	$\alpha$ : 4.00 (d, 14.1) $\beta$ : 2.51 (d, 14.1)	7, 5a, 15a, 15b, 16b 5a, 15a, 16a, 16b	1, 16 $\beta$ 1, 16a, 16a
16 $\alpha$	90.8			
16b	131.6			
17	33.4	2.72 (m)	7, 8, 17a, 17b	8, 17a, 17b, 19
17a	19.6	1.00 (d, 6.8)	8, 17, 17b	8, 17
17b	20.2	1.32 (d, 6.8)	8, 17, 17a	8, 17
18	44.9			
19	143.7	6.03 (dd, 17.6, 10.8)		5, 17, 20 $\beta$ , 21, 22
20	114.5	$\alpha$ : 5.19 (dd, 17.6, 1.1) $\beta$ : 5.14 (dd, 10.8, 1.1)	18, 19 18	21, 22 19
21	29.7	1.25 (s)	18	5, 16a, 17, 19
22	29.7	1.25 (s)	18	5, 16a, 17, 19
16a-OH		7.17 (s)	90.8	16 $\beta$ , 21, 22
15b-OH		2.77 (s)		

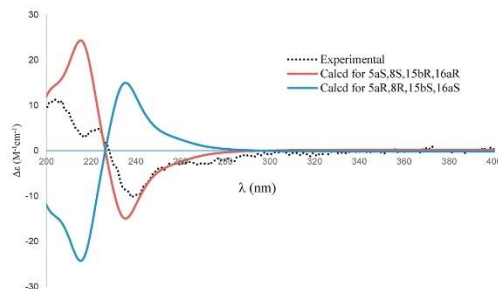
calculation model (PCM) in CHCl<sub>3</sub> (Grimblat et al., 2015; Marcarino et al., 2020). The isotropic shielding tensors for each diastereoisomer were subjected to DP4+ statistical analysis, which showed that isomer 5aS,8S,15bR,16aR is the most probable structure; this diastereoisomer was predicted with probabilities of 100% at the B3LYP/6-31G+(d,p) level, and 99.98% at the mPW1PW91/6-311G+(d,p) level (Table 4; Table S1). This prediction was supported by the calculation of the ECD spectra (Yang et al., 2020) of the 5aS,8S,15bR,16aR isomer and its enantiomer, using the time-dependent density functional theory (TD-DFT) method. The calculated spectrum for the 5aS,8S,15bR,16aR isomer was identical to the experimental spectrum (Fig. 3). Thus, compound **2** was characterized as depicted in Fig. 1.

It is worth mentioning that compounds **1–3** failed to yield suitable crystals for X-ray crystallographic analysis.

**Table 4**

Results of DP4+ probability analysis at different levels of theory and *J*-DP4 analysis.

Isomer	Configuration	DP4+	
		mPW1PW91/6-311G+(d,p)	B3LYP/6-31G+(d,p)
1	5aR,8R,15bR,16aR	0.02%	0.00%
2	5aR,8R,15bS,16aS	0.00%	0.00%
3	5aS,8S,15bR,16aR	99.98%	100.00%
4	5aS,8S,15bS,16aS	0.00%	0.00%



**Fig. 3.** Comparison of the experimental ECD spectrum of **2** (dotted black) with the enantiomers 5aS,8S,15bR,16aR (red) and 5aR,8R,15bS,16aS (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

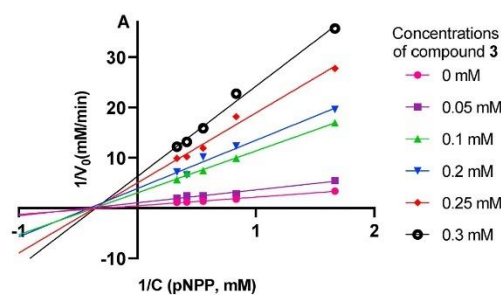
## 2.2. PTP1B inhibitory activity

Alboluteins A-C (**1–3**) were evaluated for their inhibitory activity against PTP1B using a spectrophotometric enzymatic assay (Rangel-Grimaldo et al., 2020; Jiménez-Arreola et al., 2020). The most active compounds were **1** and **2** (Table 4), revealing that the presence of hydroxyl groups has a positive impact on the activity. The positive control was ursolic acid (**6**) ( $IC_{50} = 29.0 \pm 2.8 \mu M$ ).

The yield of albolutein C (**3**) allowed us to perform a kinetic analysis (Figs. S32 and S33). Measurement of the effect of varying substrate concentration with an inhibitor at several concentrations produces a family of double-reciprocal curves, each with a characteristic slope and y-intercept. The changes in slope and y-intercept are characteristic for the different types of inhibitors. In compound **3**, both slope and y-intercept changed (Fig. 4), consistent with a non-competitive inhibition ( $k_i = 0.040 \pm 0.004 \text{ mM}$ ); accordingly, when inhibitor concentration increases, the  $V_{max}$  decreases, and  $K_M$  values did not show significant changes. The nonlinear regression ( $R^2 = 0.9654$ ) analysis of the Michaelis-Menten graphics (Fig. S32) also supported a non-competitive inhibition type.

## 2.3. Docking and molecular dynamic studies

A docking study was carried out using the catalytic domain of PTP1B (PDB: 1T49) with compounds **1–3**, and ursolic acid (**6**) as a positive control. The results indicate two preferred binding sites, a catalytic and an allosteric (Fig. 5). Estimated binding energies are about an order of magnitude higher for the catalytic site. Table 5 shows the results



**Fig. 4.** Kinetic analysis for **3** versus PTP1B. The double-reciprocal curves in which inverse velocity versus inverse substrate concentration are plotted. The curves represent different concentrations of compound **3**.



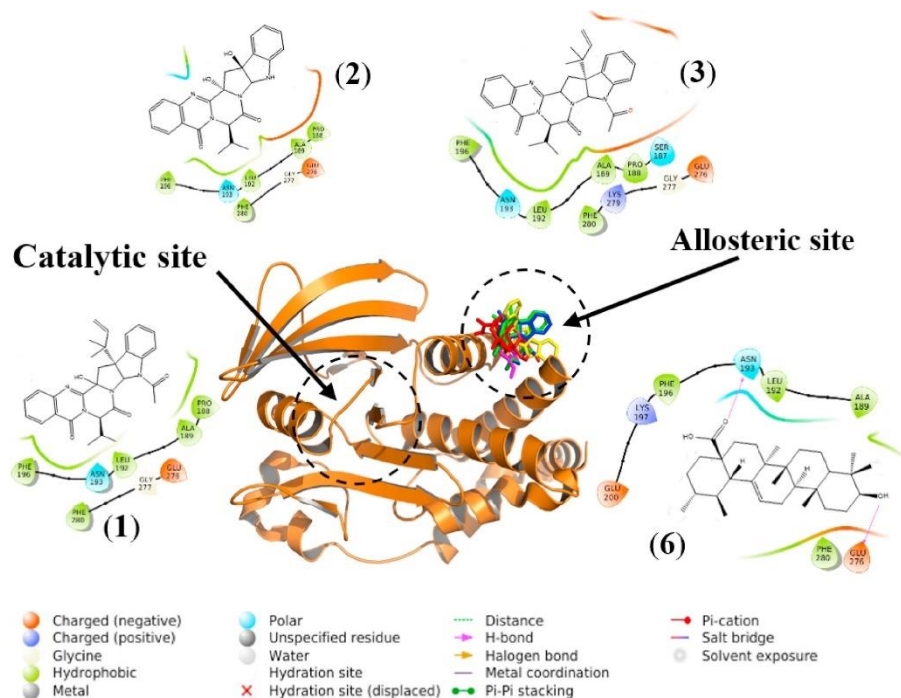


Fig. 5. Structural models of the binding sites of the PTP1B ligand complexes. In the center, the protein PTP1B is shown in orange cartoons, red sticks (1), green sticks (2), blue sticks (3), and magenta sticks (6). The images were created with the PyMOL and Maestro programs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

**Table 5**  
Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity of alloloteins A-C (1–3) from *M. abolutea* expressed as IC<sub>50</sub> (experimental), and docking analysis results.

Compound	Enzymatic assay		Docking studies	
	IC <sub>50</sub> (μM)	K <sub>i</sub> <sup>1</sup> (mM)	EB <sup>2</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	Interacting residues
1	19.8 ± 1.4	2.02 × 10 <sup>-4</sup>	-9.13	<sup>3</sup> Pro188, <sup>3</sup> Ala189, <sup>3</sup> Leu192, <sup>4</sup> Asn193, <sup>3</sup> Phe196, <sup>3</sup> Glu276, Gly277, and <sup>3</sup> Phe280
2	25.8 ± 1.8	1.31 × 10 <sup>-4</sup>	-9.39	<sup>3</sup> Pro188, <sup>3</sup> Ala189, <sup>3</sup> Leu192, <sup>4</sup> Asn193, <sup>3</sup> Phe196, <sup>3</sup> Glu276, Gly277, and <sup>3</sup> Phe280
3	129.5 ± 2.6	2.67 × 10 <sup>-5</sup>	-8.97	<sup>4</sup> Ser187, <sup>3</sup> Pro188, <sup>3</sup> Ala189, <sup>3</sup> Leu192, <sup>4</sup> Asn193, <sup>3</sup> Phe196, <sup>3</sup> Glu276, Gly277, <sup>6</sup> Lys279, and <sup>3</sup> Phe280
6	29.0 ± 2.8	3.5 × 10 <sup>-4</sup>	-10.17	<sup>3</sup> Ala189, <sup>3</sup> Leu192, <sup>4</sup> Asn193, <sup>3</sup> Phe196, <sup>6</sup> Lys197, <sup>3</sup> Glu200, <sup>5,6</sup> Glu276, and <sup>3</sup> Phe280

<sup>1</sup>Theoretical inhibition constant at 298.15 K. <sup>2</sup>Binding energy. <sup>3</sup>Hydrophobic interaction. <sup>4</sup>Polar interaction <sup>5</sup>Charged (negative) interaction. <sup>6</sup>Charged (positive) interaction. <sup>7</sup>H-bond.

obtained for docking using the enzyme's allosteric site (Ala189, Leu192, Asn193, Phe196, Lys197, Glu200, Glu276, Phe280, Ile281 Val287, Gln290) (Wiesmann et al., 2004). Compounds 1–3 have estimated k<sub>i</sub> in

the mM range.

The results of the molecular dynamics (MD) analysis are summarized in Table 6. All complexes have a negative ΔG value. On the other hand, the enthalpy component is the one that contributes the most to ΔG, which is an indirect reflection of the interaction between the ligands and the protein. The calculated RMSD for the complexes 1–3, and 6 and PTP1B (Fig. 6) indicated that they remain stable throughout the simulation time (see Fig. 7).

The *in vitro* assay results agreed with the docking and molecular dynamics studies, indicating that the formation of the complexes between the ligands 1–3 and PTP1B resulted in the inhibition of the enzyme. Additionally, the compounds' binding preference for the allosteric site of the enzyme is consistent with the kinetic analysis for allolutein C.

**Table 6**  
Binding free energies calculated by MM/PBSA of the PTP1B-1–3, and 6 complexes.

Complex	ΔG	ΔH	ΔS
PTP1B-1	-10.75 ± 3.2	-28.61 ± 2.4	-14.85 ± 2.1
PTP1B-2	-6.34 ± 1.8	-23.49 ± 3.5	-17.14 ± 1.8
PTP1B-3	-10.36 ± 3.4	-28.97 ± 4.1	-18.60 ± 3.7
PTP1B-6	-3.11 ± 1.2	-21.44 ± 2.2	-18.32 ± 3.2

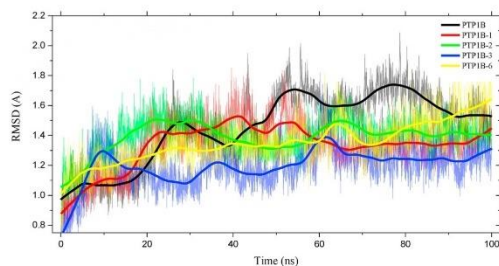


Fig. 6. RMSD as a function of time of the PTP1B-compounds complexes.

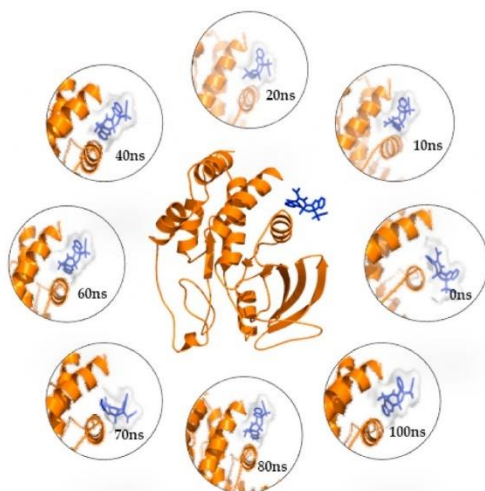


Fig. 7. Structural models of PTP1B-3 complex from 0 to 100 ns of MD. The structures used in the simulation were 149T.pdb. The analyzes and figures were made with CPPTRAJ and PyMOL.

#### 2.4. Drug-likeness, pharmacokinetics, and medicinal chemistry friendliness of 1–3

The enzymatic studies and the docking and dynamic analysis cannot predict a compound's suitability as a drug. Therefore, to check whether alboluteins A-C (1–3) possess favorable drug-likeness, pharmacokinetics, and friendliness medicinal chemistry properties, they were analyzed using the SwissADME web tool (Daina et al., 2017). The physicochemical properties predicted (lipophilicity, size, polarity, solubility, flexibility, and saturation) are indicated in Table S2 and Fig. S26. The oral availability for compounds 1–3 is presented as bioavailability radar plots (Figs. S21–S24), which gives a graphical picture of any analyzed compound's drug-likeness. The pink areas, in each case, represent the optimal range for each property and the red lines represent values of the six calculated properties, which on average, predicted that the three compounds are orally bioavailable with a drug score of 0.55, which is acceptable for any compound becoming a commercial drug. Compounds 1–3 followed four drug-likeness rules, namely

Lipinski (Lipinski et al., 1996), Egan (Egan et al., 2000), Veber (Veber et al., 2002), and Muegge (Muegge et al., 2001).

The pharmacokinetic analysis predicted that compounds 1 and 2, but not 3, are a substrate of the permeability glycoprotein (P-gp), an important protein of the cell membranes that actively pumps many extraneous substances out of cells. Compounds 1 and 2 have a high probability of passively permeating the gastrointestinal (g.i.) barrier. On the other hand, compound 3, but not 1 and 2, potentially permeates the blood-brain barrier (BBB). These results were graphically represented also using the BOILED-Egg model. The visual analysis of Fig. S25 highlights that compounds 1 and 2 fell inside the white ellipse, thus having a high probability of being passively absorbed by the g.i. tract. On the other hand, 3 falls inside the yellow ellipse indicating its probability to cross the BBB.

The predicted results also revealed that 1–3 have higher opportunities to be CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4) enzyme inhibitors (Table S2). Inhibition of these isoenzymes is one major cause of pharmacokinetics-related drug-drug interactions leading to toxic or other unwanted adverse effects due to the lower clearance and accumulation of the drug or its metabolite.

