



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio químico de *Nigrospora* sp. (IQ-064) aislado de
mangles de la laguna de Tamiahua, Veracruz**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Leslie Maribel Corona Cabello



Ciudad Universitaria, CDMX

Año 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA

VOCAL: PÉREZ VÁSQUEZ ARACELI

SECRETARIO: RIVERA CHÁVEZ JOSÉ ALBERTO

1er. SUPLENTE: DE LA ROSA LARA ITZEL SUSANA

2do. SUPLENTE: CUEVAS VELÁSQUEZ CÉSAR LUIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 2-5, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Alberto Rivera Chávez



SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Ángel Sahid Aguilar Colorado

SUSTENTANTE:

Leslie Maribel Corona Cabello

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por brindarme la oportunidad y recursos para formarme como profesional.

Al Instituto de Química por brindarme la oportunidad de desarrollarme dentro de sus instalaciones.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez, por ofrecerme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, así como su apoyo y conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto CF-2019-263977.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) que a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422 e IA203220) financió algunas de las actividades realizadas y presentadas en este trabajo.

A la Dra. Beatriz Quiroz García, a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Dra. Adriana Romo Pérez, y la Q. María de los Ángeles Peña González, por el registro de los análisis espectroscópicos utilizados en este trabajo.

Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza y a la Dra. María del Carmen García González por la colección de datos espectrométricos.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez, por la expresión y purificación de la proteína *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

Al Dr. Jesús Morales Jiménez, por su apoyo en la identificación taxonómica del hongo empleado para este proyecto.

A la Dra. Mabel Clara Fragosó Serrano y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez, miembros de jurado, por el tiempo brindado para la lectura y revisión de este trabajo, así como por las observaciones realizadas que permitieron enriquecerlo.

A mis compañeros del laboratorio 2-5, por sus enseñanzas y apoyo durante mi estancia en el grupo de investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mamá y papá, por todo el amor, paciencia, confianza y apoyo que me han brindado a lo largo de la vida para cumplir cada una de mis metas. Los amo muchísimo.

A papá Pepe, por esos cafés en las madrugadas, por la confianza y apoyo brindado. Donde sea que estes te amo.

A Kalef, por su amor y confianza, fuiste inspiración en los días difíciles. Te amo gordito.

A Nube, por hacerme ver la vida diferente desde que apareciste. Te recuerdo siempre.

A mis amigas personales: Mariana, Fernanda y Angy. Por ser luz y faro en mis días malos, por su apoyo, cariño y amistad. Las amo mucho amigas, ya somos 4 de 4.

A mi amigo Fer, por su apoyo y amistad durante y después de pandemia. Te quiero Amix.

A Sahid por la paciencia, consejos y apoyo brindados tanto personal como académicamente. Te admiro.

A Karol e Ixchel por los consejos y cariño que me han dado. Las quiero.

A mi familia y conocidos, por su apoyo y cariño durante este trayecto. Los quiero.

Índice

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 DIABETES <i>MELLITUS</i>	3
2.1.1 <i>Diabetes mellitus tipo II</i>	4
2.2 PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B	6
2.2.1 <i>Papel de la PTP1B en la DMII</i>	7
2.2.2 <i>Inhibidores de la PTP1B</i>	9
2.2.2.1 <i>Inhibidores de la PTP1B de origen fúngico</i>	12
2.3 <i>NIGROSPORA SP.</i>	14
2.3.1 <i>Metabolitos representativos del género Nigrospora sp.</i>	14
2.3.1.1 <i>Nigrosporapironas</i>	16
3 JUSTIFICACIÓN.....	19
4 HIPÓTESIS.....	20
5 OBJETIVO.....	20
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
6 MÉTODOS.....	21
6.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	21
6.1.1 <i>Perfilamiento del extracto por CLAR</i>	21
6.1.2 <i>Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas</i>	21
6.1.3 <i>Evaluación in vitro del efecto inhibitorio de las fracciones</i>	22
6.2 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE DEL HONGO IQ-064.....	23
6.3 ESTUDIO QUÍMICO DE IQ-064.....	23
6.3.1 <i>Cultivo a mediana escala y obtención del extracto</i>	23
6.3.2 <i>Fraccionamiento primario del extracto</i>	23

6.3.3	<i>Aislamiento de compuestos nigrosporapirona B (1) y nigrosporapirona E (2)</i>	24
6.4	DESREPLICACIÓN DE FRACCIONES BIOACTIVAS	26
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1	ESTUDIO QUÍMICO	28
7.1.1	<i>Aislamiento de los compuestos 1 y 2</i>	29
7.1.2	<i>Elucidación estructural del compuesto 1</i>	31
7.1.3	<i>Elucidación estructural del compuesto 2</i>	35
7.1.4	<i>Ruta biosintética de la nigrosporapirona B y E</i>	38
8	CONCLUSIONES	39
9	PERSPECTIVAS	39
10	REFERENCIAS	40
11	ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimación de la prevalencia de DM ajustada por edad en adultos de 20 a 79 años en 2021.	5
Figura 2. Mecanismo catalítico de hidrólisis de la PTP.....	7
Figura 3. Papel de la PTP1B en la vía de señalización de insulina y leptina.....	8
Figura 4. Algunos inhibidores de la PTP1B de origen semisintético y sintético.....	10
Figura 5. Algunos inhibidores de la PTP1B que son productos naturales.....	11
Figura 6. Algunos metabolitos secundarios de origen fúngico inhibidores de la PTP1B.....	13
Figura 7. Metabolitos secundarios provenientes de <i>Nigrospora</i> sp. y su actividad biológica.....	15
Figura 8. Moléculas derivadas de α -pirona aisladas en <i>Nigrospora</i> sp.....	17
Figura 9. Cromatograma por CLAR de las fracciones primarias FP1 a 6, a una longitud de onda de 254 nm y un gradiente del 20 al 100 % de MeCN.....	29
Figura 10. Cromatograma por CLAR de la fracción FP1 a una longitud de onda de 254 nm y un gradiente del 20 al 40 % de MeCN.....	30
Figura 11. Espectro UV de nigrosporapirona B (1).....	33
Figura 12. Configuración relativa de 1.....	34
Figura 13. Espectro UV de nigrosporapirona E (2).....	36
Figura 14. Configuración relativa de 2.....	37
Figura 15. Ruta biosintética propuesta para los compuestos 1 y 2.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Agentes antidiabéticos y su mecanismo de acción.....	6
Tabla 2. Fracciones primarias obtenidas del extracto escalado de IQ-064.	24
Tabla 3. Fracciones secundarias obtenidas de FP1.	25
Tabla 4. Actividad inhibitoria de las fracciones primarias.....	28
Tabla 5. Fracciones secundarias obtenidas de la separación de FP1.....	30
Tabla 6. Datos espectrométricos obtenidos mediante EM-AR-DART para el compuesto 1	31
Tabla 7. Datos espectroscópicos de la nigrosporapirona B (1) adquiridos en DMSO- <i>d</i> ₆ (¹ H y ¹³ C 700 MHz).	33
Tabla 8. Datos espectroscópicos de la nigrosporapirona B (1) adquiridos en CDCl ₃	34
Tabla 9. Datos espectrométricos obtenidos mediante EM-AR-DART para el compuesto 2	35
Tabla 10. Datos espectroscópicos de la nigrosporapirona E (2) adquiridos en DMSO- <i>d</i> ₆ (¹ H y ¹³ C 700 MHz).	36

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius	ESI	Ionización por
µg	Microgramo		electronebulización en modo
µL	Microlitro		positivo (+) o negativo (-)
µm	Micrómetro		por sus siglas en inglés
µM	Micromolar	eV	Electrovolts
AKT	Proteína cinasa B	FBPasa	Fructosaa-1,6-bifosfatasa
APD	Agar papa-dextrosa	FFAR1	Receptor de ácidos grasos
			libres 1
ATCC	Colección americana de	FK	Fructocinasa
	cultivos tipo por sus siglas	g	Gramos
	en inglés	GCCr	Receptor de glucagón
BLAST	<i>Basic Local Alignment</i>	GK	Glucocinasa
	<i>Search Tool</i>	GLP-1	Péptido similar al glucagón
CDCl ₃	Cloroformo deuterado		tipo 1
CI ₅₀	Concentración inhibitoria	GLUT4	Transportados de glucosa
	media		tipo 4
CLAR	Cromatografía de líquidos	GNPS	Red molecular social
	de alta resolución		mundial de productos
cm	Centímetro		naturales, por sus siglas en
COSY	Espectroscopía de	GP	inglés
	correlación, por sus siglas en	GPCR	Glucógeno fosforilasa
	inglés		Receptores acoplados a
CPD	Caldo papa-dextrosa		proteínas G
CR	Cromatografía rápida	h	Hora
d	Señal doble	HEPES	Disolución amortiguadora
Da	Dalton		de ácido 4- (2-hidroxietil) -
DART	Espectrometría de masas por		1-piperazina-etanosulfónico
	análisis directo en tiempo	HMBC	Espectro bidimensional de
	real por sus siglas en inglés		correlación heteronuclear a
DCM	Diclorometano		múltiples enlaces
DG	Diabetes <i>mellitus</i>	HMG-CoA	Enzima 3-hidroxi-3-
	gestacional		metilglutaril-coenzima
DGAT	Diacilglicerol	<i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀	Proteína tirosina fosfatasa
	acetiltransferasa		1B humana de 400
DM	Diabetes <i>mellitus</i>		aminoácidos
DMSO	Dimetilsulfóxido	HRMS-QTOF	Espectroscopía de masas de
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado		alta resolución acoplado al
DMTI	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1		analizador cuádruplo simple
DMTII	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2		y tiempo de vuelo en
DPP-4	Proteína dipeptidil		tándem, por sus siglas en
	peptidasa-4		inglés.
DTT	Ditiotreitol	HSQC	Espectro bidimensional de
ELSD	Detector de dispersión de		correlación heteronuclear
	luz evaporativo		cuántica simple por sus
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y		siglas en inglés
	nutrición	Hz	Hercio

IDF	Federación Internacional de Diabetes por sus siglas en inglés	PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía	PN	Productos naturales
IPICYT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.	p-NP	p-nitrofenol
IR	Infrarrojo	p-NPP	p-nitrofenil fosfato
IRS-1	Sustrato receptor de insulina tipo 1	ppm	Partes por millón
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>	psi	Libra por pulgada cuadrada
<i>J</i>	Constante de acoplamiento	PTP	Proteína tirosina fosfatasa
JAK2	Cinasa Janus 2	PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
kV	Kilovoltio	pTyr	Fosfotirosina
L	Litro	q	Señal cuadruple
LANCIC	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural	RE	Retículo endoplásmico
LURMN	Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear	RI	Receptor de insulina
m	Metro	RL	Receptor de leptina
<i>m/z</i>	Relación masa/carga	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
MeCN	Acetonitrilo	RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
MeOH	Metanol	RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno 1
mg	Miligramo	rpm	Revoluciones por minuto
MHz	Megahercio	s	Señal simple
MIC	Concentración mínima inhibitoria	SGLT2	Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2
min	Minuto	t	Señal triple
mL	Mililitro	TCPTP	Proteína tirosina fosfatasa de linfocitos T por sus siglas en inglés
mm	Milímetro	UV	Espectroscopía de ultravioleta
mM	Milimolar	δ	Desplazamiento químico
MS	Metabolitos secundarios	Δ	Error de masa teórica respecto a la masa experimental
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	Ω	Número de insaturaciones
nm	Nanómetro		
NOESY	Espectroscopía de mejoramiento nuclear Overhauser		
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos		
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa		
pH	Potencial de hidrógeno		

1 INTRODUCCIÓN

La diabetes *mellitus* (DM) es un desorden metabólico que se caracteriza por la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre. Al año 2021 era padecida por aproximadamente 537 millones de personas en el mundo, 90% de las cuales cursan la diabetes *mellitus* tipo II (DMTII). Las personas con DMTII son resistentes al efecto de la insulina, hormona de origen pancreático clave para el transporte de la glucosa desde la sangre al interior de las células del cuerpo. La creciente incidencia de esta enfermedad está influenciada por la urbanización, un nivel socioeconómico bajo, hábitos alimenticios poco saludables y un estilo de vida sedentario; se ha calculado que para el 2045 alrededor de 783 millones de personas se verán afectadas.^{1,2} Dado el creciente problema de salud pública que representa, la búsqueda y el desarrollo de nuevos tratamientos para la DMTII ha cobrado gran relevancia, al mismo tiempo, estas investigaciones se conducen con blancos moleculares diferentes a los conocidos, de entre los que destaca la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).

La PTP1B, se ha convertido en un blanco molecular relevante debido a que la desregulación de esta enzima se vincula con diversas patologías como la obesidad, el cáncer, disfunciones autoinmunes y la diabetes.³ En el caso de la DMTII, esta proteína actúa como regulador negativo de la vía de señalización de la insulina.⁴ Hasta ahora se ha reportado una gran variedad de compuestos que fungen como inhibidores, de los cuales únicamente ocho han pasado a fases clínicas, desafortunadamente, la mayoría han sido discontinuados debido a su falta de especificidad, ya que tienden a inhibir otros tipos de fosfatasas; eficacia insuficiente y al desarrollo de diversos efectos secundarios que desencadenaron. Dado que los compuestos se evaluaron con diversos modelos trunco de la proteína,⁵ su comportamiento fue distinto frente al modelo de cadena completa.⁶

La búsqueda de inhibidores de la PTP1B se ha orientado al aprovechamiento de metabolitos secundarios y derivados semisintéticos. No obstante, los metabolitos secundarios destacan como una fuente valiosa debido a su mejor biocompatibilidad y gran diversidad estructural, lo que también brinda ideas para la síntesis y el diseño de fármacos novedosos.⁷ Dentro de los metabolitos secundarios, los de origen fúngico se distinguen por su abanico de aplicaciones en la industria alimentaria, agroquímica y farmacéutica, siendo en esta última útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes.^{8,9} En 1981, el interés por los metabolitos fúngicos provenientes de ambientes marinos tomó interés a causa del aislamiento del antibiótico siccayna, dando paso al descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos provenientes principalmente de ambientes acuáticos, entre los que sobresalen los manglares.¹⁰ La mayoría de los

reportes sobre moléculas de especies presentes en los manglares corresponden a los ubicados en Asia, de manera que a nivel mundial son poco explorados y si hablamos específicamente de la microbiota en estas zonas intermareales, México estaría desaprovechando la presente en las 905,086 hectáreas con que cuenta.^{10,11}

Dentro del grupo de investigación, en el año 2021 se inició un estudio sistemático de bioprospección, para la búsqueda de inhibidores de la PTP1B a partir de hongos asociados a manglares en México. Entre los hallazgos, el hongo denominado IQ-064 identificado como *Nigrospora* sp. destacó por su elevada actividad inhibitoria de la proteína tirosina fosfatasa humana de cadena completa (*h*PTP1B₁₋₄₀₀). El presente trabajo aborda el estudio químico de su extracto a fin de aislar y determinar la estructura química los compuestos responsables de la bioactividad y contribuir de esta forma al desarrollo de tratamientos para la DMTII, al mismo tiempo que se continúa con el aprovechamiento de la diversidad fúngica de los manglares del país.