Regarding the medicinal chemistry analysis, in all cases, the strict lead-like criteria of Teague present one violation in the case of 1 and 2 (molecular weight > 350) and two violations in the case of 3 (molecular weight and the XLOGP3 > 3.5) (Teague et al., 1999). The outcome of the Pan Assay Interference Structures (PAINS) model, devised to exclude molecules that could show false positives in biological assays, do not post alert. However, according to the Brenk rules, there is one warning for compounds 1–3, the presence of an isolated double bond (Brenk et al., 2008; Baell and Holloway, 2010). The synthetic accessibility is higher than 5, and the lead-likeness showed one or two violations, a molecular weight higher than 350 in the three cases, and a value of XLOGP3 higher than 3.5. In summary, the best candidate of the three molecules is compound 2. Thus, to improve the medicinal chemistry properties, we repeated the calculation removing the reverse isoprenyl moiety from molecule 2. The resulting structure 2a showed excellent pharmacokinetic and drug-likeness profiles. The lead-likeness kept the molecular weight violation, which was closer to 350 g/mol, and the synthetic accessibility improved.

### 3. Conclusions

In summary, alboluteins A-C (1–3), undescribed ardeemins and sartoryglabrin analogs, were discovered from *Malbranchea albolutea*. This is the first report on the presence of ardeemins analogs in the genus *Malbranchea*. These compounds represent a new class of allosteric PTP1B inhibitors, as demonstrated by docking, molecular dynamic and kinetic analyses. The relevance of this finding stems from the fact that PTP1B is a validated target for multiple diseases, especially diabetes and cancer. Sartoryglabrin B and related compounds (Kijjoo et al., 2011) have shown cytotoxic action, thus, it is possible that alboluteins A-C have antitumoral potential since PTP1B is a positive regulator of tumor progression. Also, as some ardeemins (Zhang et al., 2014) they could have reversal effects on multidrug resistant tumor cells. The hexahydroindolo[2,3-b]indole with a fused quinazolinone moiety as in 2a might be a promising scaffold for drug development.

### 4. Experimental

#### 4.1. General experimental procedures

IR spectra were recorded using a Bruker Tensor 27 FT-IR spectrophotometer (Bruker Corp., Billerica, MA, USA). Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a PerkinElmer model 343 polarimeter at 20 °C (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). ECD spectra were obtained on Jasco J-1500 spectrophotometer (Easton, MD, USA). NMR spectra were recorded on a Bruker (Bruker Corp., Billerica,



MA, USA) AVANCE III HD with TCI CryoProbe 700 H-C spectrometer at 700 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 175 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) and Bruker BioSpin GmbH 500 H-C spectrometer at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), in  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , using TMS as an internal standard. High-resolution mass spectra (HRMS) were acquired with a JEOL AccuTOF-DART JMS-T100LC (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) spectrometer in positive mode. Analytical and preparative HPLC was conducted on an XBridge Shield RP-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size; Waters) and an XBridge Prep Shield RP-C<sub>18</sub> (250 mm × 19.0 mm, 5 μm particle size; Waters) columns, respectively in a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) equipped with a 2535 quaternary pump, a 2707 autosampler, and a 2998 PDA and 2424 ELSD detectors. Data management and acquisition were performed with the Empower 3 software (Waters). Column chromatography (CC) was carried out on Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) or Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Thin layer chromatography (TLC) analyses were performed on silica gel 60 F<sub>254</sub> plates, 70–230 mesh (Merck, Darmstadt, Germany), and visualization of the plates was carried out using a  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$  (10%) solution in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Reagent-grade *n*-hexane,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH and HPLC-grade MeCN, and  $\text{H}_2\text{O}$  were purchased from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA).

#### 4.2. Fungal strain and identification

The fungal strain *Malbranchea albolutea* Sigler & Carmichael (Onygenaceae) (type strain ATCC 34522) (Sigler and Carmichael, 1976) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). When *M. albolutea* was described an *Auxarthron* sexual state (teleomorph) was indicated by Sigler and Carmichael (1976); however, the authors never formally described the *Auxarthron* state. Later Sigler et al. (2002) formally described the sexual state as *Auxarthron alboluteum* Sigler & Hambleton based on mating studies. To confirm the identity of ATCC 34522 based on molecular data, the strain 34,522 was sequenced for the ITS rDNA (ITS1, 5.8S, and ITS2) using primer combination of ITS1F and ITS4 because sequence data were available in GenBank from reference sequences for accurate identification (Hubka et al., 2013; Sarrocco et al., 2015; Sigler et al., 2002). Additional methods for molecular identification were outlined previously (Raja et al., 2017). BLAST search in the National Center for Biotechnology Information database using the internal transcribed spacer region from the fungi type and reference material showed that strain ATCC 34522 had 99.81% homology with *A. alboluteum*/*M. albolutea* UAMH 2846 (NR\_111137.1; AY177303). In the standard (nr) database, the top matches were also *A. alboluteum*/*M. albolutea* sequences with >99.82% sequence homology with strains such as IFM 41545, CBS 125.77, F-1-60, and UAMH 4119. The top matching published ITS nucleotide sequences of *A. alboluteum*/*M. albolutea* along with additional *Auxarthron*/*Malbranchea* spp. A number of ITS sequences with close homology to ATCC 34522 were obtained from published studies and incorporated into a multiple sequence alignment using MAFFT default settings using the program PhyloSuite (Zhang et al., 2020). The alignment was trimmed to remove ambiguous characters using GBlocks (Talavera and Castresana, 2007). ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) was used to select the best-fit model using Akaike Information Criterion. The best fitting substitution model: General Time Reversible with empirical base frequencies, allowing for a proportion of invariable sites, and a discrete Gamma model with four rate categories (GTR+I+G4) was determined by AIC. The trimmed alignment was then used to infer the Maximum Likelihood of ITS sequence data using IQ-TREE implemented in PhyloSuite. Ultrafast bootstrapping was done with 5000 replicates (Nguyen et al., 2015). Nodes with UFBoot >90% are shown on the clades but only nodes >95% were considered strongly supported. Based on results of the BLAST search and Maximum Likelihood analysis with IQ tree, strain ATCC 34522 is identified as *Malbranchea albolutea* (Onygenales; Onygenaceae; Ascomycota) (Figure S1). We use the name *Malbranchea* instead of *Auxarthron* due to historical priority,

*Malbranchea* Saccardo 1882 would have a priority over its teleomorphic name, *Auxarthron* G.F. Orr and Kuehn 1963 based in One Fungus = One Name (1F1N) (Hawksworth et al., 2011; Taylor, 2011), in accordance with the recent changes concerning pleomorphic fungi in the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. The sequence data are deposited in GenBank with accession number: ITS: MW182263 and MW182264.

#### 4.3. Fermentation, extraction, and isolation

Seed cultures of the fungus were prepared using potato-dextrose broth (PDB, BD, Franklin Lakes) media and incubated at room temperature for 7 day at 100 rpm. Next, *M. albolutea* was grown on Erlenmeyer flasks (50% rice/water). After 21 days of fungal growth, the culture media was extracted exhaustively with EtOAc, and the resulting extract was evaporated *in vacuo* to yield 1.0 g of a brown residue.

The EtOAc extract (1.0 g) was chromatographed on an open silica gel column using a stepwise gradient of petroleum ether-chloroform-diethyl ether (1:0 to 0:1 and 1:0 to 0:1) to give eighteen primary fractions (Mb<sub>1</sub>–Mb<sub>18</sub>) according to their TLC profiles. Further purification of fraction Mb<sub>5</sub> (130 mg) by preparative HPLC, using as mobile phase (A) water (0.1% formic acid) and (B) acetonitrile with a linear gradient elution program: 0–20 min, 50–100% (B) [Flow rate of 21.4 ml/min; sample injection volume of 150 μL; UV detection at 254 and 288 nm] resulted in the isolation of 0.7 mg of 1 (*t<sub>R</sub>* = 6.6 min) and 8 mg of 3 (*t<sub>R</sub>* = 7.3 min). Further purification of fraction Mb<sub>6</sub> (28.4 mg) by preparative HPLC using the same conditions above mentioned, led to the isolation of compound 2 (4.7 mg; *t<sub>R</sub>* = 6.9 min). Fraction Mb<sub>4</sub> was rechromatographed on an open Sephadex LH-20 column using MeOH yielded 5.5 mg of 1*H*-indole-3-carbaldehyde. From fractions, Mb<sub>9</sub>–Mb<sub>11</sub> spontaneously crystallized 9.4 mg of anthranilic acid. Both compounds were identical to authentic samples.

**Albolutein A (1)**, (6*S*,8*aS*,13*bR*,14*aR*)-9-acetyl-14*a*-hydroxy-6-isopropyl-13*b*-(2-methylbut-3-en-2-yl)-5*a*,6,9,13*b*,14,14*a*-hexahydro-7*H*-benzo[*b*]indolo[3',2':4,5]pyrrolo-[1,2-*h*][1,7]naphthyridine-5,7(8*aH*)-dione (1): glassy white solid;  $[\alpha]_D^{20} = -24$  (c 0.18,  $\text{CHCl}_3$ ); UV [MeCN + formic acid 0.1% (1:1)]  $\lambda_{\text{max}}$  202, 217, 234, and 305 nm;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR see Table 1; HRESIMS  $m/z$  513.2427 [M + H]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, 513.2457.

**Albolutein B (2)**, (6*S*,8*aS*,13*bR*,14*aR*)-13*b*,14*a*-dihydroxy-6-isopropyl-8*a*-(2-methylbut-3-en-2-yl)-5*a*,6,9,13*b*,14,14*a*-hexahydro-7*H*-benzo[*b*]indolo[3',2':4,5]pyrrolo-[1,2-*h*][1,7]naphthyridine-5,7(8*aH*)-dione: glassy yellow solid;  $[\alpha]_D^{20} = -18$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); UV [MeCN + formic acid 0.1% (1:1)]  $\lambda_{\text{max}}$  223, 279, and 303 nm;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR see Table 3; HRESIMS  $m/z$  487.2321 [M + H]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, 487.2301.

**Albolutein C (3)**, (6*S*,8*aS*,13*bR*,14*aR*)-13*b*,14*a*-dihydroxy-6-isopropyl-8*a*-(2-methylbut-3-en-2-yl)-5*a*,6,9,13*b*,14,14*a*-hexahydro-7*H*-benzo[*b*]indolo[3',2':4,5]pyrrolo-[1,2-*h*][1,7]naphthyridine-5,7(8*aH*)-dione: glassy white solid;  $[\alpha]_D^{20} = -16$  (c 0.09,  $\text{CHCl}_3$ ); UV [MeCN + formic acid 0.1% (1:1)]  $\lambda_{\text{max}}$  198, 209, and 233 nm; FTIR-ATR (MeOH)  $\nu_{\text{max}}$ : 3245, 3067, 2960, 2930, 1670, 1601, 1519, 1466, 1388, 1331, 1283, 1147, 927  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR see Table 2; HRESIMS  $m/z$  497.2528 [M + H]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, 497.2508.

#### 4.4. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition assay

##### 4.4.1. Expression and purification of the enzyme hPTP1B

Recombinant hPTP1B was expressed from the PTPN1 gene (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1 from *Homo sapiens*, gene ID: 5770); cloned into a pET-27 vector and codon optimized, following the procedure described by Jiménez-Arreola et al. (2020). Briefly, the construction was amplified by PCR using the specific primers PTP1B Fwd 5'-TGGTCATATGGAAATGGAAAAG-3' and PTP1B Rev 5'-TGCAAGCTTAGTCTTCATCTTTTC-3' which introduce 5'NdeI and 3'HindIII restriction sites (underlined). The PCR product was cloned into

a pET-28 plasmid, in which thrombin protease site was mutated into a TEV site. The resulting new vector p28HthPTP1B was verified by DNA sequencing (Laragen Inc).

Purification of PTP1B was carried out following the procedure described by Krishnan et al. (2018) with some modifications. The cell pellet from a 1 L culture was thawed on ice and suspended in 40 ml of lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 2 mM TCEP). Lysis was carried out by sonication (Misonix 3000). The supernatant was clarified by centrifugation (45 min at 30,000 × g), after filtration with a PVDF membrane (pore size of 4.5 μm). The hPTP1B enzyme was purified by affinity chromatography (His Trap FF, GE Healthcare). The affinity column was equilibrated with 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 1.5 mM DTT. The elution buffer consisted of 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM imidazole, and 1.5 mM DTT, with subsequent buffer exchange using 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, and 1.5 mM DTT to remove imidazole. The protein was used immediately -as is-, or stored at -20 °C in the same buffer plus 4% of glycerol.

#### 4.4.2. PTP1B enzymatic assay

For testing the inhibitory activity against PTP1B a spectrophotometric method previously described was employed (Rangel-Grimaldo et al., 2020; Jiménez-Arreola et al., 2020). Briefly, the extract, fractions, compounds, and positive control were dissolved in DMSO or buffer solution [50 mM; N-2-(hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid)], NaCl 100 mM, DL-dithiothreitol 1.5 mM pH = 6.8, all from Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA. Aliquots of 0–10 μL of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min at 37 °C with 10 μL of enzyme stock solution (3 μM) in buffer solution. After incubation, 10 μL of the substrate p-nitrophenyl phosphate (pNPP, 3 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) was added and incubated a further 20 min at 37 °C, and then the absorbance was recorded at 415 nm. For the extract and fractions, the inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the blank (buffer) according to Eq. (1):

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

where % PTP1B is the percentage of inhibition,  $A_{415t}$  is the corrected absorbance of the extract, fractions, or compound under testing ( $A_{415end} - A_{415initial}$ ), and  $A_{415c}$  is the absorbance of the blank ( $A_{415end\ blank} - A_{415initial\ blank}$ ). The  $IC_{50}$  was calculated by regression analysis using Eq. (2):

$$\%PTP1B = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^s} \quad (2)$$

where % PTP1B is the percentage of inhibition,  $A_{100}$  is the maximum inhibition,  $I$  is the inhibitor concentration,  $IC_{50}$  is the concentration required to inhibit the activity of the enzyme by 50%, and  $s$  is the cooperative degree. For this experiment, we used the protocol developed in our group and the adequate equations for the determination of kinetic parameters (Rangel-Grimaldo et al., 2019; Jiménez-Arreola et al., 2020; Copeland 2001).

All figures regarding enzymatic evaluations are depicted in the supplementary material (Figs. S27–S31).

**4.4.2.1. Kinetics studies.** Since compound **3** was available in sufficient amounts, a kinetic analysis was performed. The conditions were the same above indicated (Jiménez-Arreola et al., 2020; Copeland, 2001); besides, a saturation curve of the enzyme with the substrate (pNPP) was built with fixed concentrations of albolutein C (**3**) (0–0.3 mM). Measurement of the initial reaction velocity as a function of varied substrate concentration (0–0.3 mM) gives the Michaelis-Menten relationship, that is, a rectangular hyperbola with a characteristic maximal velocity ( $V_{max}$ ), and a measure of the relative affinity of the enzyme for the

substrate ( $k_M$ ) at half-maximal velocity. Construction of double-reciprocal transformation of the data linearizes the curve such that the y-intercept equals  $1/V_{max}$  and the x-intercept equals  $1/k_M$ . The set lines tendency is specific for the type of inhibition; in the case of non-competitive, all the straight lines intercept in the same point in the negative x-axis; also, the slopes and y-intercept increase proportionally with the increment of the inhibitor concentration (Copeland, 2001).

A nonlinear regression followed by analysis with the equations in Enzyme kinetics–Inhibition was performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), in this way we obtained the kinetic parameters ( $k_j$ ,  $k_M$ ,  $V_{max}$ ), along with a global  $R^2$  for the types of inhibitions. The results were:  $R^2_{competitive} = 0.9594$ ,  $R^2_{uncompetitive} = 0.9542$  and  $R^2_{non-competitive} = 0.9654$ ; the best  $R^2$  was for the non-competitive inhibition. The program employs Eq. (3) for the non-competitive inhibition curve:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{k_M + [S] \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (3)$$

where  $v_0$  is the initial velocity of reaction,  $V_{max}$  is the maximum velocity,  $S$  the substrate concentration,  $I$  the inhibitor concentration,  $k_M$  the Michaelis-Menten constant, and  $k_i$  is the non-competitive inhibition constant. The results indicated that  $V_{max}$  decreased, and the  $k_M$  values did not show a significant change when the concentration of inhibitor increased, which supported the type of inhibition proposed (Copeland, 2001; Segel, 1994).

All figures regarding the kinetic analysis are depicted in the supplementary material (Figs. S32 and S33).

#### 4.5. Docking studies

The minimized structures for docking simulations were prepared using Autodock Tools package v1.5.4 (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). For **1–3** and **6**, the addition of Gasteiger charges and the number of torsions were set, and non-polar hydrogens were merged. The crystallographic structure of PTP1B from humans was obtained from the Protein Data Bank (PDB code 1T49). For the receptor, polar hydrogens and Kollman charges were added, and solvation parameters were assigned by default. Molecular docking studies were achieved with AutoDock v1.1.2.15. First, a blind docking was conducted to establish the frequent site of interaction of the compounds with PTP1B. The search space for this preliminary docking was defined as a box size of  $90 \times 90 \times 90 \text{ \AA}$  in the x, y, and z dimensions, with a grid spacing of 0.375 Å and the macromolecule set as the center of the box. The default parameters of exhaustiveness and the number of modes were not altered. Next, a refined docking at the allosteric site was performed with a smaller box of searching space ( $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$  and 0.375 Å of grid spacing), setting as the center of the grid box the lower state pose obtained from the blind docking. The conformational states from the docking simulations were analyzed using the AutoDockTools program, which also identified the H-bonds and van der Waals interactions between the catalytic site of PTP1B and the ligand. The predicted docked complexes (protein–ligand) were those conformations showing the lowest binding energy. The figures preparation was accomplished with the PyMOL visualization tool (PyMOL Molecular Graphics System v1.7.4) and Maestro (Schrödinger).

#### 4.6. Molecular dynamics simulation

All the structural complexes were verified, cleaned, and ordered with the pdb4amber scrip before starting the preparation in order to generate suitable topologies from the LEaP module of AMBER 19 (Case et al., 2005, 2012). Each structure and complex were subjected to the following protocol: hydrogen's and other missing atoms were added using the LEaP module with the leaprc.protein.ff19SB parameter set, K<sup>+</sup>



counter ions were added to neutralize the system, the complexes were then solvated in an octahedral box of explicit TIP3P model water molecules localizing the box limits at 12 Å from the protein surface. 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 Å) for treating long-range electrostatic interactions with a 10 Å cutoff for computing direct interactions. The SHAKE algorithm was used to satisfy bond constraints, allowing the employment of a two fs time step for the integration of Newton's equations as recommended in the Amber package (Case et al., 2012; Walker et al., 2008). Amber leaprc.protein.ff19SB force field (Tian et al., 2020) parameters were used for all residues. All calculations were made using graphics processing units (GPU) accelerated MD engine in AMBER (pmemd.cuda), a program package that runs entirely on CUDA-enabled GPUs (Salomon-Ferrer et al., 2013). The protocol consisted of performing a minimization of the initial structure, followed by 50 ps heating and depressurization 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 40 ns for each complex. Frames were saved at ten ps intervals for subsequent analysis. All analyzes were done using CPPTRAJ (Roe and Cheatham, 2013) part of AMBER19 utilities and OriginPro 9.1. The calculations of RMSD were made considering the C, CA, and N; for the distances, only CA was used. The charts were built with Origin, and the trends were adjusted with the function processing smooth. VMD and PyMOL (DeLano, 2004) were used to visualize and create MD images. Binding free energies were calculated by Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area (MM/PBSA). This method involves a combination of molecular mechanic's energy with implicit solvation models to calculate binding free energies. In MM/PBSA (Zhou and Madura, 2004), binding free energy ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) between a ligand (L) and a target (T) to form a complex is calculated with Eqs. (4)–(6):

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{Sol}} - T\Delta S \quad (4)$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{Internal}} + \Delta E_{\text{Electrostatic}} + \Delta E_{\text{Vdw}} \quad (5)$$

$$\Delta G_{\text{Sol}} = \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad (6)$$

where  $\Delta E_{\text{MM}}$ ,  $\Delta G_{\text{Sol}}$ , and  $-T\Delta S$  are the changes of the gas phase molecular mechanics energy, the solvation free energy, and the conformational entropy upon binding, respectively.  $\Delta E_{\text{MM}}$  comprises  $\Delta E_{\text{Internal}}$  (bond, angle, and dihedral energies),  $\Delta E_{\text{Electrostatic}}$  (electrostatic energies), and  $\Delta E_{\text{Vdw}}$  (van der Waals energies),  $\Delta G_{\text{Sol}}$  is the sum of electrostatic solvation energy;  $\Delta G_{\text{PB}}$  (polar contribution) and  $\Delta G_{\text{SA}}$  (non-polar contribution). The polar contribution is calculated using the Poisson-Boltzmann surface area model, while the non-polar energy is estimated from the solvent-accessible surface area (SASA). The conformational entropy change ( $-T\Delta S$ ) was computed by normal mode analysis from a set of conformational snapshots taken from the MD simulations (Hou et al., 2011; Kollman et al., 2000).

#### 4.7. Chemical shifts and ECD calculations

Minimum energy structures for the different diastereoisomers were built with Spartan'10 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). Conformational analysis was performed with the Monte Carlo search protocol under the MMFF94 molecular mechanics force field. The conformers with an energy cutoff of 5 kcal/mol were submitted to Gaussian 09 program (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA) calculation for their geometry optimization performed using DFT B3LYP/6-31G(d) level of theory and the NMR shielding constants were calculated with the Gauge-Independent Atomic Orbital (GIAO) method at the mPW1PW91/6-31G+(d,p) and B3LYP/6-31G+(d,p) levels using the PCM solvent model in  $\text{CHCl}_3$  (Marcarino et al., 2020; Grimblat et al., 2015; Frisch et al., 2013). The experimental and calculated data were analyzed by the

DP4+ probability method using the Excel file provided for the authors at sarotti-NMR.weebly.com (Grimblat et al., 2015).

The TD-DFT method at the B3LYP/6-31G+(d,p) level of theory in methanol with the PCM model was employed for ECD calculations using the same DFT-minimized conformers. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength (R) in dipole velocity ( $R_{\text{vel}}$ ) and dipole length ( $R_{\text{len}}$ ) forms were simulated into an ECD curve. The calculated and weighted ECD curves were all generated using SpecDis 1.71, respectively (Bruhn, 2017).

#### 4.8. Drug-likeness analysis of bioactive compounds using SwissADME tool

The pharmacokinetics and drug-likeness properties of the natural products 1–3, such as passive human gastrointestinal absorption (g.i.), blood–brain barrier (BBB) permeation, substrate or non-substrate of the permeability glycoprotein (P-gp), and interaction of molecules with five major isoforms of the human cytochromes P450 interfering in the metabolism of numerous endogenous and exogenous compounds, have been predicted using SwissADME online server (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina et al., 2017). The medicinal chemistry characteristics such as PAINS for pan-assay interference compounds or promiscuous compounds, Brenk alert which inform about allegedly toxic, metabolically unstable, chemically reactive fragments present in the structure, and lead-likeness and synthetic accessibility were calculated. In addition, the bioavailability radar was analyzed by visualizing the pink area that represents the optimal range of each property as plotted: lipophilicity (LIP0):  $-0.7 < \text{XLOGP3} < +5.0$ ; 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 (unsaturation):  $0.25 < \text{fraction of Csp3} < 1$ ; and FLEX (flexibility):  $0 < \text{number of rotatable bonds} < 9$ . Such molecule may be achieved as drug-likeness if the pink colored zone of the radar plot of the molecule must fall entirely in the red zone. The BOILED-Egg construction model was obtained via SwissADME to assess the gastrointestinal absorption and brain penetration of the targeted compound. The target proteins for the isolated molecule have been predicted using the Swiss target prediction software.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320. M.D.R. acknowledges a fellowship from CONACyT (767934) to pursue graduate studies. NMR Lab and LURMN at IQ-UNAM are funded by grants CONACyT-0224747 and DGAPA. We also acknowledge the support of Dr. Nicholas Oberlies and Dr. Laura Flores from the Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, for their valuable support for recording a  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 2. The authors also recognize Alejandro Camacho-Cruz for activation of the *Malbrachea* culture, and Araceli Pérez-Vásquez for technical support, both from Facultad de Química. We are grateful to Beatriz Quiroz García and Rocío Patiño from Instituto de Química for recording some of the NMR and CD spectra, respectively. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for the resources to carry out computational calculations through the Mitzli supercomputing system (LANCAD-UNAM-DGTIC-313).



## Appendix A. Supplementary data

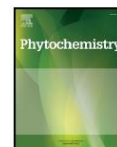
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112664>.

## References

- Baell, J.B., Holloway, G.A., 2010. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 53, 2719–2740. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>.
- Beyett, T.S., Fraley, A.E., Labudde, E., Patra, D., Coleman, R.C., Eguchi, A., Glukhova, A., Chen, Q., Williams, R.M., Koch, W.J., Sherman, D.H., Tesmer, J.J.G., 2019. Perturbation of the interactions of calmodulin with GRK5 using a natural product chemical probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 116, 15895–15900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818547116>.
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I.L., Frearson, J., Wyatt, P.G., 2008. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* 3, 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>.
- Bruhlu, T., Schauböckel, A., Henberger, Y., Pescitelli, G., 2017. SpecDis Version 1.71, Berlin, Germany. <http://specdis-software.jimdo.com>.
- Case, D.A., Cheatham, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- 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, R., Swails, J., Götz, A.W., Kolossváry, I., Wong, K.F., Paesani, F., Kollman, P., 2012. Amber 12. University of California, San Francisco, 10779586.
- Clark, B., Capon, R.J., Lacey, E., Tennant, S., Gill, J.H., Bulheller, B., Bringmann, G., 2005. Gymnoscolides A–C: aromatic butenolides from an Australian isolate of the soil ascomycete *Gymnoscolecium reissii*. *J. Nat. Prod.* 68, 1226–1230. <https://doi.org/10.1021/np050145p>.
- Copeland, R.A., 2001. Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis in Analytical Biochemistry, second ed. Wiley-CVH, New York. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5023>.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- Delano, W.L., 2004. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 228, U313–U314.
- Ding, Y., Greshock, T.J., Miller, K.A., Sherman, D.H., Williams, R.M., 2008. Prenylmalbranamide: synthesis, isotopic labeling, biosynthetic incorporation, and detection in cultures of *Malbranchea aurantiaca*. *Org. Lett.* 10, 4863–4866. <https://doi.org/10.1021/ol8019633>.
- Dowarah, J., Singh, V.P., 2020. Anti-diabetic drugs recent approaches and advancements. *Bioorg. Med. Chem.* 28, 115263. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115263>.
- Egan, W.J., Merz, K.M., Baldwin, J.J., 2000. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* 43, 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.
- Figueroa, M., González, M.D.C., Mata, R., 2008. Malbranamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Nat. Prod. Res.* 22, 709–714. <https://doi.org/10.1080/14786410802012361>.
- Figueroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Río-Portilla, F., González, M.D.C., Mata, R., 2011. Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbranamide with calmodulin. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 26, 378–385. <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.518964>.
- Fraley, A.E., García-Borrás, M., Tripathi, A., Khare, D., Mercado-Marin, E.V., Tran, H., Dai, Q., Webb, G.P., Watts, K.R., Crews, P., Sarpong, R., Williams, R.M., Smith, J.N., Houk, K.N., Sherman, D.H., 2017. Function and structure of Mala/MaA, iterative halogenases for late stage C–H functionalization of indole alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 139 (34), 12060–12068. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06773>.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J.A., Peralta, J.R., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., 2003. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- Grimblat, N., Zanardi, M.M., Sarotti, A.M., 2015. Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts. *J. Org. Chem.* 80, 12526–12534. <https://www.x-mol.com/paper/Redirect/67475>.
- Hawksworth, D.L., Crous, P.W., Redhead, S.A., Reynolds, D.R., Samson, R.A., Seifert, K.A., Taylor, J.W., Wingfield, M.J., Abaci, O., Aime, C., 2011. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2, 105–111. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.14>.
- Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S.I., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K.I., 2005. 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry* 66, 2776–2779. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.014>.
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., Wang, W., 2011. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 69–82. <https://doi.org/10.1021/ni100275a>.
- Hubka, V., Dobiasova, S., Lyskova, P., Mallatova, N., Chlebkova, J., Skorpova, M., Kubatova, A., Dobias, R., Chudickova, M., Kolarik, M., 2013. *Auxarthron ostraviense* sp. nov., and a *umbrinum* associated with non-dermatophytic onychomycosis. *Med. Mycol.* 51, 614–624. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.770608>.
- International Diabetes Federation, 2019. IDF Diabetes Atlas, ninth ed. Brussels, Belgium [cited 2020 Jul 12]. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>.
- Jiménez-Arreola, B.S., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J.L., Rivera-Chávez, J., 2020. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPPT1B-400: insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorg. Chem.* 101, 103893. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K., Von Haeseler, A., Jermiin, L.S., 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14, 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- Kerru, N., Singh-Pillay, A., Awolade, P., Singh, P., 2018. Current anti-diabetic agents and their molecular targets: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 152, 436–488. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.061>.
- Kijjoa, A., Santos, S., Dethoup, T., Manoch, L., Almeida, A.P., Vasconcelos, M.H., Silva, A., Gales, L., Herz, W., 2011. Sartoryglabrin, analogs of ardeemins, from *Neosartorya Glabra*. *Nat. Prod. Commun.* 6, 807–812. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600615>.
- Kollman, P.A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D.A., Cheatham, T.E., 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* 33, 889–897. <https://doi.org/10.1021/ar000033j>.
- Kumar, A., Rana, D., Rana, R., Bhatia, R., 2020. Protein tyrosine phosphatase (PTP1B): a promising drug target against life-threatening ailments. *Curr. Mol. Pharmacol.* 13, 17–30. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190724150723>.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1996. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (Suppl. 1), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- Madariaga Mazón, A., Hernández Abreu, O., Estrada Soto, S., Mata, R., 2015. Insights on the vasorelaxant mode of action of malbranamide. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 551–558. <https://doi.org/10.1111/jphp.12346>.
- Marcario, M.O., Zanardi, M.M., Cietti, S., Sarotti, A.M., 2020. NMR calculations with quantum methods: development of new tools for structural elucidation and beyond. *Acc. Chem. Res.* 53, 1922–1932. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00365>.
- Martínez-Luis, S., González, M.C., Ulloa, M., Mata, R., 2005. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry* 66, 1012–1016. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.005>.
- Martínez Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M.C., Lira Rocha, A., Mata, R., 2006. Malbranamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron* 62, 1817–1822. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.11.047>.
- Mendes, G., De Menezes Oliveira, D., Kohlhoff, M., Rosa, C.A., De Almeida Alves, T.M., Zani, C.L., Rosa, I.H., Johann, S., Barros Cota, B., 2016. Alkaloid metabolites from *Aspergillus fels* and their activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Phytochem. Lett.* 17, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.06.006>.
- Muegge, I., Heald, S.L., Brittelli, D., 2001. Simple selection criteria for drug like chemical matter. *J. Med. Chem.* 44, 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015307e>.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H., 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* 80, 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
- Rangel Grimaldo, M., Macías Rubalcava, M.L., González Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., Mata, R., 2020.  $\alpha$ -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.* 83, 675–683. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01108>.
- Rebollar-Ramos, D., Macías-Rubalcava, M.L., Figueroa, M., Raja, H.A., González-Andrade, M., Mata, R., 2018. Additional  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavosora* (Leotiomycetes, Ascomycota). *J. Antibiot.* 71, 862–871. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0075-6>.
- Roe, D.R., Cheatham, T.E., 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theor. Comput.* 9, 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400314p>.
- Salomon-Ferrer, R., Götz, A.W., Poole, D., Le Grand, S., Walker, R.C., 2013. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh ewald. *J. Chem. Theor. Comput.* 9, 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>.
- Sarocco, S., Diquattro, S., Baronecchi, R., Cimmino, A., Evidente, A., Vannacci, G., Doveri, F., 2015. A polyphasic contribution to the knowledge of *Auxarthron* (Ongygenaceae). *Mycol. Prog.* 14, 112. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1128-x>.
- Schlegel, B., Hanel, F., Göllnick, F.A., Sabz, H.-P., Gräfe, U., 2003. 7-Methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286. *J. Antibiot.* 56, 917–922.