2 ANTECEDENTES

2.1 Diabetes *mellitus*

La DM es un desorden metabólico que se caracteriza por la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre, que puede ser ocasionado por una alteración en la secreción de insulina, resistencia a las acciones de la horma o ambas, y aumento de la producción de glucosa hepática.^{1,12} La insulina es una hormona producida por las células β pancreáticas que se encarga de regular la captación, utilización y almacenamiento de nutrientes celulares; aumenta la absorción de glucosa de la sangre, principalmente en el músculo y tejido adiposo, en donde promueve su conversión a glucógeno y triglicéridos. Además, en el hígado inhibe la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la cetogénesis, y promueve la síntesis de proteínas principalmente en el músculo.¹³

La DM es padecida por más de medio billón de personas en el mundo¹, disminuyendo la calidad y esperanza de vida de los individuos que la padecen. Se estima que este padecimiento afectará a 643 millones de personas para el año 2030 y 783 millones para el 2045 según la Federación Internacional de la Diabetes (IDF por sus siglas en inglés).¹ Esta epidemia sigue en aumento debido a diversos motivos como la urbanización, nivel socioeconómico, hábitos alimenticios poco saludables y un estilo de vida sedentario.²

La DM se puede clasificar principalmente en tres tipos, según la presentación clínica y la causa, como diabetes tipo I (DMTI), DMII y diabetes gestacional (DG).¹² La DMTI es causada por un proceso autoinmune, en el cual el sistema inmune ataca a la insulina¹ impidiendo que dicha hormona actúe en el cuerpo, se presenta con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes y representa del 5 a 10 % de las personas diagnosticadas con DM.¹² La DMII representa aproximadamente el 90% de las personas diagnosticadas con este trastorno, este tipo de diabetes se asocia con la resistencia a la insulina, que gradualmente provoca que el organismo disminuya la producción de la hormona; este padecimiento se observa principalmente en adultos mayores de 45 años, aunque comienza a ser más frecuente en niños, adolescentes y adultos jóvenes.^{1,12} Por otro lado, la DG es un tipo de diabetes que se presenta durante el embarazo¹, generalmente durante los últimos dos trimestres y se espera no persista posterior al parto, este padecimiento hace más susceptibles tanto a la madre como al hijo a desarrollar DMII.¹²

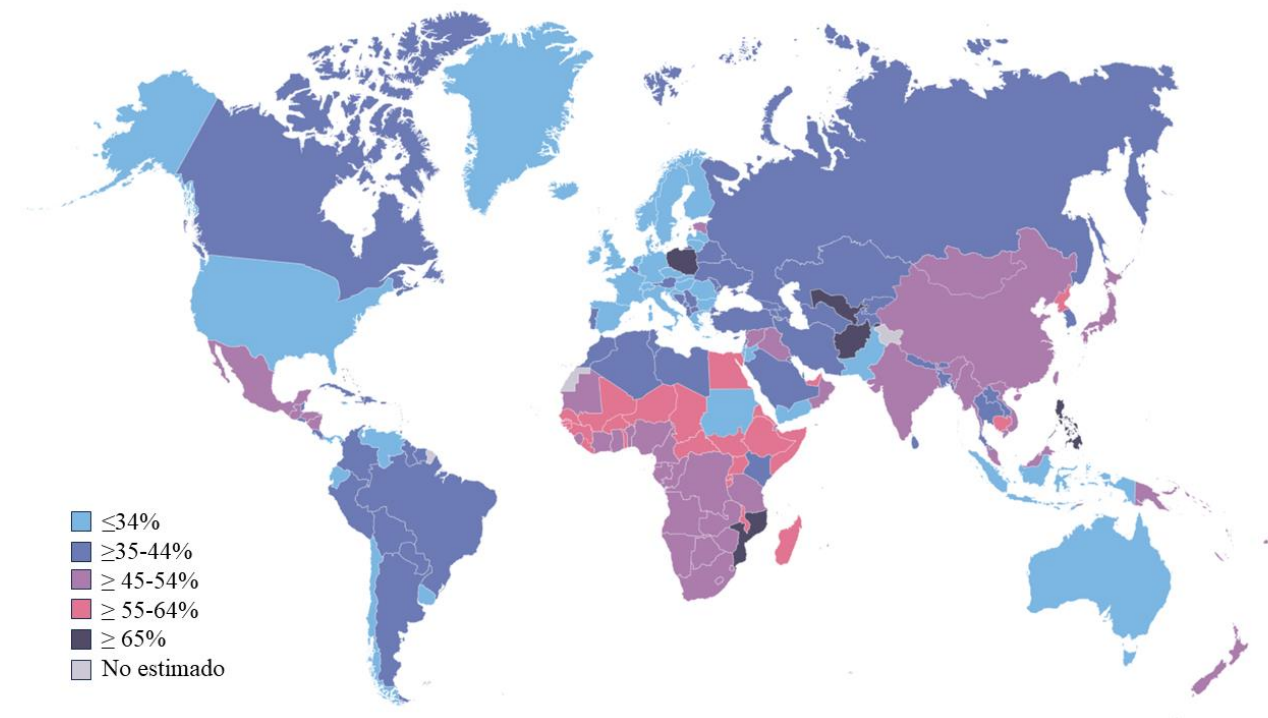
2.1.1 Diabetes mellitus tipo II

La DMTII es una enfermedad crónica que se caracteriza por la alteración del metabolismo de carbohidratos principalmente, resultado de la secreción insuficiente de la insulina, uso ineficaz de la insulina o una combinación de ambas.¹⁴ La resistencia a la insulina causa que las células β pancreáticas secreten más insulina, generando al agotamiento de estas células y dando lugar a la hiperglucemia sostenida y a la DMTII.¹³

A nivel global 1 de cada 11 adultos padecen DMTII, pero se ha observado un incremento en niños y adolescentes, volviéndolo un asunto de interés de salud pública a nivel mundial.² Según los datos reportados por la *International Diabetes Federation* IDF en su décima edición, 14.1 millones de personas en México presentaron DM, convirtiéndose en uno de los países con más incidencia (**Figura 1**), aunque se calcula que aproximadamente 6.7 millones de esos individuos no han sido diagnosticados.¹ Se estima que para el 2045 este número ascienda a 21.2 millones de personas.¹

En México, este padecimiento se presenta principalmente en los estratos más bajos en cuanto a escolaridad y nivel socioeconómico, según los resultados obtenidos por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2022. Los casos de prediabetes en el territorio nacional fueron de 22.1% en 2022, de los cuales 32.8% son adultos mayores de 60 años, y se estima que del 5 al 10% de personas diagnosticadas con prediabetes desarrollan diabetes cada año.¹⁵ El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que en el periodo de enero a junio del 2022 la segunda causa de muerte fue la DM con 59,996 defunciones, de las cuales 30,118 correspondieron a hombres y 29,877 fueron mujeres.¹⁶

Para controlar este padecimiento se deben realizar cambios en la alimentación, es decir, llevar una dieta saludable acompañada de actividad física, así como el uso de medicamentos antidiabéticos. Para tratar este problema se utiliza principalmente insulina, aunque existen otros tratamientos que se basan en la reducción de la resistencia a la insulina, la reducción de la producción de glucosa hepática, la mejora de la secreción endógena de insulina y la limitación de la reabsorción de glucosa. Actualmente existen diversos medicamentos antidiabéticos para tratar la DMTII (**Tabla 1**), los cuales se pueden clasificar por su estructura química como sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, tiazolidinedionas, mientras que según su blanco molecular se pueden catalogar como inhibidores de α -glucosidasas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), agonista del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) e inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2).⁴



Tomado y modificado de IDF *Diabetes Atlas* 10th edición.¹

Figura 1. Estimación de la prevalencia de DM ajustada por edad en adultos de 20 a 79 años en 2021.

Debido a que la mayoría de estos tratamientos tienen efectos secundarios, entre los que destacan la hipoglucemia, náuseas, vómito, diarrea, retención de líquidos, aumento de peso, aumento en el riesgo de cáncer de vejiga, aumento en el riesgo de ataque cardíaco, infecciones genitales y urinarias, y micciones frecuentes, se sigue con la búsqueda de nuevos tratamientos que sean potentes y con mejores perfiles farmacológicos, en este sentido, los productos naturales son de interés, ya que pueden tener efectos a diferentes niveles, por ejemplo actuar como sensibilizantes a la insulina o hipoglucemiantes, al mismo tiempo que son antiinflamatorios, antioxidantes y reductores de colesterol.^{4,17} Dentro de la búsqueda de nuevos tratamientos, se ha implementado el uso de diversos blancos moleculares, como la DPP-4, receptor de ácidos grasos libres 1 (FFAR1), receptores acoplados a proteínas G (GPCR), fructosacinas (FK), SGLT2, diacilglicerol acetiltransferasa (DGAT), α -glucosidasa, glucógeno fosforilasa (GP), fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa), receptor de glucagón (GCGr), fosfoenolpiruvato carboxicina (PEPCK), glucocinasa (GK) y la PTP1B, la mayoría de estos blancos moleculares están involucrados en la gluconeogénesis hepática y secreción de insulina, exceptuando la PTP1B la cual actúa como un modulador negativo de la vía de señalización de la insulina y la leptina.^{4,18}

Tabla 1. Agentes antidiabéticos y su mecanismo de acción.

Fármaco/Tratamiento	Nombre genérico	Mecanismo de acción
Sulfonilureas	Gliclazida Glimepirida Gliburida	Estimula el páncreas para que produzca más insulina.
Meglitinidas	Nateglinida Repaglinida	Estimula el páncreas para que produzca más insulina.
Biguanidas	Metformina	Reduce la producción de glucosa por el hígado.
Tiazolidinedionas	Pioglitazona Rosiglitazona	Incrementa la sensibilidad a la insulina de las células corporales y reduce la producción de glucosa por el hígado.
Inhibidores de α -glucosidasas	Acarbosa	Retarda la absorción de los carbohidratos (azúcar) ingeridos.
Inhibidores de DPP-4	Linagliptina Saxagliptina Sitagliptina Alogliptina	Intensifica el efecto de las hormonas intestinales (incretinas) implicadas en el control del azúcar en sangre.
Agonistas del GLP-1	Exenatida Liraglutida Dulglutida	Imita el efecto de ciertas hormonas intestinales (incretinas) implicadas en el control del azúcar en sangre.
Inhibidores del SGLT2	Canagliflozina Dapagliflozina Empagliflozina	Ayuda a eliminar la glucosa en la orina

Tomado y modificado de Kerru y colaboradores (2018).⁴

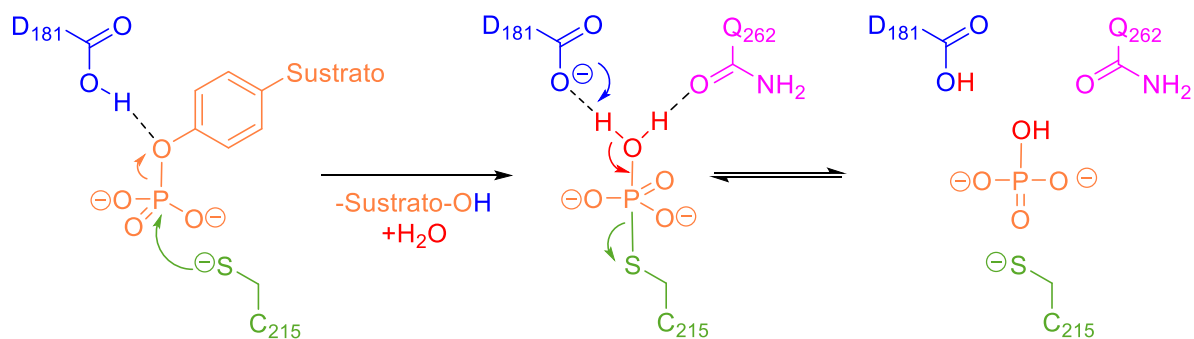
2.2 Proteína Tirosina Fosfatasa 1B

Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP) son una gran familia de enzimas conformada por más de cien PTP, que están involucradas en diversos procesos celulares como crecimiento, diferenciación, metabolismo y respuesta inmune. Entre las PTP, se encuentra la PTP1B ubicada en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico (RE), la cual se ha vuelto un blanco terapéutico de relevancia para el tratamiento de la DMII y la obesidad, ya que actúa como un modulador negativo de la vía de señalización de la insulina y la leptina.^{3,4}

Esta enzima de 50 kDa de peso molecular está conformada de 435 aminoácidos, a nivel estructural se le reconocen tres dominios: dominio N-terminal, dominio regulatorio y dominio C-terminal. El

dominio N-terminal abarca del aminoácido 1 al 298, encontrándose en ella el sitio catalítico de la enzima cuyo residuo de cisteína nucleofílica (Cys215) le da dicha actividad. El dominio regulatorio, también conocido como dominio rico en prolina, permite que proteínas que contienen dominios SH3 interactúen con la enzima. Por último, el dominio C-terminal está compuesto de aminoácidos hidrofóbicos (aminoácido 400 a 435), los cuales permiten la unión de la proteína con el RE.^{5,19}

Todos los miembros que conforman la familia de las PTP catalizan la hidrólisis de residuos de fosfotirosina (pTyr) y comparten el sitio catalítico definido por: el *loop P* o PTP, *loop WPD* y el *loop Q*. El *loop P*, el cual consta de 11 residuos de aminoácidos, contiene a la Cys215 importante para la actividad catalítica, ya que este se encarga de llevar a cabo el ataque nucleofílico al grupo fosfato de la pTyr para iniciar la hidrólisis del sustrato (**Figura 2**), simultáneamente el residuo de aspartato presente en el *loop WPD*, ayuda a la formación del intermediario de fosfo-cisteína, y a la salida de la tirosina desfosforilada; el residuo de glutamina, contenido en el *loop Q*, coordinado con una molécula de H₂O, conduce a la formación y liberación de fosfato y a regenerar el residuo de cisteína en *loop P*.^{20,21}



Tomado y modificado de Ruddraraju y colaboradores.²⁰

Figura 2. Mecanismo catalítico de hidrólisis de la PTP.