- Segel, I.H., 1994. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, second ed. Wiley-Interscience Publications, New York.
- Sigler, L., Carmichael, J., 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other *Hyphomycetes* with arthroconidia [Fungi, new taxa]. *Mycotaxon* 4, 349–488.
- Sigler, L., Hambleton, S., Flis, A.L., Paré, J.A., 2002. *Auxarthron* teleomorphs for *Malbranchea filamentosa* and *Malbranchea albolutea* and relationships within *Auxarthron*. *Stud. Mycol.* 47, 111–122.
- Teague, S.J., Davis, A.M., Leeson, P.D., Oprea, T., 1999. The design of leadlike combinatorial libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 3743–3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U).
- Talavera, G., Castresana, J., 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56, 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>.
- Taylor, J.W., 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2, 113–120. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2011.02.02.01>.
- Tian, C., Kasavajhala, K., Belfon, K.A.A., Raguette, L., Huang, H., Miguez, A.N., Bickel, J., Wang, Y., Pincay, J., Wu, Q., Simmerling, C., 2020. FF19SB: amino acid specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *J. Chem. Theor. Comput.* 16, 528–552. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>.
- Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45, 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- Verastegui Omaña, B., Rebollos Ramos, D., Pérez Vázquez, A., Martínez, A.L., Madariaga Mazón, A., Flores Bocanegra, L., Mata, R., 2017.  $\alpha$  Glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea*. *J. Nat. Prod.* 80, 190–195. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00977>.
- Verma, M., Gupta, S.J., Chaudhary, A., Garg, V.P., 2017. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as antidiabetic agents—A brief review. *Bioorg. Chem.* 70, 267–283. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.12.004>.
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Fukushima, K.I., Kawai, K., 2008. Structures of new triterpene glycosides, malbrancheosides A–D, from *Malbranchea filamentosa*. *Heterocycles* 75, 1109–1122. <https://doi.org/10.3987/COM-07-11283>.
- Wakana, D., Hosoe, T., Wachi, H., Itabashi, T., Fukushima, K., Yaguchi, T., Kawai, K.I., 2009. The cytotoxic and antifungal activities of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot.* 62, 217–219. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.9>.
- Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K.I., Yaguchi, T., Fukushima, K., Goda, Y., Hosoe, T., 2014. Cytotoxic anthrasteroid glycosides, malsterosides A–C, from *Malbranchea filamentosa*. *J. Antibiot.* 67, 585–588. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.43>.
- Walker, R.C., Crowley, M.F., Cass, D.A., 2008. The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in Amber. *J. Comput. Chem.* 29, 1019–1031. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- Watts, K.R., Loveridge, S.T., Tenney, K., Media, J., Valeriote, F.A., Crews, P., 2011. Utilizing DART mass spectrometry to pinpoint halogenated metabolites from a marine invertebrate-derived fungus. *J. Org. Chem.* 76, 6201–6208. <https://doi.org/10.1021/jo2009593>.
- Wiesmann, C., Barr, K.J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D.A., Shen, W., Fahr, B.J., Zhong, M., Taylor, L., Randall, M., McDowell, R.S., Hausen, S.K., 2004. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 730–737. <https://doi.org/10.1038/nsmb803>.
- Yang, Y.L., Liao, W.Y., Liu, W.Y., Liaw, C.C., Shen, C.N., Huang, Z.Y., Wu, S.H., 2009. 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.* 15, 11573–11580. <https://doi.org/10.1002/chem.200901556>.
- Yang, H.X., He, J., Zhang, F.L., Zhang, X.D., Li, Z.H., Feng, T., Ai, H.L., Liu, J.K., 2020. Trichothecocins D–L, antifungal agents from a potato-associated *Trichothecium crotonigenum*. *J. Nat. Prod.* 83, 2756–2763. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00695>.
- Zhang, D., Gao, F., Jakovlić, I., Zou, H., Zhang, J., Li, W.X., Wang, G.T., 2020. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Mol. Ecol. Resour.* 20, 348–355. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13096>.
- Zhang, H.W., Ying, C., Tang, Y.F., 2014. Four ardeennin analogs from endophytic *Aspergillus fumigatus* SPS-02 and their reversal effects on multidrug-resistant tumor cells. *Chem. Biodivers.* 11, 85–91. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300220>.
- Zhao, B.T., Nguyen, D.H., Le, D.D., Choi, J.S., Min, B.S., Woo, M.H., 2018. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources. *Arch. Pharm. Res. (Seoul)* 41, 130–161. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0997-8>.
- Zhiou, Z., Madura, J.D., 2004. Relative free energy of binding and binding mode calculations of HIV-1 RT inhibitors based on dock-MM-PB/GS. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 57, 493–503. <https://doi.org/10.1002/prot.20223>.





## Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of compounds from *Justicia spicigera* (Acanthaceae)

Araceli Pérez-Vásquez<sup>a,\*,\*\*</sup>, Miriam Díaz-Rojas<sup>a</sup>, Erika V. Castillejos-Ramírez<sup>a</sup>, Alejandra Pérez-Esquivel<sup>a</sup>, Yuliet Montaña-Cruz<sup>a</sup>, Isabel Rivero-Cruz<sup>a</sup>, Rafael Torres-Colín<sup>b</sup>, Martín González-Andrade<sup>c</sup>, Rogelio Rodríguez-Sotres<sup>d</sup>, José Alberto Gutiérrez-González<sup>a</sup>, Abraham Madariaga-Mazón<sup>e,f</sup>, Rachel Mata<sup>a,g</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>e</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>f</sup> Unidad Académica Del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Merida, 97302, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*J. spicigera*  
Acanthaceae  
Protein tyrosine phosphatase 1B  
2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one  
3'-O-Acetyl-kaempferitrin  
Kaempferitrin  
Perisbivalvine B  
2,5-Dimethoxy-p-benzoquinone

### ABSTRACT

An infusion from the aerial parts of *Justicia spicigera* Schltld., an herb commonly used to treat diabetes, inhibited the activity of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). Two undescribed compounds, 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one, and 3'-O-acetyl-kaempferitrin, along with kaempferitrin, kaempferol 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, perisbivalvine B and 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone were isolated from the active extract. Their structures were elucidated by a combination of spectroscopic and spectrometric methods. The isolates were evaluated for their inhibitory activity against PTP1B; the most active compounds were 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one, and perisbivalvine B with IC<sub>50</sub> values of 159.1  $\pm$  0.02  $\mu$ M and 106.6  $\pm$  0.01  $\mu$ M, respectively. However, perisbivalvine B was unstable. Kinetic analysis of 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one and 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone (obtained in good amounts) indicated that both compounds behaved as parabolic competitive inhibitors and bind to the enzyme forming complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry. Docking of 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one and 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone to PTP1B<sub>1-400</sub> predicted a good affinity of these compounds for PTP1B catalytic site and demonstrated that the binding of a second ligand is sterically possible. The 1:2 complex was also supported by the second docking analysis, which predicted an important contribution of  $\pi$ -stacking interactions to the stability of these 1:2 complexes. Finally, an UHPLC-MS method was developed and validated to quantify the content of kaempferitrin in the infusion of the plant.

### 1. Introduction

*Justicia spicigera* Schltld. (Acanthaceae), is a perennial herb found across Mexico, Central America, to Colombia. In Mexico, the plant is known as muicle, and muitle, among other names. The leaf and fruits are used in ethnomedicine to treat various diseases such as dysentery, skin infections, nervous-related disorders, circulation illnesses, and diabetes; also, the plant is helpful as a blood-purifying agent (Atlas de la Medicina Tradicional, 2009; Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). Since Pre-hispanic times, the plant has also been used as a dyeing agent (Atlas de la

Medicina Tradicional, 2009); according to Arberet et al. (2021) this species was used as a vegetal colorant in the Prehispanic Borbonicus Codex. Previous phytochemical studies on *J. spicigera* revealed that its main constituents were flavonoids (kaempferitrin, naringenin, kaempferol) (Euler and Alam, 1982; Esquivel-Gutiérrez et al., 2013), carotenoids (Dominguez et al., 1990; Real-Sandoval et al., 2020), sterols, allantoin (Dominguez et al., 1990), the lignan procumbenoside B (Pérez-Gutiérrez et al., 2018), a few aliphatic compounds (Vega-Avila et al., 2012), and eucalyptol, fatty acid derivatives, azulene, and cinamic acid esters (Baquero-Peña and Guerrero-Beltrán, 2017). From the

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [perezva@unam.mx](mailto:perezva@unam.mx) (A. Pérez-Vásquez), [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx) (R. Mata).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113410>

Received 17 March 2022; Received in revised form 19 August 2022; Accepted 20 August 2022

Available online 27 August 2022

0031-9422/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

pharmacological point of view, different extracts prepared from the aerial parts have shown cytotoxic (Cáceres-Cortés et al., 2001; Jacobo-Salcedo et al., 2011; Alonso-Castro et al., 2012; Fernández-Pomares et al., 2018), immunomodulatory (Alonso-Castro et al., 2012), anti-protozoal (Ponce-Macotela et al., 2001; Peraza-Sánchez et al., 2005; 2007), antihelminthic (Awad et al., 2018), antibacterial and antifungal (Vega-Avila et al., 2012; Jacobo-Salcedo et al., 2011), anti-inflammatory (Meckes et al., 2004), anti-obesity (Real-Sandoval et al., 2020) anti-diabetic (Ortiz-Andrade et al., 2012); antihypertensive (Esquivel-Gutiérrez et al., 2013; Magos-Guerrero et al., 2017), antinociceptive (Zapata-Morales et al., 2016; Ángeles-López et al., 2019), anticonvulsant, anxiolytic (González-Trujano et al., 2017) and spasmolytic (Ángeles-López et al., 2019) activities. Most studies have been carried out with the aqueous or ethanol extracts and the flavonoid kaempferitrin. Regarding toxicological studies, two different investigations indicated that the ethanol and aqueous extracts were not toxic to mice in acute models (Alonso-Castro et al., 2012; González-Trujano et al., 2017).

In our continued efforts to discover protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from natural sources (Rebollar-Ramos et al., 2021; Díaz-Rojas et al., 2021; Rangel-Grimaldo et al., 2020), herein we report the enzymatic inhibition of the components from an infusion prepared from the aerial parts of *J. spicigera*.

PTP1B is an intracellular monomeric enzyme-containing 431 amino acids localized in the endoplasmic reticulum, in insulin-targeted tissues (liver, muscle and fat). PTP1B negatively regulates insulin and leptin signaling systems. Furthermore, many humans and animal studies have demonstrated that in type 2 diabetes mellitus (T2DM) insulin resistance is accomplished by increases in PTP1B activity, dephosphorylating the insulin receptor and thus interrupting the insulin signaling pathways. Consequently, PTP1B inhibition is an important way to improve insulin resistance and normalize glucose levels in patients with T2DM. Many natural products have been reported as potent and selective PTP1B

inhibitors (Casertano et al., 2022; Singh et al., 2022), but only trodusquemine 2, from the dogfish shark, and some analogs have entered clinical trial (Kazakova et al., 2022). Accordingly, developing new and safe PTP1B inhibitors is of great significance because T2DM continue to be a public health problem worldwide (Kumar et al., 2020; Singh et al., 2022; Zhao et al., 2018).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Isolation and characterization

Partitioning with EtOAc (FO1,  $IC_{50} = 91.8 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$ ) of an active infusion from the leaves of *J. spicigera*, followed by column chromatography on silica gel and Sephadex LH-20 yielded two unreported compounds, 2-*N*-(*p*-coumaroyl)-3*H*-phenoxazin-3-one (1), and 3'-*O*-acetyl-kaempferitrin (2) along with the known compounds kaempferitrin (3) (Aragao et al., 1990), kaempferol 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (4) (Fico et al., 2003), perisbivalvine B (Thuy et al., 2012a,b) (5), and 2,5-dimethoxy-*p*-benzoquinone (6) (Kim et al., 2001) (Fig. 1).

Compound 1, isolated as a blue amorphous powder, showed a protonated molecular ion peak at  $m/z$  405.1090 [ $M + H$ ]<sup>+</sup> (calcd 405.1081), corresponding to a molecular formula of  $C_{22}H_{17}N_2O_6$ , as revealed in the high-resolution electrospray ionization mass spectrum (HRESIMS). The UV-VIS [ $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 224 (3.87), 291 (3.63), 601 (3.90) nm] and NMR data (Table 1; Figs. S1–S12) revealed that compound 1 was the amide of the *p*-coumaric acid of perisbivalvine B (4) (Thuy et al., 2012a). The <sup>1</sup>H NMR signals in  $CH_3OH-d_4$  of the 3*H*-phenoxazin-3-one nucleus were observed at  $\delta_H$  8.62 (H-1), 6.53 (H-4), 6.94 (H-6) and 6.48 (H-9) as seen in perisbivalvine A (7), an amide isolated from *Peristrophe bivalis* (L.) Merr. (Acanthaceae) and other natural 3*H*-phenoxazin-3-ones (Thuy et al., 2012a, 2012b, 2013; Bezerra Gomes et al., 2010). The <sup>13</sup>C NMR chemical shifts (Table 1) of

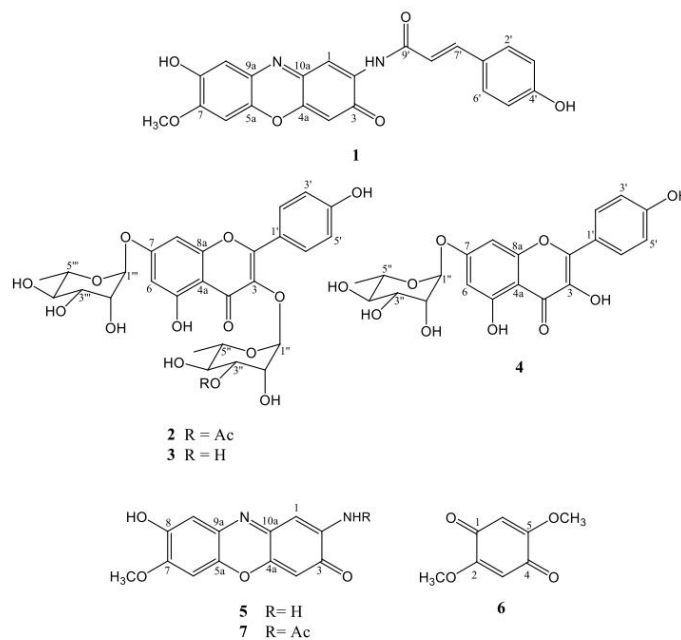


Fig. 1. Structures of compounds 1–6 from *J. spicigera*.

**Table 1**  
 $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) NMR spectroscopic data in DMSO- $d_6$  and  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  for **1**.

DMSO- $d_6$				$\text{CH}_3\text{OH}-d_4$		
no.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	HMBC (H–C)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	HMBC (H–C)
1	114.7	8.44 s	C-2	117.0	8.62 s	C-3, C-4a, C-10a
2	146.3	–	–	131.5	–	–
3	186.5	–	–	172.9	–	–
4	102.7	6.26 s	–	102.2	6.53 s	C-2, C-4a, C-10a, C-3
4a	146.2	–	–	148.6	–	–
5a	146.1	–	–	149.1	–	–
6	107.1	6.86 s	–	107.5	6.94 s	C-5a, C-7, C-8, 9a
7	152.7	–	–	155.5	–	–
8	<sup>a</sup>	–	–	175.9	–	–
9	100.3	6.29 s	C-9a	103.6	6.48 s	C-9a, C-5a, C-7, C-8
9a	132.5	–	–	134.8	–	–
10a	146.1	–	–	133.9	–	–
1'	126.1	–	–	127.7	–	–
2'	129.7	7.53, d (8.5)	C-7', C-4'	131.0	7.51 d (8.6)	C-4'
3'	115.7	6.81, d (8.5)	C-1'	116.8	6.82 d (8.6)	C-1'
4'	159.1	–	–	160.9	–	–
5'	115.7	6.81, d (8.5)	C-1'	116.8	6.80 d (8.6)	C-1'
6'	129.7	7.53, d (8.5)	C-4'	131.0	7.51 d (8.6)	C-4'
7'	140.4	7.48, d (15.6)	C-9'	143.3	7.61 d (15.6)	C-9', C-2', C-6'
8'	119.1	7.10, d (15.6)	C-1'	118.8	6.77 d (15.6)	C-1'
9'	164.2	–	–	167.1	–	–
7-OMe	55.4	3.79 s	C-7	56.4	3.92 s	C-7
NH	–	9.32 bbs	C-1, C-9'	–	–	–

<sup>a</sup> Not detected.

the phenoxazine core were closed to those of **7** except for the signal for C-5a, which in the case of compound **1** was assigned based on the HMBC correlations H-9 and H-6/C-5a. Thuy et al. (2012a; 2012b) assigned the chemical shift of C-5a at  $\delta_{\text{C}}$  130.6 (in  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ), which is inconsistent with an aromatic carbon attached to oxygen. However, many other phenoxazine-type of compounds, including chandrananimycin D and pitucamycin (Bezerria Gomes et al., 2010), venezueline E (Ren et al., 2013), and maroxazinone (Abdelfattah, 2013), the chemical shift magnitude for C-5a is similar to compound **1**. The presence of the *p*-coumaric acid residue was supported by the typical signals of a *p*-disubstituted benzene ring [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  127.7 (C-1'); 7.51 (H-2', H-6')/131.0 (C-2', C-6'); 6.82 (H-3', H-5')/116.8 (C-3', C-5'); and 160.9 (C-4') in  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ] attached to a  $\text{C}_3$  side chain [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  167.1 (C-9'), 6.77 (H-8')/118.8 (C-8'); 7.61 (H-7')/143.3 (C-7')]. The splitting patterns (d,  $J = 15.6$  Hz) of H-7' and H-8' were consistent with the *trans* configuration of the double bond of the *para*-coumaric residue. On the other hand, the presence of the secondary amide at C-2 was ascertained based on the chemical shift of C-9' and the HMBC correlations observed between  $\delta_{\text{H}}$  9.02 (NH)/ $\delta_{\text{C}}$  164.2 (C-9') and 114.7 (C-1) in the experiment registered in DMSO- $d_6$  (Figs. S9–S12). Further analysis of the HMBC experiment registered in  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  showed the correlations between  $\delta_{\text{H}}$  6.94 (1H, s, H-6) and the carbons at  $\delta_{\text{C}}$  56.4 (7-OMe), 134.8 (C-9a), and 175.9 (C-8), thus, indicating that the methoxy group was at C-7 (Figs. S1–S5). This observation was further substantiated by the NOESY correlation H-6/7-OMe. Other relevant correlations are indicated in Table 1. Based on, these considerations compound **1** was characterized as 2-*N*-(*p*-coumaroyl)-3*H*-phenoxazin-3-one (**1**).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Chemical shifts were calculated and compared with the experimental data to corroborate the correct NMR assignments of **1**. The methodology involves a conformational analysis using molecular mechanics, geometry optimization using density functional theory (DFT), and chemical shifts calculations with the GIAO tensors method (Table S1–S3, Fig. S23). The calculated chemical shifts in DMSO- $d_6$  are generally in agreement with the observed data, with a mean absolute error (MAE) of 2.18 (Table S12).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Chemical shifts were calculated and compared with the experimental data to corroborate the correct NMR assignments of **1**. The methodology involves a conformational analysis using molecular mechanics, geometry optimization using density functional theory (DFT),

and chemical shift calculations with the GIAO tensors method (Table S1–S3, Fig. S23). The calculated chemical shifts in DMSO- $d_6$  agree with the observed data, with a mean absolute error (MAE) of 2.18 (Table S12).

Previously Thuy et al. (2012a) proposed that compound **7** might exist as a tautomeric charged species like **7a** in solution (Fig. S24), which could possess a faster rate of interconversion than the NMR time scale. To assess this possibility, a theoretical study of all possible, stable tautomers of **1**, namely **1a-1c** (Fig. S24), was carried out using the same level of the theory mentioned above. In each case, a conformational search of each tautomer was considered. The chemical shifts of **1a-1c** were calculated (Figs. S25–S27). According to Table S5, the calculated chemical shifts for C-2 and C-9 in tautomer **1a** were closer to the experimental values registered in DMSO- $d_6$ . On the other hand, in tautomer **1b**, the calculated chemical shifts for C-1 and C-9 were closer to the experimental value (Table S9). Finally, the calculated chemical shift for C-8 in tautomer **1c** (Table S11) was identical to the experimental value observed for C-8 in  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ . Together, it seems to support Thuy's proposal (2012a).

Compound **2** was isolated as an amorphous white solid. Its molecular formula was deduced as  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$  based on the pseudomolecular ion observed at  $m/z$  619.1668  $[\text{M}-\text{H}]^-$  in the HRESIMS. Its UV and NMR (Table 2), (Figs. S13–S22) data were close to those of kaempferitrin (**3**). However, there were two significant differences in the NMR spectra: (i) the chemical shifts of the rhamnose moiety attached to C-3 were different [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  5.47 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-1''/102.9 (C-1'')); 4.38 (1H, dd,  $J = 3.2, 1.8$  Hz, H-2'')/69.7 (C-2''); 5.00 (1H, dd,  $J = 9.8, 3.2$  Hz, H-3'')/75.3 (C-3''), 3.40–3.65 (m, H-4'' and H-5'')/70.38 (C-4''), 72.22 (C-5''); 0.97 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-6'')/17.7 (C-6''); and (ii) there were observed signals for an acetic acid residue [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2.14 (3H, s, OAc-3'')/21.07 (OAc-3''),  $\delta_{\text{C}}$  172.7 (OAc-3'')]. The splitting pattern for the signal at  $\delta_{\text{H}}$  5.00 (1H, dd,  $J = 9.8, 3.2$  Hz, H-3''), the COSY (Fig. S17), and HMBC (Fig. S16) correlations located the acetyl group at C-3''.

## 2.2. Enzymatic evaluations

Compounds **1-3**, **5** and **6** isolated from the active EtOAc fraction ( $\text{IC}_{50} = 91.8 \pm 4.6$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), were evaluated for their inhibitory activity against PTP1B (Table 3) using a spectrophotometric enzymatic



**Table 2**  
<sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz) NMR spectroscopic data in CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub> for 2.

no.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC (H–C)
2	159.7	–	–
3	136.2	–	–
4	179.7	–	–
5	158.1	–	–
6	100.6	6.46, d (2.2)	C-4a, C-5, C-7, C-8
7	163.5	–	–
8	95.6	6.72, d (2.2)	C-4a, C-6, C-7, C-8a
4a	107.5	–	–
8a	163.0	–	–
1'	122.3	–	–
2'	132.0	7.82, d (8.8)	C-2, C-4', C-6'
3'	116.7	6.94, d (8.8)	C-1', C-4', C-5'
4'	161.8	–	–
5'	116.7	6.94, d (8.8)	C-1', C-3', C-4'
6'	132.0	7.82, d (8.8)	C-2, C-2', C-4'
1''	102.9	5.47, d (1.8)	C-5'', C-3''
2''	69.7	4.38, dd (3.2, 1.8)	C-4''
3''	75.3	5.00, dd (9.8, 3.2)	C-4''
4''	70.4	3.65–3.40 m	–
5''	72.2	3.65–3.40 m	–
6''	17.7	0.97, d (6.1)	C-4'', C-5''
1'''	99.9	5.56, d (1.8)	C-7, C-2'', C-5'''
2'''	71.7	4.02, dd (3.4, 1.8)	C-4''', C-3'''
3'''	72.1	3.83, dd (9.5, 3.5)	–
4'''	73.6	3.65–3.40 m	–
5'''	71.3	3.65–3.40 m	–
6'''	18.1	1.26, d (6.1)	C-4''', C-5'''
OAc-3''	21.1	2.14, s	OAc-3''
OAc-3'''	172.7	–	–

**Table 3**  
 Values of IC<sub>50</sub> of isolated compounds.

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2a</sup>
1	159.1 ± 0.02	0.9950
2	306.7 ± 0.20	0.9990
3	306.7 ± 0.20	0.9990
5	106.6 ± 0.01	0.9990
6	455.5 ± 0.5	0.9980
Ursolic acid	21.8 ± 0.4	0.9960

<sup>a</sup> r<sup>2</sup> = adjustment by nonlinear regression of inhibition curve.

assay (Rangel-Grimaldo et al., 2020). The most active compounds were 1 and 5, with IC<sub>50</sub> values of 159.1 ± 0.02 μM and 106.6 ± 0.01 μM, respectively. None of the compounds were more active than the EtOAc fraction, suggesting a synergistic effect. The positive control was ursolic acid (Table 3). The curves obtained for each molecule are presented in the Supplementary data (Fig. S28). Kaempferitrin (3) was previously evaluated (Zhao et al., 2016) but the authors did not report the IC<sub>50</sub> value.

The observed inhibition of PTP1B agrees with the findings of Ortiz-Andrade et al. (2012) who demonstrated that an ethanol extract of *J. spicigera* stimulated glucose uptake in insulin-resistant human and murine adipocytes in a concentration dependent manner. Furthermore, the extract induced glucose lowering effects during a glucose tolerance test in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. Resistance to the hormones insulin and leptin are hallmarks of both type 2 diabetes and obesity. Drugs that can ameliorate this resistance should be effective in treating type 2 diabetes and possibly obesity, since PTP1B functions as a negative regulator of insulin and leptin signal transduction (Kumar et al., 2020; Zhao et al., 2018).

### 2.3. Kinetic mechanism of inhibition

Kinetic analysis of compounds 1 and 6 (obtained in reasonable amounts) was performed to determine the type of enzymatic inhibition. Compound 5, the most active, was too unstable for this type of analysis.

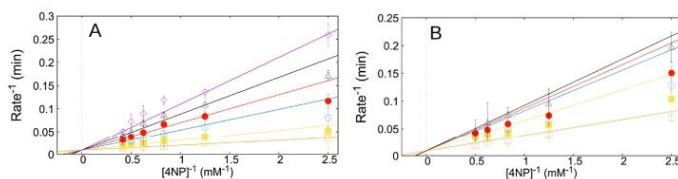
The hydrolytic activity of PTP1B against 4-NP was measured as variable concentrations of this artificial substrate in the absence or presence of compounds 1 and 6 at increasing concentrations. Then the data were fitted to several models for total linear inhibition, as described in the Experimental section. The best inhibition model for both compounds was parabolic competitive inhibition (Fig. 2). The fit to the linear competitive equation did not correctly describe the inhibition at high inhibitor concentrations (Fig. S29). This mechanism of inhibition implies a mutually exclusive binding of the inhibitor, and the substrate, allows for two molecules of the inhibitor to bind to the enzyme (Scheme 1, Eq. (1)). However, the binding of the first inhibitor molecule does not have to reinforce the binding of the second molecule, i.e., this kinetic model neither does imply cooperative inhibitor binding nor does it indicate the order of addition; it just requires enzyme-inhibitor complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry. The K<sub>i</sub> values for the first and second addition of an inhibitor molecule to the protein active site, the size of reduced χ<sup>2</sup>, residuals distribution, and the uncertainty in the parameter support the parabolic competitive inhibition of compounds 1 and 6 (Table 4). So far, no PTP1B with this kinetic behavior has been reported, probably because the data is usually processed using the classic Lineweaver–Burk method. The docking analysis below is consistent with our findings. According to a recent review, natural products might act as non-competitive as the flavonoid derivative licoagron from *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) or cyanidin-3-arabinoside, isolated from *Vaccinium gaultheriifolium* (Griff.) Hook. f. ex C.B. Clarke (Ericaceae) fruits, which is a mixed type of inhibitor. Celastrol, a terpenoid, is a non-competitive inhibitor, and others, such as 2α-hydroxy-7-oxo-pimara-8(9),15-diene, are competitive types (Singh et al., 2022).

### 2.4. Docking analysis

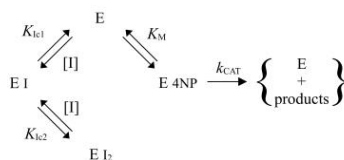
PTP1B is a protein of 435 amino acids. There are 288 structures deposited in the Protein Data Bank (PDB). Most of these structures have been resolved up to position 300, regarded as its structured zone. It has been proposed that PTP1B has an unstructured region corresponding to residues 300 to 435. AlphaFold is an AI system developed by DeepMind that predicts three-dimensional protein structures from its amino acid sequence; using this program, PTP1B<sub>1–400</sub> was well resolved up to position 300 (Fig. S30). Using the model PTP1B<sub>1–400</sub> generated by AlphaFold, an MD simulation was performed to predict how the PTP1B<sub>300–400</sub> region is molded in solution. Fig. 3 shows the results of the MD simulation. The RMSD of the system indicates that from 40 ns, the structure stabilizes (Fig. 3A). The RMSF (Fig. 3B) parameter shows that the unstructured region of the protein is the most flexible throughout the MD simulation (amino acids 300–400). Fig. 3C offers the structural model before and after 50 ns of MD simulation, where we can see that the unstructured region (purple) is folding to the structured part. This final model was used for the docking analysis of compounds 1–3, 5, and 6.