2.2.1 Papel de la PTP1B en la DMTII

Actualmente existen tratamientos para la DMTII en el mercado, pero estos presentan diversos efectos secundarios, impulsando la búsqueda de nuevos compuestos antidiabéticos dirigidos a diversos blancos farmacológicos.⁴ La desregulación de la actividad de la PTP1B se ha asociado a diversas patologías como la obesidad, cáncer, disfunciones autoinmunes y la diabetes, convirtiéndola en un blanco farmacológico de interés.³ Esta enzima actúa como un regulador negativo de la señalización de la insulina, desfosforila los residuos de pTyr en el receptor de insulina (RI), provocando que la

cascada de señalización finalice. La inhibición de la PTP1B se logra mediante la modificación del sitio catalítico en la Cys215, al inhibir la enzima, el equilibrio se ve favorecido hacia la fosforilación, lo que permite que la cascada de señalización de la insulina se lleve a cabo, iniciando con la fosforilación del receptor de la insulina y el sustrato de receptor de la insulina (IRS-1), dejando que la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la proteína cinasa B (AKT) actúen,¹⁹ permitiendo la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) en la superficie celular (**Figura 3**) y el transporte de la glucosa a la célula.^{7,19} En el caso de la leptina se une a su receptor (LR) promoviendo la autofosforilación, seguida de la fosforilación de la Janus quinasa 2 (JAK2), iniciando la cascada de señalización, la cual provoca la reducción de la síntesis de ácidos grasos favoreciendo la oxidación,^{3,7} al participar la PTP1B en esta cascada de señalización se ven interrumpidos los procesos descritos.

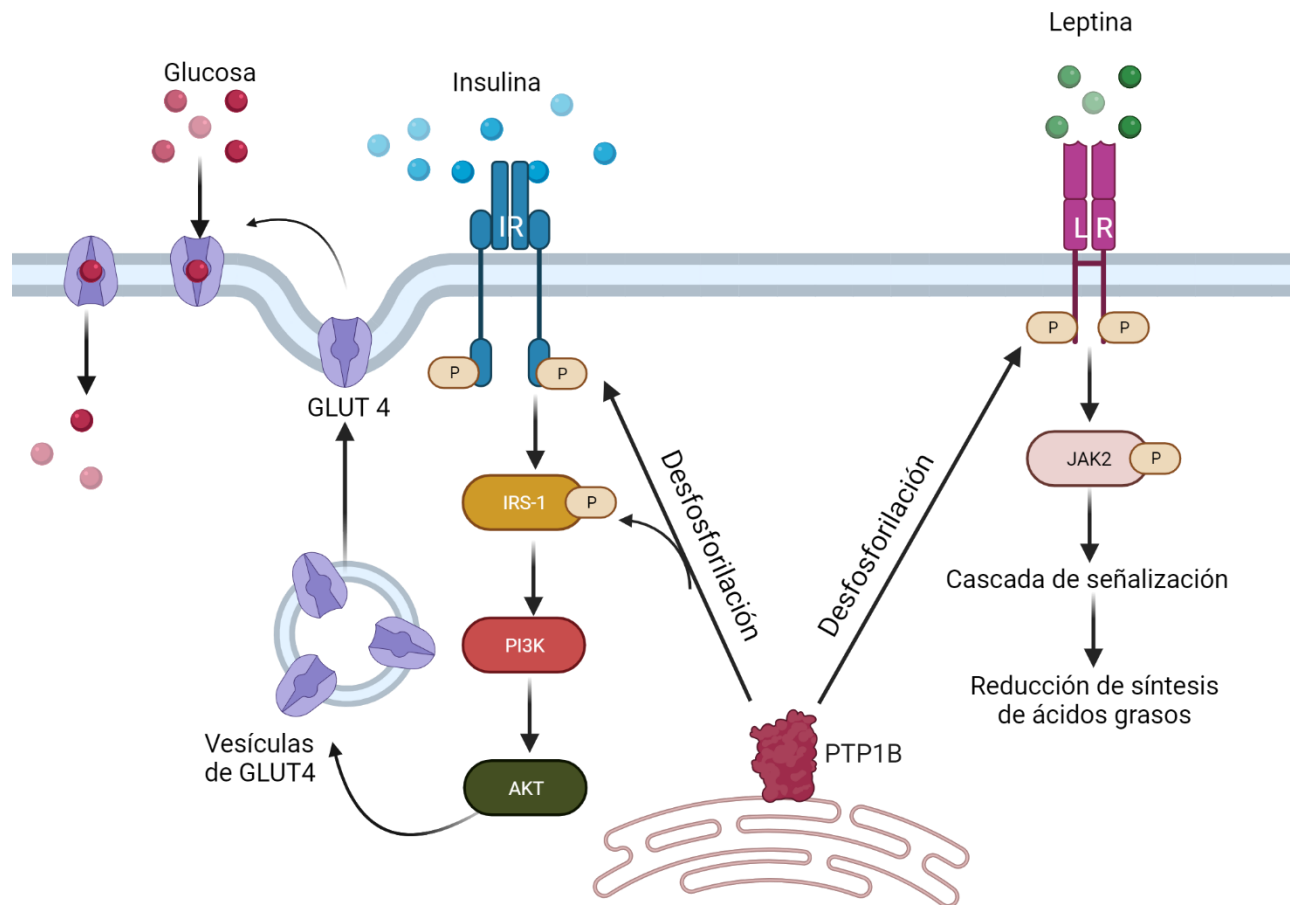


Figura 3. Papel de la PTP1B en la vía de señalización de insulina y leptina.

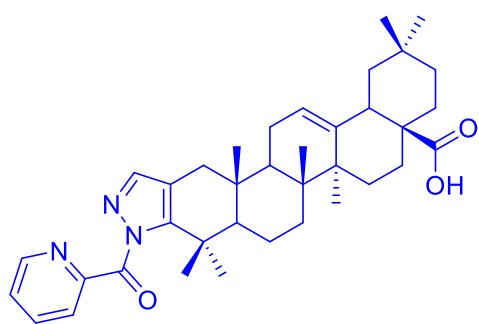
Debido a relevancia de esta proteína en los procesos de señalización de la insulina y la leptina, la PTP1B se ha confirmado como un blanco farmacológico prometedor para el desarrollo de tratamientos

alternativos para la DM.³ Estudios en ratones *knockout* de PTP1B, mostraron una mayor sensibilidad a la insulina. Por otra parte, al ser sometidos a una dieta rica en grasa éstos no aumentaban de peso y sus niveles de triglicéridos eran bajos.²² También se observó que en cultivos celulares con una sobreexpresión de la enzima se disminuye la fosforilación del IR, mientras que en células con bajos niveles de PTP1B la señalización de insulina se veía aumentada.²³

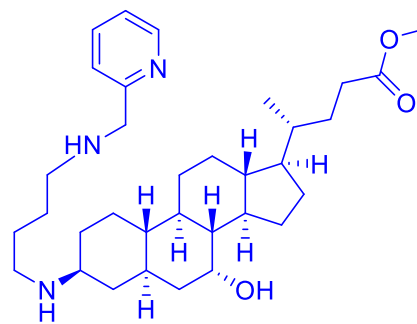
2.2.2 Inhibidores de la PTP1B

Actualmente se han identificado y desarrollado alrededor de 500 inhibidores de la PTP1B, los cuales se pueden clasificar en sintéticos, semisintéticos y naturales (**Figura 4 y 5**), en su mayoría de tipo fenólico, terpenoide, alcaloide, ácidos grasos y esteroides, por mencionar algunos núcleos estructurales, probados en su mayoría en modelos truncos de la proteína.^{5,24,25} Como se menciona en el apartado 2.2, la PTP1B está conformada por 435 aminoácidos, la mayoría de los estudios realizados para la búsqueda de inhibidores de esta proteína se realizan en modelos truncos que abarcan de los 282, 298 o 321 aminoácidos. Estudios recientes han demostrado que el uso de modelos completos (400 o 405 aminoácidos) arroja mayor información sobre las interacciones moleculares y mecanismos de inhibición en ensayos *in vitro*.^{6,21,26} Por ejemplo, en el caso del ácido ursólico, compuesto implementado como inhibidor estándar, se observó que en modelos truncos se comporta como un inhibidor competitivo, mientras que en el modelo de cadena completa (400 aminoácidos) se mostró como un inhibidor no competitivo²⁷, o como el caso de la trodusquemina o MSI-1436 que funciona como un inhibidor más potente en el modelo de cadena completa que en el de 321 aminoácidos, esto debido a que el compuesto interactúa en un sitio alostérico presente entre los residuos 367 a 394, destacando la importancia de los modelos de cadena completa.²⁸

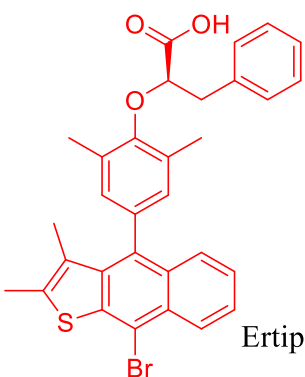
En enero de 2023 Lui y colaboradores publicaron el análisis de 327 productos naturales que inhiben a la PTP tipo 1.⁷ Los productos naturales, también conocido como metabolitos secundarios (MS), son moléculas con estructuras químicas variadas sintetizadas por plantas, animales marinos, hongos y bacterias, los cuales juegan un papel clave en la supervivencia de quienes los producen, estos compuestos han tomado un papel relevante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos ya que ofrecen mejor biocompatibilidad, debido en gran medida a la diversidad estructural que presentan.^{7,8,29}