Docking of compounds 1–3, 5, and 6 to PTP1B<sub>1–400</sub> (Fig. 4, Table 5) predicted a good affinity of these compounds for the PTP1B active site, and the order of binding affinity predicted from the *in-silico* K<sub>i</sub> estimates is in reasonable agreement with the experimental IC<sub>50</sub> values (Table 3). The theoretical K<sub>i</sub> have the following order of affinity 1 > 5 > 2 > 3 > 6. Visual inspection of the interactions shows that compounds 2 and 5 exhibit hydrogen bonding interactions.

According to the kinetic inhibition setting (Table 4), it is proposed that two inhibitor molecules may be interacting at the active site. A docking study with a second molecule of compounds 1 and 6 was performed (Fig. 5, Table 5), and the results indicated that the binding of a second ligand is sterically possible. The 1:2 complex was also supported by the second docking analysis, which also predicted an important contribution of π-stacking interactions to the stability of these 1:2 complexes.



**Fig. 2.** Inhibition patterns of PTP1B fitted to a global total competitive parabolic inhibition (Eq. (1)). The activity was assayed as a function of 4-NP concentration and in the absence (□) or presence of increasing concentrations of inhibitor. In (A) compound 1 was added at concentrations of 0.08 (●), 0.10 (○), 0.12 (△), and 0.14 (◊) mM. In (B) compound 6 was added at concentrations of 0.4 (●), 0.6 (○), 0.65 (●), and 0.7 (△) mM. The error bars indicate  $\pm$  s.d. and the lines were drawn from Eq. (1) using the parameter values in Table 3.



**Scheme 1.** Equilibria for the parabolic competitive total inhibition.

**Table 4**  
Kinetic parameter estimates for the inhibition patterns shown in Fig. 2 fitted to equation (1).

Compound	Parameter	Estimate	A.S.E. <sup>a</sup>	C. V. <sup>b</sup> (%)
1	$V_M$	113.9	$\pm 8.7$	7.6
	reduced $\chi^2$	5.207		11.2
	dof. <sup>3</sup>	166		22.4
	$K_M$	1.21	$\pm 0.10$	11.2
6	$K_{I1}$	0.70	$\pm 0.16$	22.4
	$K_{I2}$	0.73	$\pm 0.09$	12.5
	$V_M$	113.5	$\pm 14.2$	12.5
	reduced $\chi^2$	2.809		18.2
	dof. <sup>3</sup>	86		20.9
	$K_M$	3.2	$\pm 0.59$	18.2
	$K_{I1}$	0.55	$\pm 0.12$	20.9
	$K_{I2}$	0.90	$\pm 0.21$	23.6

<sup>a</sup> A.S.E. = Asymptotic Standard Error.

<sup>b</sup> C.V. = coefficient of variation; dof = degree of freedom.

### 2.5. Drug likeness, pharmacokinetics, and medicinal chemistry friendliness of 1

The drug-likeness, pharmacokinetics, and friendliness medicinal chemistry properties of compound 1 were analyzed using the SwissADME web software (Daina et al., 2017). The physicochemical properties (lipophilicity, size, polarity, solubility, flexibility, and saturation) of 1 are summarized in Figs. S32 and S33. Most red geometric figures in the bioavailability radar plot fall in the pink area, but the unsaturation number is out of acceptable parameters. The program projected that 1 has a good drug-likeness score (0.55), showing no violation of Lipinski et al. (1996), Egan et al. (2000), Veber et al. (2002), and Muegge et al. (2001) rules which is acceptable for compounds becoming commercial drugs. The pharmacokinetic predictions showed that 1 has a good chance of passively permeating the gastrointestinal (G.I.) barrier but does not permeate the blood-brain barrier (BBB). These results were also graphically symbolized using the BOILED-Egg model (Fig. S33), where the compound fell inside the white ellipse.

In addition, the prediction revealed that the compound is not a glycoprotein (P-gp) substrate, which actively pumps many drugs out of cells but could behave as a CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, and CYP3A4) enzyme inhibitor (Fig. S32). The latter action is responsible for drug-drug interactions, leading to undesirable adverse effects.

Regarding the medicinal chemistry analysis, one lead-like criterion is violated, the molecular weight higher than 350 (Teague et al., 1999).

The outcome of the pan assay interference structures (PAINS) model does not show alert, but according to the Brenk rules, there are two alerts, the presence of a Michael acceptor and a polycyclic aromatic system (Brenk et al., 2008; Baell and Holloway, 2010). The synthetic accessibility is acceptable. Thus, we repeat the calculation with compound 7 (Figs. S34 and S35), present in *P. bivalvis*. This structure showed excellent pharmacokinetic and lead- and drug-likeness profiles.

The mutagenic, tumorigenic, irritant, and reproductive toxicity risks of 1 were measured employing the Osiris program. The toxicity risks are estimated with color code. In this case, the potential toxic risks were displayed in green, indicating potential safety in vivo (Fig. S36).

### 2.6. Method validation

*J. spicigera* is a widely used herb for treating different ailments in Mexico. Therefore, a pharmacopeic UHPLC analytic method, inexistent in the Mexican Herbal Pharmacopeia, was developed and validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (ICH, 2005). The system's linearity was tested in the concentration range between 5 and 100  $\mu\text{g/mL}$  and was found to be linear in the concentration range used. The linear regression equations were found to be  $y = 2194.96x - 2100.97$  ( $R^2 = 0.999$ ) for UV detection and  $y = 453.10x - 313.31$  ( $R^2 = 0.992$ ) for ESI<sup>-</sup> detection.

LOD values were 2.03 and 1.83  $\mu\text{g/mL}$  for the UV and ESI<sup>-</sup> detection, respectively, whereas the LOQ values were 6.21 and 5.56  $\mu\text{g/mL}$  for the UV and ESI<sup>-</sup> detection, respectively. The linearity of the method was tested by recovery assay. The linear regression equations for 3 were found to be  $y = 1.0042x - 0.0656$  ( $R^2 = 0.9995$ ) for UV detection and  $y = 1.0028x + 0.038$  ( $R^2 = 0.9993$ ) for ESI<sup>-</sup> detection. The recovery ranges for 3 were expressed as a percentage of the expected concentration and were found to be 97.7–102.3%. The CV value for accuracy was less than 1.25%.

The reproducibility and repeatability of the analytical method were evaluated in terms of the intermediate precision by analyzing six replicates of the stock solution (50  $\mu\text{g/mL}$ ) on two different days. The relative SD (RSD;  $n = 6$ ) was calculated for each sample evaluated. The results indicated that their chromatographic pattern was similar, showing the presence of the primary peak in each case. The CV values for precision were less than 2.4%.

Subsequently, the validated UHPLC-MS method was applied for quantitative analysis (Fig. S37). The content of kaempferitrin (3) in FO1 were  $14.7 \pm 1.01$  mg/g and  $10.8 \pm 0.28$  mg/g, and in FO2 were  $16.9 \pm 0.99$  mg/g and  $12.1 \pm 0.38$  mg/g, for ESI<sup>-</sup> and UV detection in both cases.

### 3. Conclusions

This investigation has shown that the traditional preparation from the aerial parts of *J. spicigera* biosynthesized specialized metabolites that inhibited the activity of PTP1B, a key regulator of the insulin and leptin signaling cascades. Among the isolates predominated two undescribed

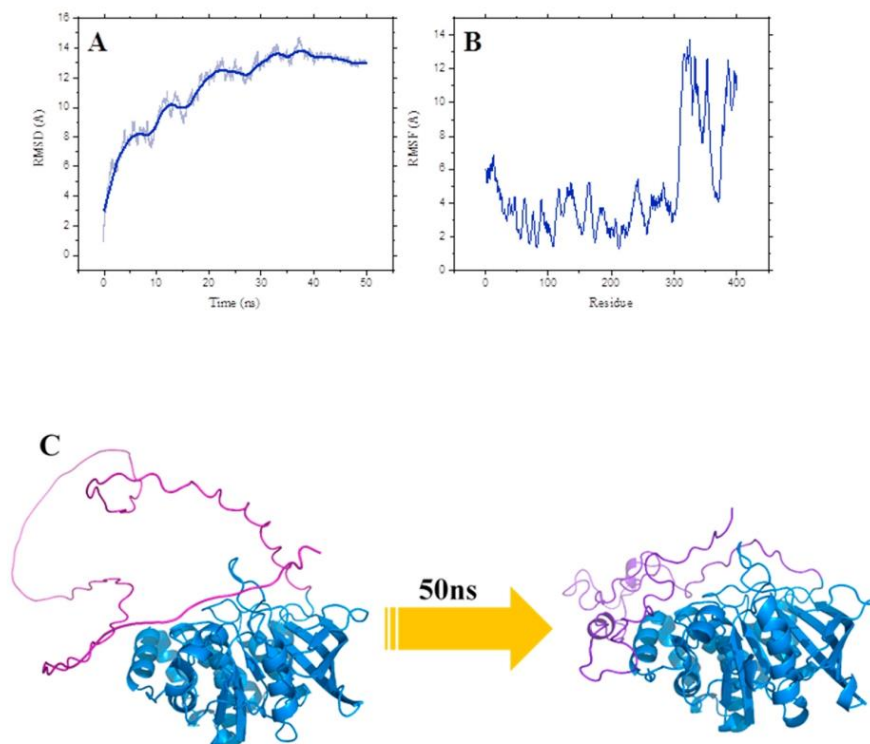


Fig. 3. Analysis of 50 ns of molecular dynamics simulation. A) The RMSD & Time plot, B) The RMSF & Residues plot, and C) Structural model at the beginning and after 50 ns of the molecular dynamics of the PTP1B<sub>1-400</sub>.

metabolites, 2-*N*-(*p*-coumaroyl)-3*H*-phenoxazin-3-one (**1**), and 3'-*O*-acetyl-kaempferitrin (**2**), along with 2,5-dimethoxy-*p*-benzoquinone (**6**) and kaempferitrin (**3**). Since none of the isolates were more active than the EtOAc fraction of the infusion, the overall enzymatic inhibition of the extract might be due to a synergistic effect. Kinetic analysis of inhibitors **1** and **6** indicated that they behaved as parabolic competitive inhibitors and bound to the enzyme forming complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry. Docking studies predicted the excellent affinity of these compounds by the catalytic site of PTP1B<sub>1-400</sub> and that the binding of a second ligand is sterically possible. The 1:2 complex was also supported by the second docking analysis using the same enzyme, which predicted an essential contribution of  $\pi$ -stacking interactions to the stability of these 1:2 complexes. Compound **1** showed reasonable pharmacokinetic, lead- and drug-likeness properties and toxicological profiles, according to SwissADME and Osiris Property Explorer predictions, respectively. Inhibition of PTP1B by the extracts and compounds **1-6** agrees with previous *in vivo* antidiabetic studies on *J. spicigera* preparations, and they might be the antidiabetic active principles. It is important to point out that this is the first report of the presence of phenoxazines in the genus *Justicia*, although *Peristrophe bivalvis*, which belongs to the same family, biosynthesizes this type of substance. Interestingly both species are used as vegetal dyeing agents, and the behavior in solution of **1** and **5** suggests that they are responsible for the tinting properties of *J. spicigera*. Finally, to contribute to the rational use of *J. spicigera* as an antidiabetic herbal drug, a pharmacopeic UHPLC-MS method was developed and validated to standardize the raw material so commonly used in Mexico.

## 4. Experimental

### 4.1. General experimental procedures

UV measurements were done using a PerkinElmer Lambda 2 UV-vis Spectrophotometer. A PerkinElmer FTIR/FIR Spectrum 400 was used to record the InfraRed spectra. NMR spectra were acquired on a Varian VNMRs 400 MHz (9.4 T) apparatus and were analyzed with the MestReNova (v12.0.2) software. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm with reference to the residual solvent signals (DMSO-*d*<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>OD or CDCl<sub>3</sub>). Structural assignments were based on <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC spectra. Analytical TLC was performed on aluminum plates precoated with silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). After development with an appropriate solvent system, the plates were evaluated under UV light ( $\lambda = 254$  and 365 nm) and then sprayed with 4-anisaldehyde reagent (0.5 mL of 4-anisaldehyde, 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mL glacial AcOH and 85 mL of CH<sub>3</sub>OH). Column chromatography was carried out using silica gel 60 (230–400 mesh), or Sephadex LH-20.

### 4.2. Plant material

The aerial parts of *Justicia spicigera* Schldl. (Acanthaceae) were collected from San Pedro Jicayan, Jamiltepec, Oaxaca (GPS 16°27' N/ 98°00' W) in March 2017 and identified by Dr. Rafael Torres Colín from the Instituto de Biología, UNAM. A voucher specimen (1,465,410) is stored at the National Herbarium of Mexico (MEXU); this batch was used



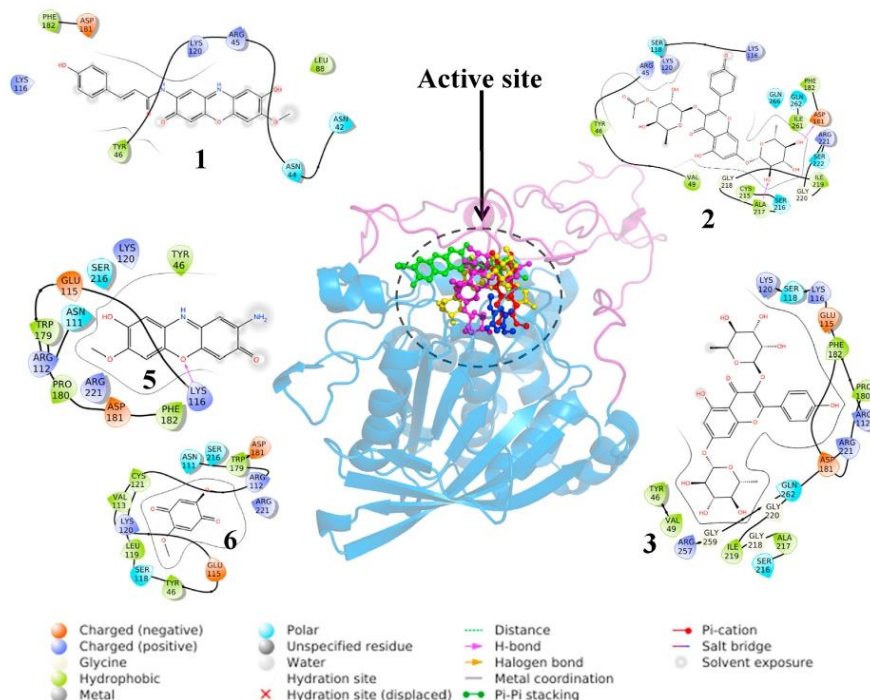


Fig. 4. Analysis of the PTP1B-compounds complex with 1–3, 5 and 6. In the center the PTP1B is shown in cartoons with compounds (1; green sticks), (2; purple sticks), (3; yellow sticks), (5; red sticks), and (6; blue sticks). On the periphery are shown the analysis of the interactions with the residues at 4 Å. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 5  
Theoretical binding properties of PTP1B-Compounds 1–3, 5 and 6 complexes.