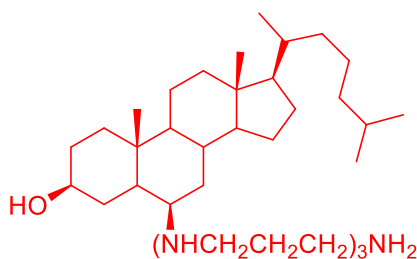
Derivado de ácido maslínico^a



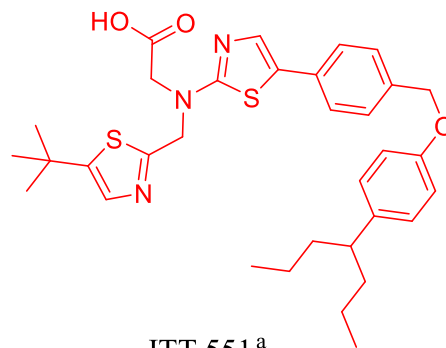
DPM-1001^b



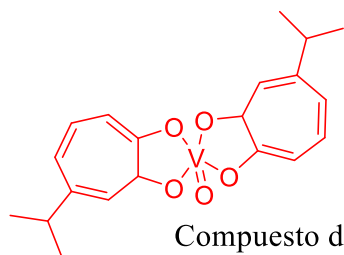
Ertiprotafib^a



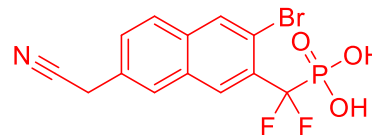
Claramina^a



JTT-551^a



Compuesto de vanadio^a



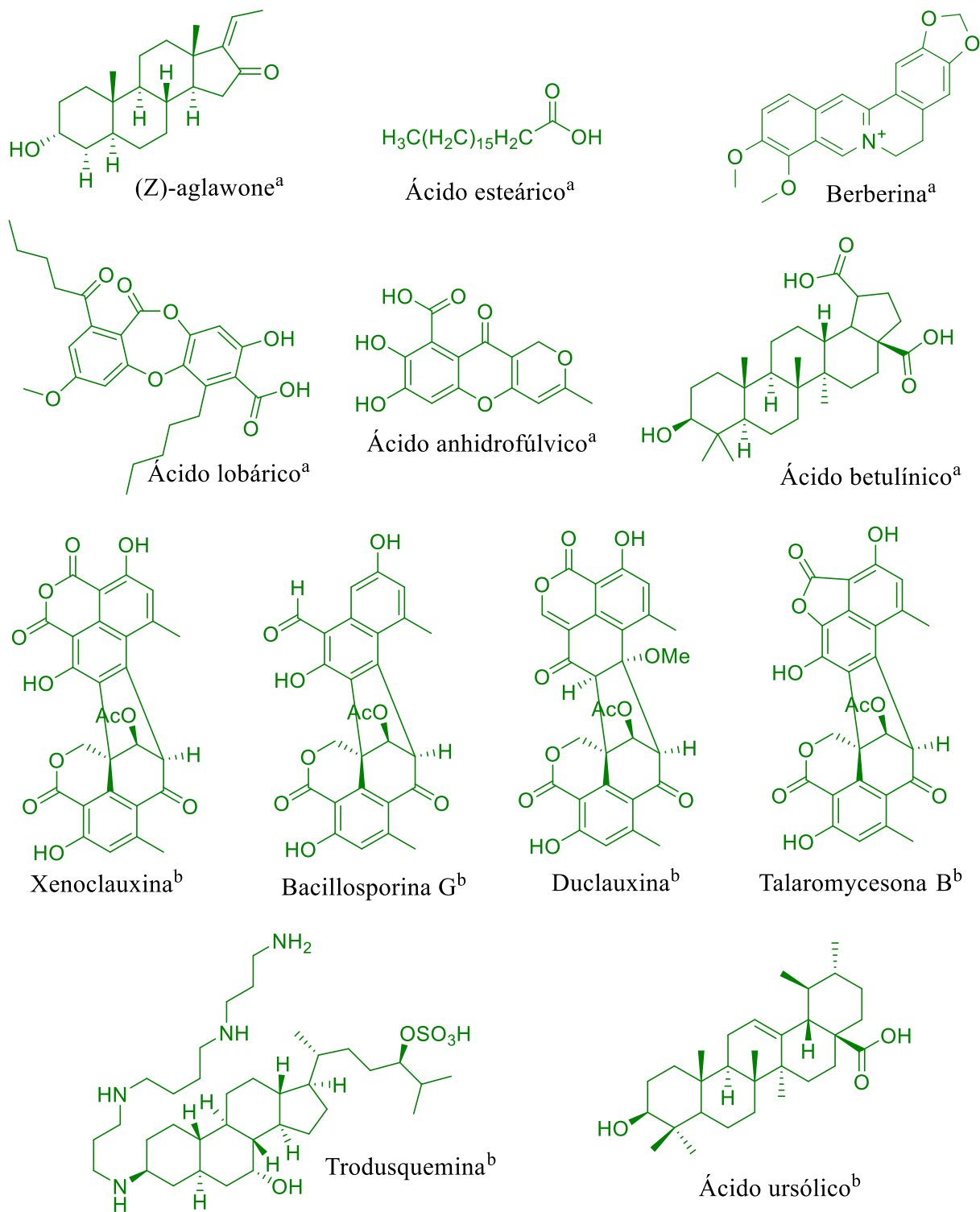
KQ-791^a

En azul se indican los inhibidores de origen semisintético y en rojo los sintéticos.

^a. Evaluados en modelos de cadena trunca.³

^b. Evaluados en modelo de cadena completa.²⁸

Figura 4. Algunos inhibidores de la PTP1B de origen semisintético y sintético.



^a Compuestos evaluados en modelos truncos.³

^b Compuestos evaluados en modelos de cadena completa.^{27,28}

Figura 5. Algunos inhibidores de la PTP1B que son productos naturales.

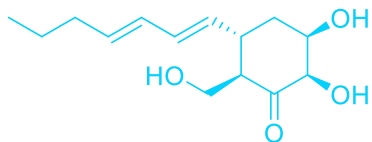
Dentro de estos compuestos algunos han pasado a fases clínicas como el ertiprotafib, la trodusquemina, el JTT-551, KQ-791, TTP-814 y DPM-1001, sin embargo, fueron suspendidos en dichos ensayos debido a su ineficacia, poca especificidad y efectos secundarios.⁵ La búsqueda de inhibidores de la PTP1B ha presentado diversos desafíos, principalmente la selectividad de los compuestos hacia la proteína debido a que el sitio catalítico está altamente conservado en la familia de las PTP.²² Debido a la diferencia en el sitio alostérico de las PTP, los inhibidores que apuntan tanto al sitio catalítico como al alostérico generalmente muestran una potencia y selectividad mejoradas, lo que requiere el descubrimiento de inhibidores bidentados de la unión de PTP1B en ambos sitios.³

En este sentido, los productos naturales (PN) ofrecen compuestos con mejor compatibilidad debido a la diversidad estructural que presentan, por ejemplo, aquellos de origen fúngico.²⁹ En 2017 González Medina y colaboradores realizaron un estudio con 223 metabolitos de origen fúngico, observando que la diversidad estructural de los PN analizados es mayor que los compuestos presentes en las cinco bibliotecas empleadas en el estudio, espacialmente abarcan mayor área del espacio químico en comparación a medicamentos aprobados para el tratamiento de cáncer, respaldando a los metabolitos secundarios de origen fúngico como una fuente prometedora de nuevos compuestos para el descubrimiento de fármacos.³⁰

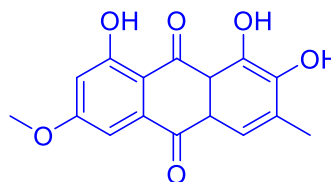
2.2.2.1 Inhibidores de la PTP1B de origen fúngico

En los últimos años se han reportado metabolitos secundarios de origen fúngico como inhibidores de la PTP1B, de ellos destacan los hongos de origen marino, endófitos de manglares, entomógenos, de suelo y setas.³¹ Las principales clases de inhibidores reportados se clasifican como terpenos, antraquinonas, policétidos y xantonas. Dentro de los 128 MS analizados, los que mostraron mejor actividad respecto a otros inhibidores ya conocidos fueron (+)-palotantina, 6-*O*-metilalaternina, asperentina B, fumosorinona A, ácido trivárico, ácido nordivaricático y divarinil divarato³¹ (**Figura 6**), siendo el más prometedor de estos el ácido trivárico, que mostró un efecto sensibilizador a la insulina en ensayos *in vitro* con una PTP1B de 321 aminoácidos e *in vivo* en ratones.³²

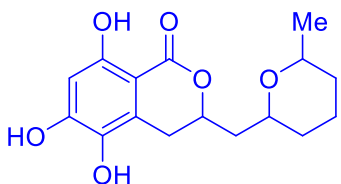
En este proyecto abordamos el estudio químico de una especie de *Nigrospora* para tal fin, un género reconocido como fuente de diversos núcleos estructurales.



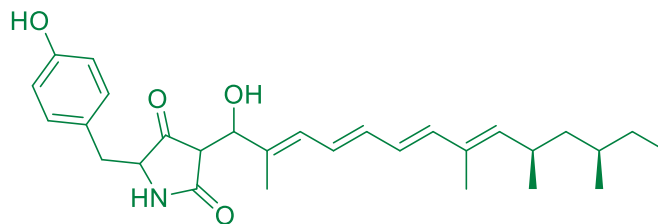
(+)-palitantina de *Geomyces* sp. (7.9)



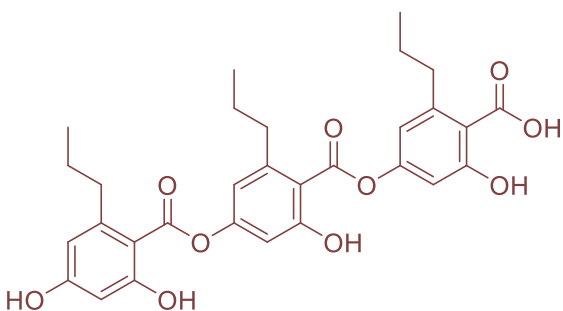
6-O-metilalaternina de *Alternaria tenuissima* (2.1)



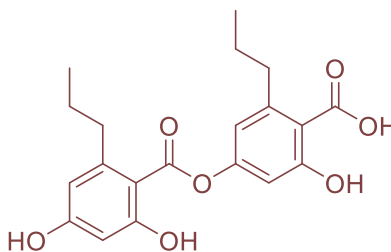
Asperentina B, *Aspergillus sydowii* (2.05)



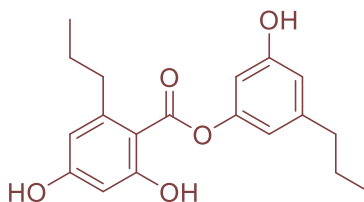
Fumosorinona A, *Isaria fumosorosea* (3.24)



Ácido trivárico, hongo F10Z1082 (0.173)



Ácido nordivariático, hongo F10Z1082 (0.51)



Divarinil divarato, hongo F10Z1082 (0.72)

En paréntesis se indica la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en μM .

Por su origen se distinguen los aislados de hongos antárticos (en azul claro), de aguas profundas (en azul oscuro), entomógenos (en verde) y del suelo (en café).³³

Figura 6. Algunos metabolitos secundarios de origen fúngico inhibidores de la PTP1B.

2.3 *Nigrospora* sp.

Nigrospora es un género de hongos ascomicetos; fue descrito por primera vez en 1902 por Zimmerman en brotes de *Panicum anfibio* en Java, Indonesia. Actualmente se han registrado 40 especies,^{34,35} se encuentran generalmente como patógenos de plantas, endófitos y saprobios. Morfológicamente estos hongos poseen conidióforos micronematosos o semi-macronematosos, ramificados, células conidiógenas monoblásticas y conidios negros, brillantes y aseptados.^{32,33} Este género de hongos se considera de interés en la búsqueda de metabolitos con posibles aplicaciones industriales, por ejemplos, se han encontrado moléculas con actividad herbicida, antibacteriana, antifúngica, antiviral y antiinflamatoria, entre otros.³⁶

2.3.1 Metabolitos representativos del género *Nigrospora* sp.

Xu y colaboradores realizaron una revisión de la información química del género disponible hasta el año 2022. Dado que el 90% de las investigaciones consultadas fueron publicadas en los últimos quince años, es importante reconocer el reciente interés por la composición química de *Nigrospora* sp. Se han descrito 231 metabolitos secundarios, con más de la mitad provenientes de cinco especies: *N. sphaerica*, *N. sacchari*, *N. oryzae*, *N. aurantiaca* y *N. cameliae-sinensis*. En general, estos metabolitos secundarios se clasificaron como policétidos, terpenoides, esteroides, compuestos con nitrógeno y ácidos grasos. Entre los metabolitos secundarios aislados, más del 50% (133) corresponden a policétidos, en el caso de los terpenoides se registraron un total de 20 compuestos, mientras que para los compuestos que contienen nitrógeno, esteroides y ácidos grasos se reportaron 54, 18 y 6 productos naturales respectivamente. Respecto a las actividades biológicas que presentan los metabolitos sobresale actividad antibacteriana, antifúngica, fitotóxica, antimalárica, antitripanosoma, e inhibición enzimática, entre otras.³⁷ Algunos de los metabolitos biológicamente activos se muestran en la **Figura 7**.³⁷

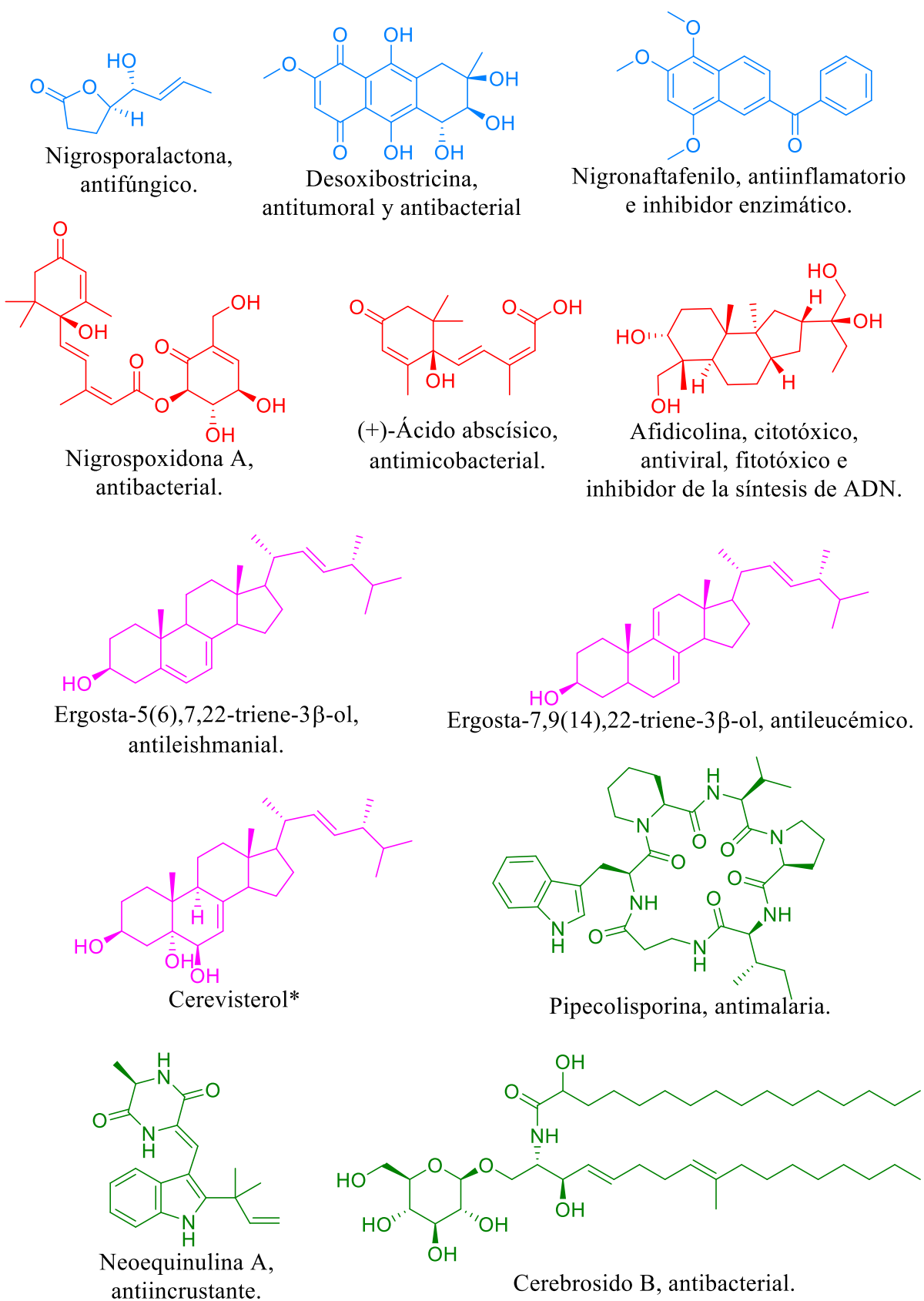
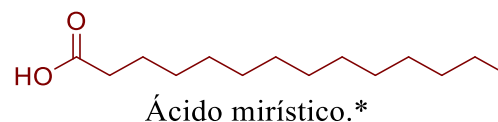
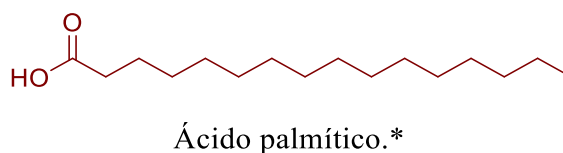
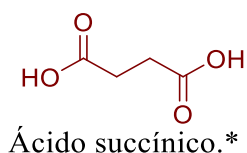


Figura 7. Metabolitos secundarios provenientes de *Nigrospora* sp. y su actividad biológica.