Compounds	$K_i$ (mM)	EB (kcal/ mol)	Interacting residues
1	104	−2.03	Asn42, Asn44, Arg45, Tyr46, Lys116, Lys120, Asp181, Phe182
1-bis	69	−5.68	Arg45, Lys120, Ser118, Lys116
2	174	−5.11	Arg45, Tyr46, Val49, Lys116, Ser118, Lys120, Asp181, Phe182, Cys215, Ser216, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Ser222, Arg221, Ile261, Gln262, Gln266
3	202	−5.02	Tyr46, Arg112, Glu115, Lys116, Ser118, Lys120, Val49, Pro180, Asp181, Phe182, Ser216, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Arg221, Arg257, Gly259, Gln262
5	111	−4.76	Tyr46, Asn111, Arg112, Glu115, Lys116, Lys120, Trp179, Pro180, Asp181, Phe182, Ser216, Arg221
6	761	−4.17	Tyr46, Asn111, Arg112, Val113, Glu115, Ser118, Leu119, Lys120, Cys121, Ser216, Arg221, Trp179, Asp181
6-bis	1380	−3.80	Tyr46, Glu115, Lys116, Gly117, Ser118, Lys120, Asp181

Bis = refers to the second docking.

to prepare FO1 and to isolate all compounds. A second commercial batch of the aerial parts of *J. spicigera* was purchased at the market “La Bola” in Mexico City in December 2018 and was used to prepare the organic fraction FO2 for quantifying compound 3.

#### 4.3. Extraction and isolation

The air-dried and powdered aerial parts (5 g) of *J. spicigera* were extracted by infusion with 500 mL of distilled hot water for 30 min. Subsequently, this extract was filtered and successively extracted with EtOAc (500 mL x 3). The organic fractions were combined, filtered, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated *in vacuo* to give a dark purple residue (41.1 mg, 83.6% of inhibition at 1000 ppm). This process was repeated to collect 3.7 g of FO1 (using a total of 450.0 g of plant, and 45 L of water), which were subjected to a silica gel column chromatography using gradient elution with hexane/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH (90:10 → 0:100 → 80:20). This separation afforded 38 fractions (F1–F38). Fraction F4 was repeatedly washed with MeOH to obtain 20.0 mg of 6. Fraction F8 was chromatographed on a Sephadex LH-20 column (MeOH) to yield 15 fractions (F8-1–F8-15). From fractions F8-7 and F8-13 were obtained 5 (5.1 mg) and 1 (16.0 mg), respectively. Fraction F23 was chromatographed on a Sephadex LH-20 column (acetone/MeOH, 95:5) to afford 8 fractions (F23-1–F23-8). Subfraction F23-3 was purified on a Sephadex LH-20 column (MeOH) to yield 4 (5.2 mg). Fraction F29 was separated by Sephadex LH-20 eluting with Acetone/MeOH (95:5) to give 2 (15.3 mg). Fraction F31 was separated by silica gel using gradient elution with  $\text{CHCl}_3$ /EtOAc/MeOH to afford 85.0 mg of 3.

FO2 was prepared as described above for FO1, using 5.1 g of the commercial material and 500 mL of water. After filtration and concentration *in vacuo*, 31.9 mg of FO2 were obtained. Both extract presented the same UHPLC profile.

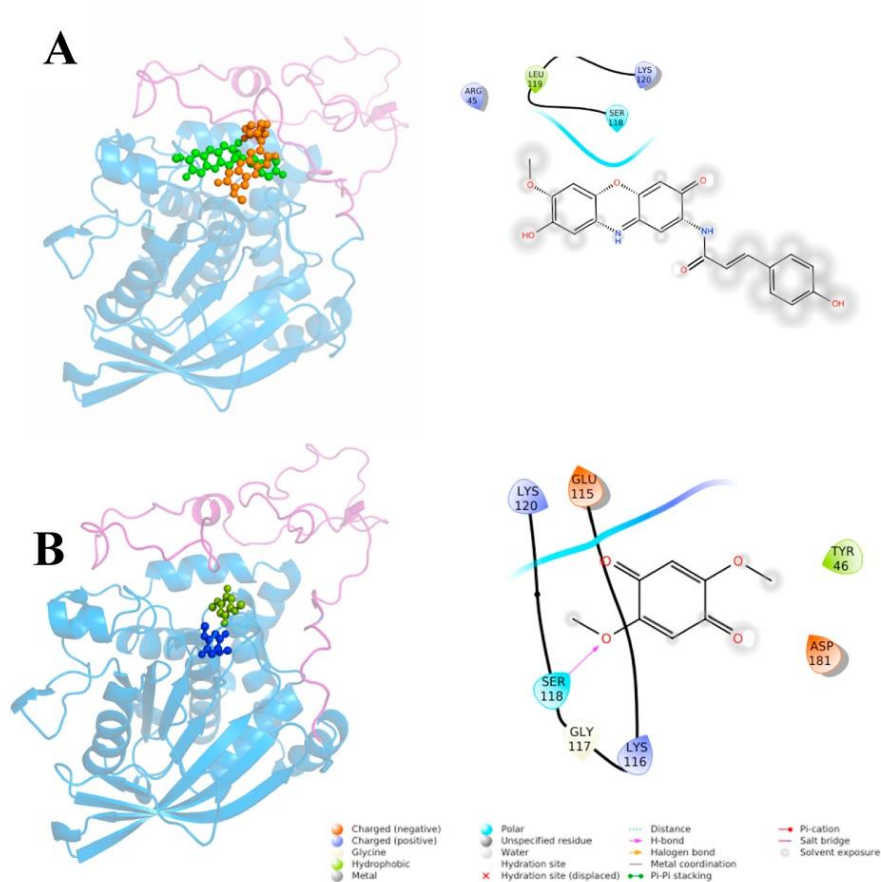


Fig. 5. Analysis of the PTP1B-compounds complex with a second ligand molecule. A) PTP1B1 complex; B) PTP1B-6 complex.

#### 4.3.1. 2-N-(*p*-coumaroyl)-3*h*-phenoxazin-3-one (1)

Blue amorphous solid; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 224 (3.87), 291 (3.63), 601 (3.90) nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3286, 2918, 2350, 2850, 1501, 1127  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  (400 MHz, methanol- $d_4$  and DMSO- $d_6$ ) and  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, methanol- $d_4$  and DMSO- $d_6$ ) NMR spectra, see Table 1; HRESIMS  $m/z$  405.1090  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6$ , 405.1081).

#### 4.3.2. 3'-*O*-acetyl-kaempferitrin (2)

Amorphous white solid;  $[\alpha]_D^{20} -200^\circ$  (c 0.5, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (4.49), 264 (4.29), 341 (4.14) nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3368, 2930, 1715, 1655, 1595, 1175  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, see Table 2; HRESIMS  $m/z$  619.1668  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$ , 619.1685).

#### 4.4. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition assay

A spectrophotometric method was used to detect the inhibitory activity of extracts and compounds on PTP1B (Rangel-Grimaldo et al., 2020). The analyses were carried out by triplicated; the test material and positive control (ursolic acid) were dissolved in DMSO or buffer solution. The test materials (mM or  $\mu\text{M}$ ), enzyme (0.022 nM) and buffer

solution [Tris-HCl 50 mM, pH = 6.8] and 0.125 mM of 4-nitrophenyl phosphate (4-NP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were incubated at room temperature during 15 min as previously described. At the end of the incubation time, the reaction was terminated adding 5  $\mu\text{L}$  of NaOH (10 M); then, the absorbance was measured at 405 nm ( $t_{15}$ ). The inhibitory activity was determined as percentage in comparison to the blank (Tris) according to the following equation:

$$\% \text{Inhibition}_{\text{PTP1B}} = \left( 1 - \frac{A_{405(a)}}{A_{405(b)}} \right) \times 100\%$$

where  $A_{405(a)}$  is the  $\Delta A$  of the sample ( $A_{t15} - A_{t0}$ );  $A_{405(b)}$  is the  $\Delta A$  of the blank obtained in the same manner than the sample. With the data obtained, the enzyme inhibition curve was made, for which the average percentage of inhibition was plotted as a function of the inhibitor concentration. To calculate the  $\text{IC}_{50}$ , a non-linear regression was performed, using Origin 8.0 software (Origin Labs, MA, USA).

##### 4.4.1. Kinetic analysis

The conditions for preparation of reagents (enzyme and substrate), incubation and analysis of results was the same as those described in the

previous sections (Rangel-Grimaldo et al., 2020; Jiménez-Arreola et al., 2020; Díaz-Rojas et al., 2021). Additional steps in the methodology are described below.

To characterize the type of inhibition exerted by 1 and 6 on PTP1B, the hydrolysis of 4-NP at sub-saturating state and increasing concentrations of each compound was measured. An enzyme saturation curve was made with a 4-NP stock solution (10 mM); then a series of curves with variable 4-NP concentrations and at least five fixed concentrations of the inhibitors were built, considering the  $IC_{50}$  value as the midpoint, the type of inhibition of 1 and 6 was estimated; each point of the curves were obtained by triplicated. The concentration of compound giving 50% inhibition of activity was interpolated from the results, by fitting to a general inhibition model. The resulting set of activities was fitted globally using the non-linear regression algorithm of Levenberg-Marquardt as implemented in GNUplot (Williams and Kelley, 2011). Each set was fitted to the kinetic equations for linear competitive, linear uncompetitive, linear non-competitive (classic), linear mixed type, parabolic competitive, parabolic uncompetitive and parabolic non-competitive inhibitions mechanism. The best fit was judged by the value of reduced chi squared ( $\chi^2$ ), residuals distribution, and the uncertainty in the parameter estimates. The best description of the inhibition data for compounds 1 and 6 was obtained with Eq. (1) as depicted in Scheme 1, where  $V_M$  and  $K_M$  are the maximum velocity and the Michaelis constant for the substrate 4-NP, respectively, while  $K_{i1}$  and  $K_{i2}$  are the inhibition constants for the linear and quadratic inhibition components for the tested compound.

$$v_0 = \frac{V_M [4NP]}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_{i1}} + \frac{[I]^2}{K_{i2}} \right) + [4NP]} \quad (\text{Eq. 1})$$

#### 4.5. Structural model of PTP1B<sub>1-400</sub>

Structural model of the human PTP1B<sub>1-400</sub> protein was obtained from AlphaFold Protein Structure Database developed by DeepMind and EMBL-EBI (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). The UniProt code P18031 corresponds to the PTPN1 gene, which codes for human PTP1B is among the proteins housed in the database predicted by AlphaFold. The pdb file was downloaded from the following link: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18031> (Jumper et al., 2021). The coordinates of this model were prepared to perform a Molecular Dynamics (MD) simulation using the LEAP module from AmberTools2021. The structure was submitted to the following procedure: hydrogens was added using the LEAP module with the leaprc.protein.ff19SB force field;  $K^+$  counter ions were also included to neutralize the system. The protein was solvated in an octahedral box of explicit TIP3P model water molecules localizing the box limits at 12 Å from the protein surface. 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 Å) for treating long-range electrostatic interactions with a 10 Å cutoff for computing direct interactions. The SHAKE algorithm was used to satisfy bond constraints, allowing the employment of a two femtosecond (fs) time step for the integration of Newton's equations as recommended in the Amber package. All calculations were made using graphics processing units (GPUs) accelerated MD engine in AMBER (pmemd.cuda), a program package that runs entirely on CUDA-enabled GPUs (Case et al., 2005, 2021; Salomon-Ferrer et al., 2013). The protocol consisted of performing a minimization of the initial structure, followed by 50 pico seconds (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 nano seconds (ns). Frames were saved at 10 ps intervals for subsequent analysis. All analyzes were done using CPPTRAJ (Ren et al., 2013; Roe and Cheatham, 2013). The calculations of root mean square deviations (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF) were made,

considering the C, CA, and N. The charts were built with OriginPro 9.1, and the trends were adjusted with the function processing smooth (method lowest span).

#### 4.6. Docking

Docking analysis was done using the structural model of the PTP1B<sub>1-400</sub> obtained after the MD simulation. Structures 1–3, 5 and 6 were constructed and minimized using AVOGADRO software (Hanwell et al., 2012). AutoDockTools 1.5.4 was used to prepare the pdb files of both protein and compounds. Polar hydrogen atoms and the Kollman united-atom partial charges were added to the protein structures. In contrast, Gasteiger-Marsili charges and rotatable groups were automatically assigned to the structures of the ligands. We use Autodock Vina to do the docking, covering the entire enzyme (Forli et al., 2016). The grid box size was 126 Å × 126 Å × 126 Å in the x, y, and z dimensions and central coordinates of 54.94, 68.66, and 63.45 for x, y, z, respectively; with exhaustiveness of 8. The visualization of the best conformational states was achieved with PyMOL version 2.4.0 and Maestro version 5.3.156 (De Lano, 2004).

#### 4.7. Drug-likeness analysis of bioactive compounds using Swiss ADME and osiris tools

SwissADME online server (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina et al., 2017) was used to predict physicochemical, lipophilicity, pharmacokinetics, water solubility, druglikeness and medicinal chemistry properties of the natural product 1 and 7. In addition, the bioavailability radar was plotted to find out if the predicted properties fall entirely in the pink colored zone; the optimal range of each property as plotted: lipophilicity (LIPO):  $-0.7 < XLOGP_3 < +5.0$ ; SIZE: 150 g/mol < MW < 500 g/mol; POLAR (polarity): 20 Å<sup>2</sup> < topological surface area (TPSA) < 130 Å<sup>2</sup>; INSOLU (insolubility):  $0 < \log S$  (ESOL) < 6; INSATU (unsaturation):  $0.25 < \text{fraction of Csp}^3 < 1$ ; and FLEX (flexibility): 0 < number of rotatable bonds < 9. The BOILED-Egg construction model was also obtained to assess the gastrointestinal absorption and brain penetration of 1 and 7. The medicinal chemistry features such as PAINS (pan-assay interference or promiscuous substances), Brenk alert (undesirable structural fragments), lead-likeness and synthetic accessibility were investigated. Such molecule may be achieved as druglikeness. Osiris Property Explorer free software (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) was used to predict mutagenicity, tumorigenicity, and irritative and reproductive effects of the bioactive compounds.

#### 4.8. UHPLC-MS analysis and method validation

##### 4.8.1. Standards, chemicals, and samples

Kaempferitrin (3) was used as reference compound and was isolated from the species *J. spicigera*. The purity and identity of the compound were confirmed by chromatographic analysis (TLC, HPLC) and by spectral means comparison (NMR, ESI-MS) with published spectral data (Aragao et al., 1990).

The stock solution of kaempferitrin (3) was prepared at a final concentration of 1 mg/mL in water. The working standard solutions of 3 ranging from 5 to 100 µg/mL were prepared by diluting standard solution in water. Sample solutions of each extract (50 µg/mL) were prepared following the same procedure as the stock standards solutions. The organic fractions FO1 and FO2 of *J. spicigera* were used to assess the method and were prepared at a concentration of 1 mg/mL in acetonitrile-water (50:50). Before analysis, all solutions were filtered using 0.20 µm GHP membranes.

##### 4.8.2. Ultra-high performance liquid chromatography photodiode array-mass spectrometry analysis

UHPLC analysis was performed on a Waters Acquity UPLC H-Class



system (Waters Corp.), including quaternary solvent manager, sampler manager, column heater, and photodiode array detector (PDA) interfaced with an SQD2 single mass spectrometer detector with an electrospray ion source. MassLynk software version 4.1 was used to control the UPLC-ESI-MS system and for data acquisition and processing. An Acquity UPLC BEH C18 column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm) equipped with a Acquity UPLC BEH C18 guard column (Vanguard 2.1  $\times$  5.0 mm) was used for the UHPLC analysis. The column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B), at a flow rate of 0.3 mL/min. The following linear gradient was used: 0 min, 15% B in the next 10 min to 20% B, in the next 2 min to 30% B, and, finally, in the next 1 min to 100% B. The total run time for the analysis was 14.5 min and the injection volume was 3  $\mu\text{L}$ . The detection wavelength was 285 nm. For the identification of **3**, each sample was analyzed with the electrospray ion source operating in both positive (ESI<sup>+</sup>) and negative (ESI<sup>-</sup>) ionization modes. The following MS parameters for ESI<sup>+</sup> were used: 30 V spray and 3.0 kV capillary voltages; 350 °C capillary temperature, and 650 L/h of source gas flow. For the ESI<sup>-</sup> mode, spray and capillary voltages were respectively 30 V and 2.5 kV; capillary temperature was 350 °C, and source gas flow of 650 L/h. MS spectra were obtained within a mass range of  $m/z$  100–1000 using nitrogen as the collision gas.

#### 4.8.3. Method validation

The proposed UHPLC-ESI-MS method for quantitative analysis was validated based on linearity, LOD, LOQ, intra-day and inter-day precisions, and accuracy. Compound **3** was accurately weighed and dissolved in water to prepare stock solution at a final concentration of 1 mg/mL. Six working solutions in the range of 5–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were prepared from serial dilutions from the stock solution. Each concentration was prepared in sextuplicate. The linearity was assessed estimating the slope, y-intercept, and coefficient of determination ( $R^2$ ) using the least-squares method. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of kaempferitrin (**3**) were estimated at signal-to-noise ratios (S/N) of 3 and 10, respectively. The precision of the method was analyzed preparing six identical replicates for **3** on two different days and by two different analysts. Variations of the peak area were taken as the measures of precision and are expressed as relative standard deviations (RSDs).

Finally, method accuracy was tested by recovery experiments, assaying three known amounts of **3** (10, 50, and 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The mean percentage recovery for **3** was found to be between 98 and 102% by means of Fisher's F-test.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

No data was used for the research described in the article.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN-217320) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, CY011226) awarded to R.M. The authors recognize the valuable support of Nayeli Lopez Balbiaux, Rosa Isela del Villar (NMR spectra), Marisela Gutiérrez Franco (UV and IR spectra), Jessica Amacosta Castillo (MS spectra) from USAII-Facultad de Química UNAM for recording spectra.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113410>.

#### References

- Abdelfattah, M.S., 2013. A new bioactive aminophenoxazinone alkaloid from a marine-derived actinomycete. *Nat. Prod. Res.* 27, 2126–2131. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2096607>.
- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argüez, V., Juárez-Vázquez, M.D.C., Chávez, M., Carranza-Alvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carrancá, A., 2012. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol.* 141, 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.036>.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>.
- Ángeles-López, G.E., González-Trujano, M.E., Rodríguez, R., Déciga-Campos, M., Brindis, F., Ventura-Martínez, R., 2019. Gastrointestinal activity of *Justicia spicigera* Schltld. in experimental models. *Nat. Prod. Res.* 35, 1847–1851. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1637873>.
- Aragao, P.C. de A., de Toledo, J.B., Morais, A.A., Filho, R.B., 1990. Substâncias Naturais Isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Quim. Nova* 13, 254–259.
- Arberet, L., Pottier, F., Michelin, A., Nowik, W., Bellot-Gurlet, L., Andraud, C., 2021. Spectral characterization of a traditional Mesoamerican dye: relationship between in situ identification on the 16th century Codex Borbonicus manuscript and composition of *Justicia spicigera* plant extract. *Analyst* 146, 2520–2530. <https://doi.org/10.1039/D1AN00113B>.
- Atlas de la Medicina Tradicional de México del INI/UNAM/INPI/DGTIC, 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>. (Accessed 20 December 2021). accessed.
- Awad, N.E., Abdelkawy, M.A., Abdel, Rahman, E.H., Hamed, M.A., Ramadan, N.S., 2018. Phytochemical and in vitro screening of *Justicia spicigera* ethanol extract for antioxidant activity and in vivo assessment against *Schistosoma mansoni* infection in Mice. *Antifungal Agents* 16, 49–56. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180126161247>.
- Baell, J.B., Holloway, G.A., 2010. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 53, 2719–2740. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>.
- Baquero-Peña, L., Guerrero-Beltrán, J.A., 2017. Physicochemical and antioxidant characterization of *Justicia spicigera*. *Food Chem.* 218, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.078>.
- Bezerra Gomes, P., Nett, M., Dahse, H.-M., Hertweck, C., 2010. Pitucamycin: structural merger of a phenoxazinone with an epoxyquinone antibiotic. *J. Nat. Prod.* 73, 1461–1464. <https://doi.org/10.1021/np100344u>.
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I.H., Frearson, J., Wyatt, P.G., 2008. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* 3, 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>.
- Cáceres-Cortés, J.R., Cantú-Garza, F.A., Mendoza-Mata, M.T., Chávez-González, M.A., Ramos-Mandujano, G., Zambrano-Ramírez, I.R., 2001. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytother. Res.* 15, 691–697. <https://doi.org/10.1002/ptr.791>.
- Case, D.A., Cheatham III, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr., K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- Case, H.M.A.D.A., Belfon, K., Ben-Shalom, I.Y., Brozell, S.R., Cerutti, D.S., Cheatham III, T.E., Cruzeiro, V.W.D., Darden, T.A., Duke, R.E., Gimbasu, G., Gilson, M.K., Gohlke, H., Goetz, A.W., Harris, R., Izadi, S., Izmailov, S.A., Jin, C., Kavavajhala, K., Kaymak, M.C., King, E., Kovalevko, A., Kurtzman, T., Lee, T.S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Madejo, M., Man, V., Manathunga, M., Merz, K.M., Miao, Y., Mikhailovskii, O., Monard, G., Nguyen, H., O'Heara, K.A., Onufriev, A., Pan, F., Pantano, S., Qi, R., Rahmanoun, A., Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C.L., Skrynnikov, N.R., Smith, J., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wei, H., Wolf, R.M., Wu, X., Xue, Y., York, D.M., Zhao, S., Kollman, P.A., 2021. Amber 2021.
- Caeretano, M., Genovese, M., Piazza, L., Balestri, F., Del Corro, A., Vito, A., Paoli, P., Santi, A., Imperatore, C., Menna, M., 2022. Identifying human PTP1B enzyme inhibitors from marine natural products: perspectives for developing of novel insulin-mimetic drugs. *Pharmaceuticals* 15. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626> art. no. 325.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- De Lano, W.L., 2004. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 228, U313–U314.
- Díaz-Rojas, M., Raja, H., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Mata, R., 2021. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Milbranchea albolutea*. *Phytochemistry* 184, 112664. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112664>, art. no.

- Domínguez, X.A., Achenbach, H., González, C.C., Ferré-Dámare, A.R., 1990. Estudio químico del muirle (*Justicia spicigera*). *Rev. Latinoam. Quim.* 21, 142–143.
- Egan, W.J., Mezer, K.M., Baldwin, J.J., 2000. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* 43, 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.
- Equivel-Gutiérrez, E.R., Noriega-Gismeros, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Borjas, M., Salgado-Garciglia, R., Saavedra-Molina, A., 2013. Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Pharmacologyonline* 2, 120–127.
- Euler, K.L., Alam, M., 1982. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *J. Nat. Prod.* 45, 220–221. <https://doi.org/10.1021/np50020a020>.
- Fernández-Pomares, C., Juárez-Aguilar, E., Domínguez-Ortiz, M.A., Gallegos-Estudillo, J., Herrera-Covarrubias, D., Sánchez-Medina, A., Aranda-Abreu, G.E., Mazo, J., Hernández, M.E., 2018. Hydroalcoholic extract of the widely used Mexican plant *Justicia spicigera* Schldl. exerts a cytostatic effect on LNCaP prostate cancer cells. *J. Herb. Med.* 12, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.09.003>.
- Fico, G., Braca, A., Morelli, L., Tomè, F., 2003. Flavonol glycosides from *Aconitum vulpura*. *Fitorapia* 74, 420–422. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(03\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(03)00045-5).
- Forli, S., Huey, R., Pique, M.E., Sanner, M.F., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2016. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat. Protoc.* 11, 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>.
- González-Trujano, M.E., Domínguez, F., Pérez-Ortega, G., Aguillón, M., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S., Martínez, A., 2017. *Justicia spicigera* Schldl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomed. Pharmacother.* 92, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.075>.
- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminf.* 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- ICH, 2005. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: Q2A Y Q2B, Q2 (R1), Switzerland.
- Jacobo-Salcedo, M.D.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Alvarez, C., González-Espindola, L.N., Domínguez, F., Maciel-Torres, S.P., García-Lujan, C., González-Martínez, M.D.R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillo, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milán, P., García-Carranca, A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of mexican medicinal plants. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1925–1928. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100601234>.
- Jiménez-Arreola, B.S., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J.L., Rivera-Chávez, J., 2020. Dimeric phenolones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorg. Chem.* 101, 103893. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romero-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zhielniski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kazakova, O., Giniyatullina, G., Babkov, D., Wimmer, Z., 2022. From marine metabolites to the drugs of the future: squalamine, troidsquamine, their steroid and triterpene analogues. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031075>, art. no. 1075.
- Kim, C.Y., Im, H.W., Kim, H.K., Huh, H., 2001. Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of Panax ginseng by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 239–242. <https://doi.org/10.1007/s002530000557>.
- Kumar, A., Rana, D., Rana, R., Bhatia, R., 2020. Protein tyrosine phosphatase (PTP1B): a promising drug target against life-threatening ailments. *Curr. Mol. Pharmacol.* 13, 17–30.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1996. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (Suppl. 1), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- Magos-Guerrero, G.A., Santiago-Mejía, J., Carrasco, O.F., 2017. Exploratory studies of some Mexican medicinal plants: Cardiovascular effects in rats with and without hypertension. *J. Interact. Ethnopharmacol.* 6, 274–279. <https://doi.org/10.5455/jeie.20170706061922>.
- Meckes, M., David-Rivera, A.D., Nava-Aguilar, V., Jimenez, A., 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 11, 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.06.002>.
- Muegge, I., Heald, S.L., Brittelli, D., 2001. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J. Med. Chem.* 44, 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>.
- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V.E., Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L.A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Alvarez, C., García-Carranca, A., 2012. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schldl (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol.* 143, 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>.
- Peraza-Sánchez, S.R., Poot-Kantún, S., Toores-Tapia, L.W., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Cedillo-Rivera, R., 2005. Screening of native plants from Yucatán for e, 43, 594–598. <https://doi.org/10.1080/13880200500301720>.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumontel, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M., 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitorapia* 78, 315–318. <https://doi.org/10.1016/j.fitore.2007.03.013>.
- Pérez-Gutiérrez, R., Mota-Flores, J., Neira-González, A., 2018. Anti-inflammatory effect of procumbenoid B from *Justicia spicigera* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model. *Pharma Res.* 10, 218–224. <https://doi.org/10.4103/pr.pr.97.17>.
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., de la Mora-de la Mora, J.L., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Martínez-Gordillo, M.N., 2001. Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 44, 151–152.
- Rangel-Grimaldo, M., Macías-Rubalcava, M.L., González-Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., Mata, R., 2020.  $\alpha$ -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.* 83, 675–683. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01108>.
- Real-Sandoval, S.A., Gutiérrez-López, G.F., Domínguez-López, A., Paniagua-Castro, N., Michicotl-Meneses, M.M., Jaramillo-Flores, M.E., 2020. Downregulation of proinflammatory liver gene expression by *Justicia spicigera* and kaempferitrin in a murine model of obesity-induced by a high-fat diet. *J. Funct. Foods* 65, 103781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103781>.
- Rebollar-Ramos, D., Ovalle-Magallanes, B., Palacios-Espinoza, J.F., Macías-Rubalcava, M.L., Raja, H.A., González-Andrade, M., Raja, H., 2021.  $\alpha$ -Glucosidase and PTP-1B inhibitors from *Malbranchea dendritica*. *ACS Omega* 6, 22969–22981. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03708>.
- Ren, J., Liu, D., Tian, L., Wei, Y., Proksch, P., Zeng, J., Lin, W., 2013. Venezuelan A-G, new phenoxazine-based alkaloids and aminophenols from *Streptomyces venezuelae* and the regulation of gene target Nur77. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 301–304. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.096>.
- Roe, D.R., Cheatham, T.E., 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theor. Comput.* 9, 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.
- Salomon-Ferrer, R., Götz, A.W., Poole, D., Le Grand, S., Walker, R.C., 2013. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *J. Chem. Theor. Comput.* 9, 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400143y>.
- Singh, S., Singh Grewal, A., Grover, R., Sharma, N., Chopra, B., Kumar Dhingra, A., Arora, S., Redhu, S., Lather, V., 2022. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorg. Chem.* 121, 105626. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>, art. no.
- Teague, S.J., Davis, A.M., Leeson, P.D., Oprea, T., 1999. The design of leadlike combinatorial libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 3743–3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24-3743:AID-ANGE3743-3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24-3743:AID-ANGE3743-3.0.CO;2-U).
- Thuy, T.T., Lam, T.H., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Ninh, P.T., Anh, N.T.H., Sung, T.V., 2012a. Nghiên cứu thành phần và độc tính của chất màu tự lá cây cam tím (*Peristrophe bivalvis*). *TCHH*, T. 6, 394–397.
- Thuy, T.T., Lam, T.H., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Ninh, P.T., Anh, N.T.H., Thao, T.T., P., Sung, T.V., 2012b. Natural phenoxazine alkaloids from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. *Biochem. System. Ecol.* 44, 205–207. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.05.009>.
- Thuy, T.T., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Lam, T.H., Ninh, P.T., Delfino, D.V., Sung, T.V., 2013. Isolation, characterization, and biological evaluation of a phenoxazine, a natural dyestuff isolated from leaves of *Peristrophe bivalvis*. *Nat. Prod. Res.* 27, 771–774. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.699409>.
- Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45, 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- Vega-Avila, E., Tapia-Aguilar, R., Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, S.L., Pérez-Flores, J., Velasco-Lezama, R., 2012. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Justicia spicigera*. *Rev. Latinoam. Quim.* 40, 75–82.
- Williams, T., Kelley, C., 2011. GnuPlot 4.5: an interactive plotting program. URL: <http://gnuplot.info>. (Accessed 7 January 2022) (Last accessed).
- Zapata-Morales, J.R., Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., Carranza-Álvarez, C., Castellanos, L.M., Martínez-Medina, R.M., Pérez-Urizar, J., 2016. Anticoagulative activity of an ethanol extract of *Justicia spicigera*. *Drug Dev. Res.* 77, 180–186. <https://doi.org/10.1002/ddr.21307>.
- Zhao, B.T., Le, D.D., Nguyen, P.H., Ali, M.Y., Choi, J.S., Min, B.S., Shin, H.M., Rhee, H.I., Woo, M.H., 2016. PTP1B,  $\alpha$ -glucosidase, and DPP-IV inhibitory effects for chromene derivatives from the leaves of *Smilax china* L. *Chem. Biol. Interact.* 253, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.012>.
- Zhao, B.T., Nguyen, D.H., Le, D.D., Choi, J.S., Min, B.S., Woo, M.H., 2018. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources. *Arch. Pharm. Res. (Seoul)* 41, 130–161. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0997-8>.