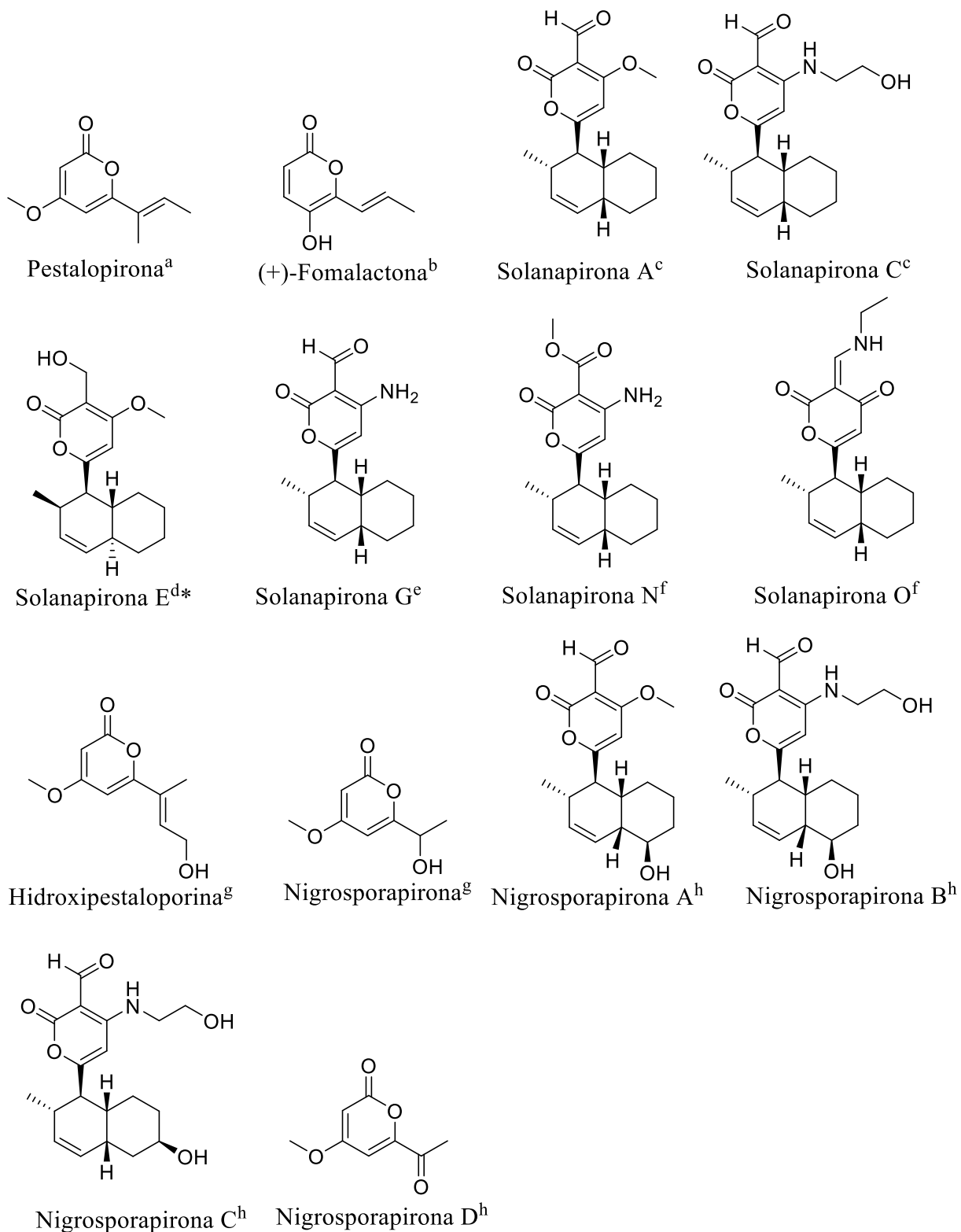
Por su origen biosintético se distinguen los policétidos (en azul), terpenoides (en rojo), esteroides (en fucsia), compuestos con nitrógeno (en verde) y ácidos grasos (en café).³⁷
 * Actividad biológica no reportada.

Figura 7. Metabolitos secundarios provenientes de *Nigrospora* sp. y su actividad biológica. (continuación).

Dentro de los metabolitos secundarios de *Nigrospora* sp. existen algunos que destacan por presentar diversas actividades biológicas como el caso de la afidicolina que mostró efectos citotóxicos, antivirales y fitotóxicos, así como otros dos compuestos: el nigronaftafenilo y la nigrosporamida A que además de su actividad antifúngica, antibacteriana y antiinflamatoria, mostraron inhibir a la α -glucosidasa, blanco molecular de interés para el tratamiento de la DM, con una CI_{50} de 6.9 μ M y 120.3 μ M respectivamente.³⁷

2.3.1.1 Nigrosporapironas

Uno de los grupos de metabolitos secundarios aislado con frecuencia del género son los policétidos, con motivos estructurales de tipo furanona, pirona, quinona y derivados monofenólicos, entre otros. Las pironas son compuestos heterocíclicos de oxígeno, insaturados, involucrados en diversos procesos biológicos como la defensa contra otros organismos o como intermediarios biosintéticos en el caso de feromonas, solanapironas, α -quimotripsina, elastasa, cumarinas y análogos.^{37,38} Dentro de las pironas destacan las α -pironas, de las que se han aislado la pestalopirona; fomalactona; solanapirona A, C, E, G, N y O; hidroxipestalopirona; alternariol, nigrosporapirona A, B, C y D; entre otros, cuyas actividades biológicas reportadas incluyen fitotoxicidad, actividad antifúngica, antibacterial, antiviral, antiinflamatoria y citotóxica (**Figura 8**).³⁷



*Molécula originalmente reportada en 1994 por Kawabata y colaboradores. En 1997 Jenkins y colaboradores emplearon el nombre de solanapirona E para una estructura diferente, este trabajo considera vigente la mención original.^{39,40}
 Moléculas reportadas por a. Ola, et. al. (2021)⁴¹; b. Fukushima, et. al. (1998)⁴²; c. Ichihara, et. al. (1983)⁴³; d. Oikawa, et. al. (1998)⁴⁴; e. Luo, et. al. (2015)⁴⁵; f. Wu, et. al. (2009)⁴⁶; g. Trisuwan, et. al. (2008)⁴⁷; h. Trisuwan, et. al. (2009)⁴⁹.

Figura 8. α -Pironas aisladas en *Nigrospora* sp.

La primera nigrosporapirona fue reportada en 2008 por Trisuwan y colaboradores, este compuesto se aisló de *Nigrospora* sp. PSU-F5 proveniente de un abanico de mar (*Annella* sp.) colectado en la Isla Similan en Tailandia,⁴⁷ un año después el mismo grupo de investigación reportó el aislamiento de cuatro nuevas nigrosporapironas denominadas A, B, C, D y la conocida solanopirona A, aisladas de *Nigrospora* sp. PSU-F18 obtenida también de *Annella* sp. Las solanopironas son una familia de compuestos estructuralmente relacionados con las nigrosporapironas.⁴⁸ La nigrosporapirona consiste en una α -pirona disustituida, que conjugada con un núcleo de decalina da lugar a la mayoría de los derivados de dicha familia, la decalina presenta un grupo hidroxilo en la posición 6 o 7, que la diferencia de las solanopironas que carecen del sustituyente.^{39,48} Respecto a la actividad biológica de las nigrosporapironas, se ha determinado la actividad antibacteriana contra los patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* resistente a metilicina de nigrosporapirona A con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 128 $\mu\text{g/mL}$.⁴⁸

3 JUSTIFICACIÓN

La diabetes *mellitus* es una enfermedad crónica que se caracteriza por los niveles elevados de glucosa en sangre. Es un padecimiento cada vez más frecuente a nivel mundial y particularmente en la población de algunos países como México.¹ Más del 90% de los individuos diagnosticados padecen el tipo II (DMTII), que se caracteriza por un uso ineficiente de la insulina por parte del organismo.^{1,14}

En tiempos recientes, la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B, por sus siglas en inglés) se ha vuelto un blanco molecular de interés para el tratamiento de la DMTII,⁴⁹ ya que actúa como modulador negativo en la señalización de la insulina y la leptina; en el primer caso la enzima desfosforila el receptor de insulina, provocando que la señalización se inactive y finalice.⁴⁹ Las investigaciones enfocadas en la búsqueda de inhibidores de la PTP1B han conducido al descubrimiento de más de 500 moléculas,⁵ pero con frecuencia no resultan selectivas debido a su interacción con una enzima similar, la Proteína Tirosina Fosfatasa de Linfocitos T (TCPTP, por sus siglas en inglés), lo que provoca diversos efectos adversos.⁵⁰ La bioprospección de metabolitos secundarios que sean inhibidores de la PTP1B puede beneficiarse de la gran diversidad químico estructural de los PNs de origen fúngico.⁵¹ Como antecedentes, ya se han descrito moléculas antidiabéticas de una diversidad de hongos. En México, la búsqueda de productos naturales que inhiban a la PTP1B, ha sido un objetivo apremiante debido a que México es uno de los países con mayor incidencia de DM con 14.1 millones de personas con este padecimiento según la IDF, siendo en la primera mitad de 2022 la segunda causa de muerte con 59,996 defunciones.^{1,16} Por tal razón, se han explorado diversos nichos ecológicos, obteniendo buenos resultados con organismos como *Penicillium* sp.⁵² y *Talaromyces* sp.²⁷

Tomando en cuenta la información anterior y estudios de bioprospección realizados previamente por el grupo de investigación de hongos asociados a manglares mexicanos,⁵³ el presente trabajo se enfoca en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria contra la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ a partir de *Nisgrospora* sp. IQ-064.

4 HIPÓTESIS

Considerando la actividad biológica presentada por el extracto a pequeña escala del hongo IQ-064 en estudios de bioprospección sobre inhibidores de la *hPTP1B*₁₋₄₀₀, realizados previamente, es probable que su estudio químico conduzca al aislamiento de los metabolitos bioactivos.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar química y biológicamente los metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria contra la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ del extracto proveniente del hongo IQ-064.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar los metabolitos secundarios que componen el extracto escalado a través de técnicas cromatográficas.
- Caracterizar químicamente los metabolitos aislados de las fracciones bioactivas, implementando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos a través del ensayo de inhibición *in vitro* contra la *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

6 MÉTODOS

El hongo bajo estudio fue identificado en un proyecto de bioprospección de inhibidores de la proteína *hPTP1B*₁₋₄₀₀ a partir de hongos asociados a manglares mexicanos, realizado con anterioridad por el grupo de investigación. IQ-064 se aisló a partir de la corteza del mangle negro *Avicennia germinans* recolectado de un manglar situado en la isla de “El Ídolo” en la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México, en el año 2018. A continuación, se describen los detalles experimentales de su estudio químico-biológico.

6.1 Procedimientos generales

6.1.1 Perfilamiento del extracto por CLAR

A fin de guiar las separaciones cromatográficas del extracto y sus fracciones se perfiló su composición química mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo marca Waters®, equipado con un detector de luz ultravioleta (UV) de arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424) y un automuestreador (2707). Como fase estacionaria se empleó una columna Phenomenex Gemini® 5 µm NX-C₁₈ (250 × 4.6 mm) y como fase móvil un gradiente de polaridad ascendente consistente en la mezcla de acetonitrilo (MeCN) grado CLAR y agua acidificada al 0.1% con ácido fórmico a un flujo de 1 mL/min, el gradiente inició en 20% de MeCN hasta alcanzar 100 % en 30 minutos, seguido de 10 minutos de lavado con MeCN. Las muestras se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 1000 ppm y se inyectaron 15 µL de la solución por análisis. El espectro de absorción UV se registró de 190 a 800 nm, mientras que el ELSD se registró con una ganancia de 300, 25 psi de presión de gas nitrógeno, 50 °C de temperatura en el tubo de secado, 35.4 °C en el nebulizador, que funcionó al 59%.

6.1.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en los siguientes equipos: Bruker Avance III a 400 MHz (¹H) y Bruker AVANCE III HD 700 MHz (¹H y ¹³C) en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química y el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) respectivamente; Los análisis se registraron en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) o cloroformo deuterado (CDCl₃). Como referencia del desplazamiento químico (δ) se empleó la señal del disolvente residual. Los espectros de masas se obtuvieron mediante análisis directo en tiempo real (DART) en un equipo JEOL modelo The AccuTOF JMS-T100LC. Que adquirió en modo positivo y cuyo gas nitrógeno se calentó a 350°C. Tanto la muestra como el estándar de polietilenglicol se disolvieron en diclorometano (DCM).

6.1.3 Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de las fracciones

El extracto y las fracciones se sometieron *in vitro* al ensayo de inhibición de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ según el método descrito por Jiménez Arreola,²⁷ la proteína se obtuvo por un método recombinante que incluyó su subclonación en un vector, expresión y purificación, como también describen los mismos autores.

La enzima se empleó a una concentración de 3 μ M, como sustrato se usó *para*-nitrofenilfosfato (p-NPP) a 30 mM, asimismo, una solución amortiguadora a pH 6.8 de HEPES a 50 mM, 100 μ M NaCl, 1.5 mM ditioneitol (DTT). Como control positivo se utilizó duclauxina a 1000 ppm en DMSO, compuesto conocido por su actividad inhibitoria de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ (CI₅₀ 12.7 μ M²⁷) y como control negativo se empleó la solución amortiguadora. Las muestras se disolvieron a 1000 ppm en DMSO. El ensayo se realizó al menos por triplicado en placas de 96 pozos de fondo redondo. Para el ensayo de inhibición se tomó una alícuota de 2 o 10 μ L de la solución stock de la muestra y se incubó por 10 min con una alícuota de la solución de *h*PTP1B₁₋₄₀₀, determinada previamente en un ensayo de actividad enzimática, ajustándose el volumen final del pozo a 90 μ L con solución amortiguadora. En seguida, se agregaron 10 μ L de la solución del sustrato para completar un volumen de 100 μ L por pozo. Una primera lectura espectrofotométrica se realizó inmediatamente a 405 nm en el equipo Cytation CYT5MFV de la empresa BIOTEK controlado con el software Gen 5, entonces las muestras se incubaron a 37 °C por 20 minutos para finalizar con una nueva lectura de absorción de luz UV. El porcentaje de inhibición se cuantificó con la ecuación descrita a continuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{A_{405m}}{A_{405b}}\right) \times 100$$

En la cual: %Inhibición corresponde al porcentaje de inhibición de la enzima, A_{405m} a la absorbancia corregida de la muestra ($A_{405m \text{ final}} - A_{405m \text{ inicial}}$), A_{405b} a la absorbancia corregida del blanco ($A_{405b \text{ final}} - A_{405b \text{ inicial}}$). Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism 6.0.

Previo a la realización del ensayo de inhibición se determinó la actividad enzimática de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀. En este experimento se evaluaron distintas alícuotas de la enzima a fin de seleccionar las más baja que conduzca en el periodo de incubación a una producción mínima de *para*-nitrofenol (p-NP)²⁷. Por triplicado alícuotas de la solución enzimática consistentes en 2, 4, 6, 8 y 10 μ L, se mezclaron con 10 μ L de la solución del sustrato p-NPP y la cantidad de solución amortiguadora necesaria para completar un volumen de 100 μ L por pozo. La mezcla se incubó por 20 minutos y se midió su absorbancia a 405

nm en el equipo previamente descrito. El volumen de enzima a emplear en el ensayo de inhibición correspondía con los valores de absorción 0.5 a 1 unidades de absorbancia.

6.2 Determinación taxonómica de la especie del hongo IQ-064

La identificación taxonómica del hongo se realizó previamente en el estudio de bioprospección en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) en San Luis Potosí. Mediante la secuenciación molecular de la región espaciadora interna transcrita (ITS por sus siglas en inglés) del hongo y un análisis de tipo BLAST (megablast) con la base de datos del *National Center Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés) se determinó que el aislamiento pertenece al género *Nigrospora* sp.⁵³ Un reanálisis BLAST de la secuencia en agosto 2023 halló un porcentaje de similitud del 99.62 % y un 96.00 % de cobertura con *Nigrospora sphaerica*.⁵⁴

6.3 Estudio químico de IQ-064

6.3.1 Cultivo a mediana escala y obtención del extracto

Inicialmente, el hongo IQ-064 se recuperó a partir del resguardo disponible en la colección del Laboratorio de Cultivo del Instituto de Química, confirmándose la similitud de su morfología macroscópica con lo previamente descrita. En concordancia con lo reportado, un trozo de micelio en agar papa dextrosa (APD) se transfirió a 15 mL de caldo papa dextrosa (CPD) y se incubó por siete días en agitación (100 rpm) y temperatura ambiente. Con los cultivos en caldo se inocularon siete matraces de 250 mL con 12 g de cereal estéril, y se mantuvieron a temperatura ambiente por 28 días con ciclos normales de luz-oscuridad. Transcurrido el periodo de incubación, cada cultivo se extrajo con 500 mL de una mezcla de DCM-metanol (MeOH) 1:1, dejándolo en agitación por 24 h a 100 rpm. La solución de extracción se filtró y posteriormente se le añadió una mezcla de agua y DCM hasta obtener un volumen final de 2 L, la mezcla resultante se agitó por 15 minutos y se sometió a un proceso de reparto, separándose la fase inferior y llevándola a sequedad. El extracto seco se solubilizó en 300 mL de una mezcla de MeOH-MeCN 1:1, y se realizó un proceso adicional de reparto con 300 mL de hexano, la fase hexánica se descartó y se conservó la de MeOH-MeCN, del secado de esta última se obtuvo el extracto de trabajo.

6.3.2 Fraccionamiento primario del extracto

Con el fin de aislar los metabolitos presentes en IQ-064, se realizó el fraccionamiento primario de 780.5 mg de extracto mediante cromatografía rápida (CR) en fase reversa en un equipo BUCHI® modelo Pure C-810, mediante un método basado en el perfilamiento por CLAR del extracto. Se

empleó una columna empacada con 12 g de gel de sílice modificada C₁₈ como fase estacionaria y como fase móvil un gradiente compuesto por agua acidificada al 0.1% de ácido fórmico y MeCN grado CLAR a un flujo de 25 mL/min, el gradiente fue de 5% al 100% de MeCN en 25 minutos, seguido por 5 min de lavado. La recolección de eluatos se basó en la similitud de su espectro de absorción de luz UV adquirido por el equipo en un rango de 200 a 800 nm, resultando en un total de seis fracciones (**Tabla 2**). Todas las fracciones se evaluaron en el ensayo de inhibición frente a *h*PTP1B₁₋₄₀₀ y se analizaron por CLAR.

Tabla 2. Fracciones primarias obtenidas del extracto escalado de IQ-064.

Fracción	Código	Rendimiento (mg)
1	FP1	45.10
2	FP2	9.50
3	FP3	24.40
4	FP4	19.50
5	FP5	24.60
6	FP6	18.30
Total (mg)		140.20
Recuperado (%)		17.96

6.3.3 Aislamiento de compuestos nigrosporapirona B (1) y nigrosporapirona E (2)

43.90 mg de la fracción FP1 se separaron por cromatografía semipreparativa en fase reversa en el equipo previamente indicado para CLAR en modo analítico más un módulo colector de fracciones (WFCIII). Se empleó la columna Phenomenex Gemini® 5 µm NX-C18 (250 × 10 mm) como fase estacionaria y como fase móvil un gradiente de MeCN y agua acidificada al 0.1 % con ácido fórmico a un flujo de 4.6 mL/min; el gradiente inició con 20 % de MeCN hasta alcanzar 40 % en 25 minutos y finalizó con 10 minutos de lavado con MeCN. Las fracciones se colectaron de forma manual con base en la absorción de UV registrada a una longitud de onda de 254 nm. La adquisición y procesado de los datos se realizó con el software empleado en los análisis por CLAR analítica. Las fracciones fueron sometidas al ensayo de inhibición de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

Tabla 3. Fracciones secundarias obtenidas de FP1.

Fracción	Código	Rendimiento
1	FS1	8.70
2	FS2	0.90
3	FS3	1.30
4	FS4	1.00
5	FS5	1.60
6	FS6	0.90
7	FS7	7.80
8	FS8	1.40
9	FS9	9.30
10	FS10	5.20
Total (mg)		38.10
Recuperado (%)		86.79

Se obtuvieron un total de diez fracciones, de las cuales FS7 y FS9 consistieron en 7.8 mg del compuesto nigrosporapirona B (**1**) y 9.3 mg de nigrosporapirona E (**2**), respectivamente (**Tabla 3**). Los compuestos presentan el aspecto de una goma transparente y su estructura química fue determinada mediante técnicas espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) y espectrométricas (DART), hallándose que el compuesto **1** es nigrosporapirona B⁴⁸, un compuesto previamente reportado en la literatura, mientras que el compuesto **2** se trata de un metabolito secundario novedoso denominado nigrosporapirona E.

Nigrosporapirona B (**1**). Goma incolora, RMN- ^1H (700MHz, DMSO- d_6) δ_{H} (ppm): 0.92 (3H, d, $J=$ 6.7 Hz, H-16), 1.14 (1H, qd, $J=$ 12.4, 4.9, H-7), 1.31 (2H, t, $J=$ 4.1, H-9), 1.40 (2H, m, H-8), 1.81 (1H, dd, $J=$ 12.5, 3.8, H-7), 1.90 (1H, ddd, $J=$ 10.0, 4.7, H-5), 2.14 (1H, m, H-10), 2.43 (2H, d, $J=$ 7.8, H-1, H-2), 3.31 (1H, H-6), 3.49 (2H, q, $J=$ 5.5, H-18), 3.57 (2H, q, $J=$ 5.2, H-19), 4.61 (1H, d, $J=$ 5.4, 6-OH), 4.98 (1H, t, $J=$ 5.1, 19-OH), 5.53 (1H, d, $J=$ 10.1, H-3), 5.99 (1H, dd, $J=$ 9.6, 3.9, H-4), 6.59 (1H, s, H-12), 9.78 (1H, s, H-17), 10.54 (1H, t, $J=$ 5.7, NH); RMN- ^{13}C (700 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} (ppm): 19.4 (C-8), 19.8 (C-16), 27.7 (C-9), 34.1 (C-2), 35.8 (C-7), 36.1 (C-10), 44.0 (C-5), 45.0 (C-18), 46.9 (C-1), 59.4 (C-19), 71.5 (C-6), 159.7 (C-13), 93.8 (C-14), 97.1 (C-12), 130.1 (C-4), 131.0 (C-3), 170.0 (C-15), 163.3 (C-11), 189.4 (C-17). Espectrometría de masas de alta resolución DART m/z : 348.18154 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_5$ (error de 1.28 ppm).

Nigrosporapirona E (**2**). Goma incolora, RMN- ^1H (700MHz, DMSO- d_6) δ_{H} (ppm): 0.92 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-16), 1.13(1H, qd, $J=12.5$, 3.6, H-7), 1.32 (2H, m, H-8, H-9), 1.43 (1H, m, H-8), 1.80 (1H, m, H-7), 1.90 (1H, ddd, $J=10.0$, 5.0, H-5), 2.11 (1H, dq, $J=11.6$, 4.8, H-10), 2.34 (1H, dd, $J=11.7$, 10.0, H-1), 2.39 (1H, m, H-2), 3.34 (1H, H-6), 4.58 (1H, d, $J=5.5$, 6-OH), 5.52 (1H, dt, $J=10.1$, 1.7, H-3), 5.98 (1H, ddd, $J=10.1$, 5.0, 2.5, H-4), 6.06 (1H, s, H-12), 8.69 (1H, d, $J=3.0$, NH_2), 9.44 (1H, d, $J=2.8$, NH_2), 9.81 (1H, s, H-17); RMN- ^{13}C (700 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} (ppm): 19.6 (C-8), 19.8 (C-16), 27.6 (C-9), 34.0 (C-2), 35.7 (C-7), 36.0 (C-10), 43.9 (C-5), 46.5 (C-1), 71.3 (C-6), 94.0 (C-14), 100.5 (C-12), 130.0 (C-4), 130.8 (C-3), 163.4 (C-11), 168.8 (C-15), 160.1 (C-13), 189.4 (C-17). Espectrometría de masas de alta resolución DART m/z : 304.15580 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ (error de 3.02 ppm).

6.4 Desreplicación de fracciones bioactivas

Las fracciones secundarias bioactivas que no pudieron ser estudiadas, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución, con ionización por electronebulización y los analizadores cuádruplo simple y tiempo de vuelo en tándem, y un detector de absorción de luz ultravioleta y visible por arreglo de fotodiodos (CLAR-PDA-ESI-HRMS-QTOF, por sus siglas en inglés); marca Agilent Technologies, modelo G6530BA®. Las muestras fueron disueltas en DMSO a una concentración de 1000 ppm, para su posterior separación cromatográfica en una columna Phenomenex Gemini® 3 μm NX-C18 (2 \times 75 mm), con un gradiente de polaridad ascendente como fase móvil consistente en la mezcla de agua acidificada al 1% con ácido fórmico y MeCN, el gradiente comenzó en 20 % de MeCN hasta alcanzar a 40 % en 25 min, seguido de 10 min de lavado con MeCN. La fuente de ionización por electronebulización funcionó en modo positivo, empleando como gas auxiliar y envolvente nitrógeno a 275 °C y 300 °C, respectivamente. El voltaje del capilar fue 4.5 kV y el de la boquilla 1 kV. Los espectros se adquirieron con el analizador en modo de barrido completo empleando un intervalo m/z 100 a 2500, y para el análisis en tándem se seleccionaron los dos precursores más abundantes por ciclo y se fragmentaron mediante disociación activada por colisión a una energía normalizada de 30 eV. El detector PDA registró las absorbancias a 220, 254 y 320 nm. Las adquisiciones se hicieron en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural en el Instituto de Química (LANCIC). Los espectros se procesaron con el programa MSConvert de ProteoWizard⁵⁵ para anotar los picos mediante el algoritmo Vendor y transformar los archivos a extensión mzML, para las anotaciones se empleó DEREPLICATOR+⁵⁶, una herramienta *in silico* y disponible en línea que forma parte del paquete de la Red Molecular Social Mundial de Productos Naturales (GNPS⁵⁷ por sus siglas en inglés)

esta facilita la identificación presuntiva de productos naturales por el comparativo de la información espectrométrica con una variedad de librerías de espectros de masas de alta resolución, entre los que se incluyen metabolitos de origen fúngico. La anotación se basó en la coincidencia de la masa molecular exacta del ion molecular y al menos seis iones fragmento, con hasta una desviación de 0.02 Da, tras el análisis en tándem, únicamente resultaron de interés las coincidencias con información de referencia denominada “oro” según el curado de los datos que mantiene GNPS.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este proyecto da continuación a un estudio de bioprospección sobre hongos asociados a manglares en México, capaces de inhibir a la proteína *hPTP1B*₁₋₄₀₀ y a partir de cuyos resultados se seleccionó el hongo IQ-064, *Nigrospora* sp. El estudio químico de la especie usando métodos cromatográficos convencionales condujo al aislamiento de dos constituyentes mayoritarios: nigrosporapirona B (**1**) y nigrosporapirona E (**2**). Sin embargo, dado que estos compuestos no son los responsables de la actividad inhibitoria de la proteína *hPTP1B*₁₋₄₀₀, se recomienda dar continuidad a su estudio.

7.1 Estudio químico

Del cultivo en mediana escala del hongo se obtuvieron 780.5 mg de extracto y a fin de realizar su fraccionamiento químico biodirigido se corroboró su actividad inhibitoria de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀. El extracto inhibió la actividad de la enzima en un 84.6 ± 3.27 % a una concentración de 20 ppm.⁵³ A continuación, basados en el perfilamiento del extracto por CLAR y la optimización del gradiente de elusión, a fin de mejorar la separación de las señales de absorción UV, se realizó su fraccionamiento por CR. Se obtuvieron seis fracciones primarias cuya actividad inhibitoria de la proteína se resumen en la **Tabla 4**, desafortunadamente, únicamente la fracción FP1 fue bioactiva y en menor medida respecto al extracto.

Tabla 4. Actividad inhibitoria de las fracciones primarias.

Fracción	%Inhibición
FP1	35.2 ± 5.5
FP2	NP ^a
FP3	NP ^a
FP4	NP ^a
FP5	NP ^a
FP6	NP ^a
Duclauxina ^b	68.8 ± 6.0

^a No presentó actividad inhibitoria contra la *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

^b Control positivo evaluado a 20 ppm.

Fracciones evaluadas a 20 ppm.

El perfilamiento de las fracciones primarias por CLAR se resumen en la **Figura 9**; por poseer el mayor conteo de unidades de absorción de luz UV a 254 nm destacan las señales a 9.6, 10.5, 11.8, min. de FP1. La fracción FP1 (45.10 mg) se seleccionó para llevar a cabo el aislamiento de sus componentes mayoritarios, la purificación se realizó por cromatografía de líquidos semipreparativa con un gradiente de elusión en fase reversa optimizado.

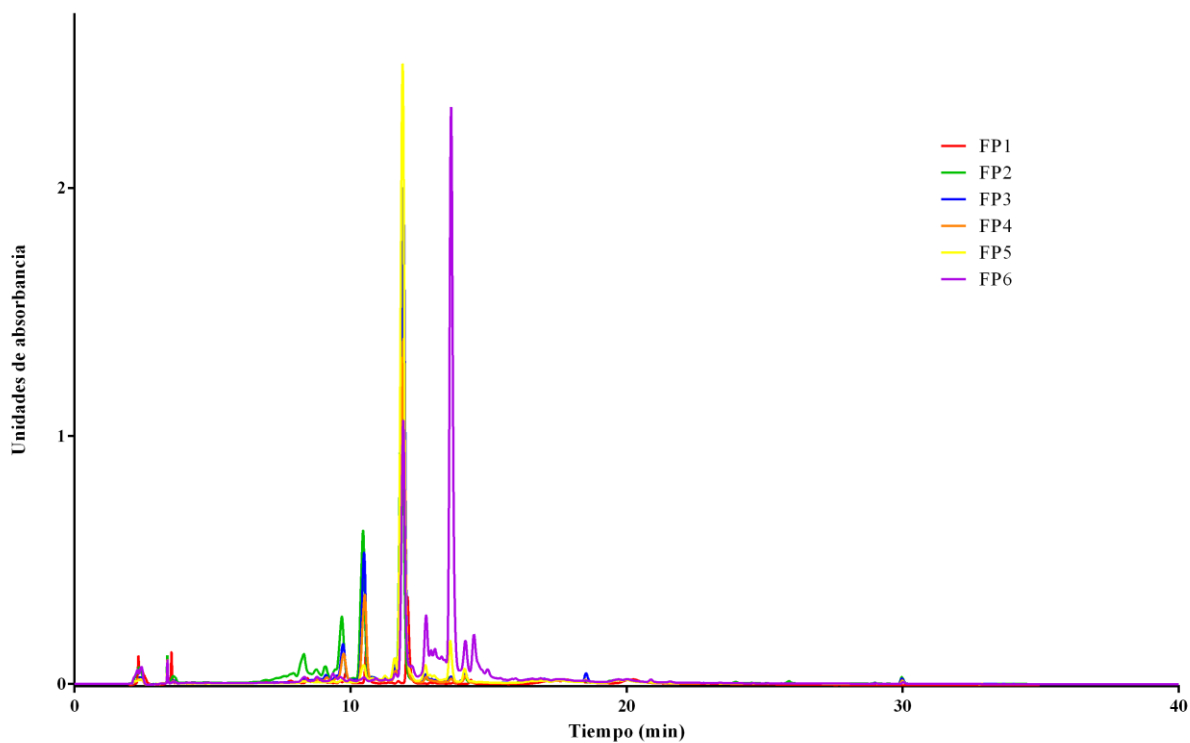


Figura 9. Cromatograma por CLAR de las fracciones primarias FP1 a 6, a una longitud de onda de 254 nm y un gradiente del 20 al 100 % de MeCN.

7.1.1 Aislamiento de los compuestos 1 y 2

De la fracción FP1 se obtuvieron un total de 10 fracciones secundarias; por la intensidad de sus señales de absorción de luz UV fueron importantes dos, con un tiempo de retención de 11.5-12.2 y 14.5-16.1 min. (**Figura 10**), que corresponden a las fracciones FS7 y FS9. La determinación de la actividad biológica de las fracciones secundarias (**Tabla 5**) indica que esta se distribuye a lo largo de todas las subfracciones, excepto por FS7 y FS9.

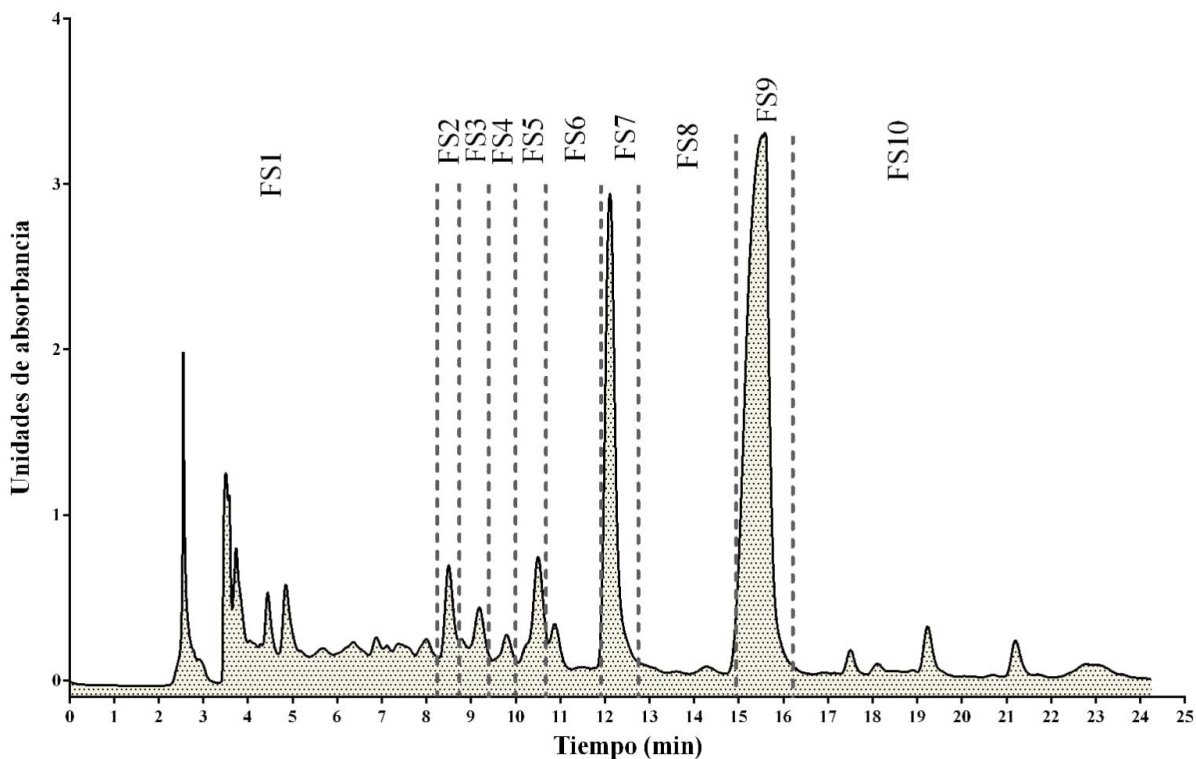


Figura 10. Cromatograma por CLAR de la fracción FP1 a una longitud de onda de 254 nm y un gradiente del 20 al 40 % de MeCN.

Tabla 5. Fracciones secundarias obtenidas de la separación de FP1.

Fracción	%Inhibición
FS1	68.47±2.88
FS2	84.85±2.27
FS3	75.16±0.77
FS4	84.69±1.58
FS5	86.20±0.57
FS6	75.13±2.26
FS7	NP ^a
FS8	85.13±1.09
FS9	NP ^a
FS10	89.81±1.66
Duclauxina ^b	90.21±0.63

^a No presentó actividad inhibitoria contra *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

^b Control positivo evaluado a 100 ppm.

Fracciones evaluadas a 100 ppm.

Es importante mencionar que a partir de las fracciones secundarias bioactivas no fue posible continuar con el estudio químico dada la pobre disponibilidad de estas, los compuestos potencialmente inhibidores de la proteína *hPTP1B*₁₋₄₀₀ pueden corresponder a componentes minoritarios cuyo aislamiento se beneficiará de la información generada. Por lo cual, dichas fracciones se sometieron a un análisis de desreplicación. Este análisis consiste en la identificación presuntiva de compuestos conocidos, mediante el comparativo de la información espectrométrica de las fracciones con la contenida en bases de datos, en este caso la librería de espectros de masas de alta resolución de GNPS. La finalidad del análisis es determinar si las fracciones no estudiadas contienen metabolitos secundarios reportados en la literatura. Dicho análisis no condujo a la anotación de ningún metabolito secundario, en este sentido, se conserva el interés por describir a futuro los constituyentes de estas. La determinación estructural de los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas se describe en seguida.

7.1.2 Elucidación estructural del compuesto 1

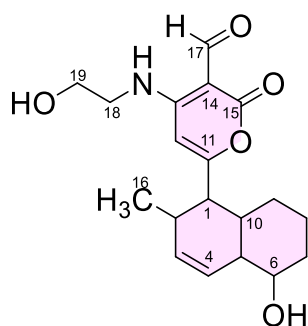
Al compuesto **1**, correspondiente a la fracción FS7, se le determinó la fórmula molecular $C_{19}H_{25}NO_5$ con base en la relación masa/carga (m/z) del ion molecular $[M+H]^+$, visto en su análisis de espectrometría de masas de alta resolución DART en modo positivo, la cual tolera ocho grados de insaturación (Ω) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Datos espectrométricos obtenidos mediante EM-AR-DART para el compuesto **1**.

Compuesto	m/z $[M+H]^+$ exp.	m/z $[M+H]^+$ calc.	Fórmula	Δ	Ω
1	348.18154	348.18110	$C_{19}H_{26}NO_5$	1.28	8

El espectro de UV presentó máximos de absorción a 238, 282 y 314 nm, máximos observados en compuestos con α -pironas y aldehídos (**Figura 11**), mientras que el espectro de absorción de infrarrojo (IR; **Figura A1**) sugirió la presencia de grupos funcionales hidroxilo (3386 cm^{-1}) y un carbonilo alfa-beta insaturado (1653 cm^{-1}), así como señales para aldehído (2925 y 2854 cm^{-1}). Los espectros de RMN 1H y ^{13}C adquiridos en DMSO- d_6 (**Tabla 7**), mostraron las señales correspondientes a 19 carbonos y 24 hidrógenos, además, este análisis permitió establecer la presencia de un grupo aldehído en la molécula (δ_H/δ_C 9.78/189.4), dos protones unidos a oxígeno (δ_H 4.61 y 4.98), un protón de enamina (δ_H 10.54) y un metilo (δ_H/δ_C 0.92/19.8). El análisis por RMN 1H en $CDCl_3$ del compuesto reveló la presencia de una señal adicional en 3.48 ppm. En el espectro de hidrógeno adquirido en DMSO- d_6 la señal correspondiente al hidrógeno H-6 se encuentra en un desplazamiento similar que la del disolvente residual. El comparativo de los grupos funcionales y las señales observadas en los

análisis espectroscópicos con la información reportada, incluyéndose bases de datos como el Diccionario de Productos Naturales, Reaxys y SciFinder⁵⁸⁻⁶⁰ permitió relacionar el compuesto **1** con la nigrosporapirona B, reportada en 2009 por Trisuwan y colaboradores⁴⁸, la cual posee un sistema anular bicíclico de tipo decalina y un ciclo tipo α -pirona. Las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales adquiridos en DMSO-*d*₆ (COSY, HSQC y HMBC) ayudaron a determinar la posición de los sustituyentes en la decalina, la cual se encuentra sustituida en la posición C-2 y C-6 por un metilo y un hidroxilo (δ_H/δ_C 0.92/34.1 y 4.61/71.5), respectivamente; la presencia de un doble enlace *cis* ($J \sim 10$) entre los carbonos C-3 y C-4, así mismo, en la α -pirona la presencia de una cadena de hidroxietilo unida a una amina (δ_H/δ_H 3.49/10.54). Las correlaciones observadas en el espectro de HMBC permitieron la elucidación del motivo piránico, así como la posición de la cadena de aminohidroxietilo y del grupo funcional aldehído en los carbonos C-13 y C-14 (δ_H/δ_C 9.78/93.8 y 10.54/93.8) respectivamente.



Nigrosporapirona B (**1**)

Tabla 7. Datos espectroscópicos de la nigrosporapirona B (**1**) adquiridos en DMSO-*d*6 (^1H y ^{13}C 700 MHz).

Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult. (<i>J</i> en Hz)
1	46.9	2.43, d (7.8)
2	34.1	2.43, d (7.8)
3	131.0	5.53, d (10.1)
4	130.1	5.99, dd, (9.6, 3.9)
5	44.0	1.90, ddd (10.0, 4.7)
6	71.5	3.31
6-OH		4.61, d, (5.4)
7	35.8	1.14, qd, (12.4, 4.9) 1.81, dd, (12.5, 3.8)
8	19.4	1.40, m
9	27.7	1.31, t (4.1)
10	36.1	2.14, m
11	163.3	
12	97.1	6.59, s
13	159.7	
14	93.8	
15	170.0	
16	19.8	0.92, d, (6.7)
17	189.4	9.78, s
18	45.0	3.49, q, (5.5)
18-NHR		10.54, t, (5.7)
19	59.4	3.57, q, (5.2)
19-OH		4.98, t, (5.1)

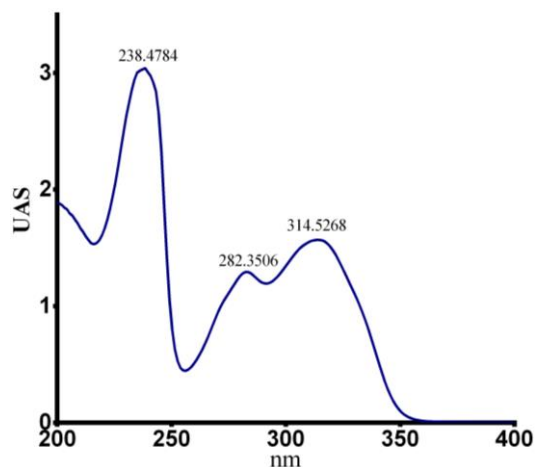


Figura 11. Espectro UV de nigrosporapirona B (**1**).

De acuerdo con el análisis NOESY, así como los valores de las constantes de acoplamiento ($J_{1,2} = 9.9$ Hz, $J_{1,10} = 12.0$ Hz y $J_{5-10} = 3.8$ Hz) obtenidas en el análisis de RMN- ^1H , de los experimentos adquiridos en CDCl_3 , se propone que el ciclohexano insaturado existe en una conformación de *pseudo*-bote, con los hidrógenos de la unión anular del biciclo de tipo decalina (H-5 y H-10) en configuración *cis* (**Figura 12**).^{44,48} En cuanto a la disposición de los protones H-3 y H-4 de la insaturación en la

decalina (5.53 y 5.99 ppm, respectivamente), se aprecia su correlación con una constante de acoplamiento de ~10 Hz debido a la relación *cis* que guardan. Con base en esta información, y la correlación NOE observada entre los hidrógenos del metino base de oxígeno H-6 con H-1, la configuración relativa del producto se estableció como se ilustra en la **Figura 12**.

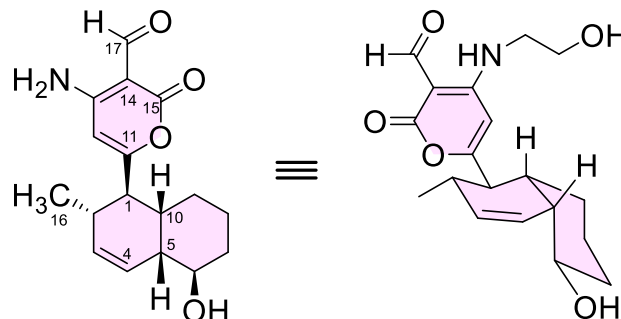


Figura 12. Configuración relativa de **1**.

La comparación de los desplazamientos en RMN-¹H de **1** en CDCl₃ con el único reporte de la nigrosporapirona B (**Tabla 8**) corroboran su identidad.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de la nigrosporapirona B (**1**) adquiridos en CDCl₃.

Posición	δ_c		δ_H m, (J en Hz)	
	Referencia (300 MHz)	Aislado (700 MHz)	Referencia (300 MHz)	Aislado (700 MHz)
1	48.5	48.4	2.24, dd (12.0, 9.9)	2.24, dd (12.0, 9.9)
2	34.6	34.5	2.63, m	2.63, m
3	132.5	132.4	5.62, d (10.2)	5.62, dt (10.1, 1.7)
4	128.3	128.2	6.04, ddd (10.2, 4.8, 2.4)	6.03, ddd (10.1, 5.1, 2.5)
5	44.2	44.1	2.02, m	2.03, dddd (11.6, 5.0, 3.8, 1.6)
6	73.8	73.7	3.46, m	3.48, td (10.3, 4.3)
7	35.4	35.3	1.30, m	1.28, dd (11.1, 2.8)
			1.96, m	1.97, m
8	27.9	20.1	1.46, m	1.32, m
			1.46, m	1.59, m
9	20.1	27.8	1.32, m	1.45, m
10	36.3	36.2	2.41, m	2.40, dq (11.7, 4.1)
11	175.0	163.9		
12	96.1	96.0	5.97, s	5.96, s
13	171.5	160.4		
14	94.9	94.8		
15	160.5	171.3		
16	20.2	20.1	0.98, d (6.9)	0.98, d (7.1)
17	191.3	191.2	9.98, s	9.98, s
18	44.9	44.8	3.54, q (5.4)	3.53, qd (5.1, 1.3)
18-NHR			10.85	10.84, brd
19	61.1	61.0	3.89, t (5.4)	3.89, t (5.2)

Datos de nigrosporapirona B de referencia adquiridos a 300 MHz en CDCl₃ por Trisuwan y colaboradores en 2009⁴⁸.

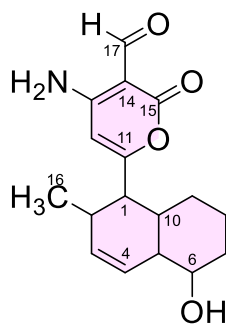
7.1.3 Elucidación estructural del compuesto 2

De la fracción FS9 se aisló el compuesto **2**, al cual se le determinó la fórmula mínima $C_{17}H_{21}NO_4$ con base en la relación m/z del ion molecular adquirido por espectrometría de masa de alta resolución DART en modo positivo, a partir de esta se calculó un grado de insaturación de ocho (**Tabla 9**). De acuerdo con el máximo de absorción UV a 274 (**Figura 13**) se observó la presencia de un carbonilo alfa-beta insaturado a 1661cm^{-1} y un aldehído, en concordancia con las señales a 2927 y 2857cm^{-1} vistas en el espectro de absorción IR, en este también se aprecia una señal ancha a 3349cm^{-1} característica del grupo funcional hidroxilo, así como una señal ligeramente menos intensa a 3210cm^{-1} que en complemento con la señal a 1607cm^{-1} dilucidan la presencia de una amina dentro de la molécula.

Tabla 9. Datos espectrométricos obtenidos mediante EM-AR-DART para el compuesto **2**.

Compuesto	m/z $[M+H]^+$ exp.	m/z $[M+H]^+$ calc.	Fórmula	Δ	Ω
2	304.15580	304.15488	$C_{17}H_{22}NO_4$	3.02	8

En general, con la información obtenida de los análisis de EM-AR-DART, espectros de UV, IR, así como los desplazamientos en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Tabla 10**), las correlaciones presentadas en los espectros bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) y un comparativo con las señales del compuesto **1**, se determinó la estructura del compuesto **2**, un nuevo producto natural, al cual se le asignó el nombre trivial de nigrosporapirona E.



Nigrosporapirona E (**2**)

Tabla 10. Datos espectroscópicos de la nigrosporapirona E (2) adquiridos en DMSO-*d*₆ (¹H y ¹³C 700 MHz).

Posición	δ _C	δ _H , mult. (J en Hz)
1	46.5	2.34, dd, (11.7,10.0)
2	34.0	2.39, m
3	130.8	5.52, dt, (10.1, 1.7)
4	130.0	5.98, ddd, (10.1, 5.0, 2.5)
5	43.9	1.90, ddd, (10.0, 5.0)
6	71.3	3.34
6-OH		4.58, d, (5.5)
7	35.7	1.13, qd, (12.5, 3.6)
		1.80, m
8	19.6	1.32, m
		1.43, m
9	27.6	1.32, m
10	36.0	2.11, dq (11.6, 4.8)
11	163.4	
12	100.5	6.06, s
13	160.1	
13-NH ₂		8.69, d, (3.0)
		9.44, d, (2.8)
14	94.0	
15	168.8	
16	19.8	0.92, d, (6.9)
17	189.4	9.81, s

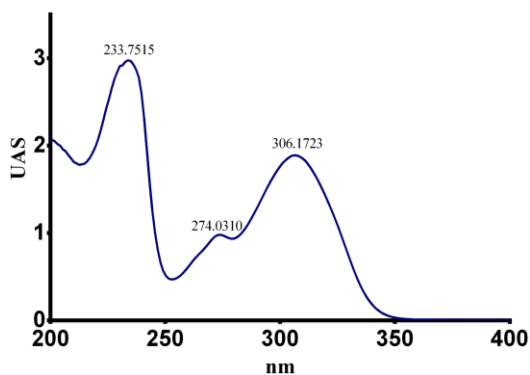


Figura 13. Espectro UV de nigrosporapirona E (2).

El espectro de RMN-¹³C adquirido en DMSO-*d*₆, muestra la presencia de 17 carbonos, de los cuales se pueden destacar el observado a 189.4 ppm, desplazamiento característico para carbonos pertenecientes a un grupo carbonilo, así como las señales observadas a 71.3 y 19.8 ppm para un carbono base oxígeno y un metilo respectivamente. Los desplazamientos observados en el espectro de RMN ¹H indicaron la presencia de un grupo aldehído (δ_H 9.81), un grupo hidroxilo (δ_H 4.58) y un

metilo (δ_H 0.92) en la molécula; las señales con desplazamientos 8.69 y 9.44 ppm, se asignaron a los hidrógenos de la enamina, los cuales tienen distinto desplazamiento.

Con base en las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales (COSY y HMBC) adquiridos en DMSO- d_6 y las constantes de acoplamiento, se determinó la presencia de un biciclo decalina, principalmente por la correlación COSY de las señales entre los protones a 1.90 (H-5) y 2.11 (H-10) ppm, 5.98 (H-4) y 3.34 (H-6), 2.34 (H-1) y 2.11 (H-10), así como 2.11 (H-10) y 1.32 (H-9) ppm presentes en el núcleo. Este biciclo se encuentra sustituido por un metilo en C-2, ya que en el espectro bidimensional COSY se observó una correlación entre los protones a 2.39 (H-2) y 0.92 (H-1) ppm. Por otro lado, se determinó que el C-6 está sustituido con un grupo hidroxilo, debido a la correlación observada entre las de los hidrógenos a 3.34 (H-6) y 4.58 (-OH) ppm, así como el desplazamiento 71.3 ppm en el espectro de RMN- ^{13}C perteneciente a un metino base oxígeno; de igual forma se estableció la existencia de una insaturación entre los carbonos C-3 y C-4 (δ_C/δ_H 130.8/5.52 y 130.0/5.98 ppm). Siguiendo las correlaciones observadas en el espectro de HMBC se logró determinar la sustitución del núcleo de α -pirona la cual viene acompañada de un aldehído en C-14 de la molécula y una amina primaria en C-13.

Con ayuda del espectro de RMN bidimensional NOESY y las constantes de acoplamiento ($J_{1,2}= 10.0$ Hz, $J_{1,10}= 11.7$ Hz y $J_{5-10}= 5.0$ Hz) obtenidas en el análisis de RMN- 1H , adquiridos en $CDCl_3$ y DMSO- d_6 , se propone que la configuración relativa para los protones H-5 y H-10 del biciclo de decalina se encuentra en configuración *cis*, así como la conformación del ciclohexano insaturado correspondiente de *pseudo-bote*.^{44,48} La disposición de los hidrógenos en 5.52 (H-3) y 5.98 (H-4) ppm de la insaturación se estableció como *cis* con base en el valor de la constante de acoplamiento de 10.1 Hz observada en el espectro de RMN- 1H . Con base en el análisis de las correlaciones NOE y los valores de las constantes de acoplamiento, la configuración relativa del producto **2** se propone como se muestra en la **Figura 14**.

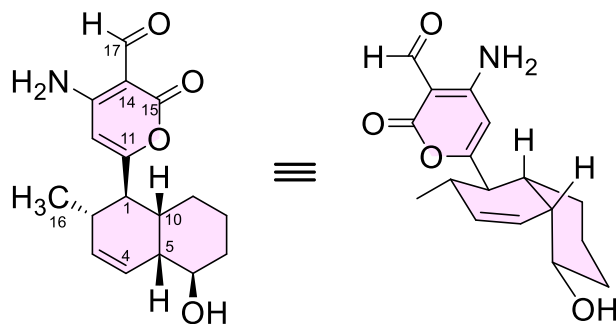


Figura 14. Configuración relativa de **2**.

7.1.4 Ruta biosintética de la nigrosporapirona B y E

Con base en las investigaciones previas sobre los análogos estructurales de **1** y **2**, se propone que su biosíntesis se lleva a cabo por la ruta de los policétidos (**Figura 13**).⁶¹ De acuerdo con la bibliografía, la biosíntesis se inicia con la condensación de ocho unidades de acetato y dos de metionina⁶², dando paso a la formación de un análogo de prosolanapirona II que está sustituido por un hidroxilo en el C-11, la cual da lugar a la oxidación del motivo CH₂OH y la decalina por una reacción intramolecular tipo Diels-Alder en posición *exo*,^{63,64} catalizada por una enzima Diels-Alderasa. El producto de la reacción *endo* da origen a un producto no enzimático en el que tanto el metilo de la posición C-2 como la pirona en C-1 tienen una orientación β , como en el caso de las solanapironas D y E.^{44,65} El compuesto **1** es producto de la reacción del 2-aminoetanol con la nigrosporapirona A, la cadena de aminohidroxietilo se adiciona en la posición C-13 a través de un ataque nucleofílico por parte del nitrógeno, de forma similar a como ocurre la biosíntesis de solanopirona C.⁴⁴ El compuesto **2** es producto de la reacción de amoníaco con la nigrosporapirona A, el grupo amina se adiciona en posición C-13 a través de un ataque nucleofílico por parte del nitrógeno.⁶⁶

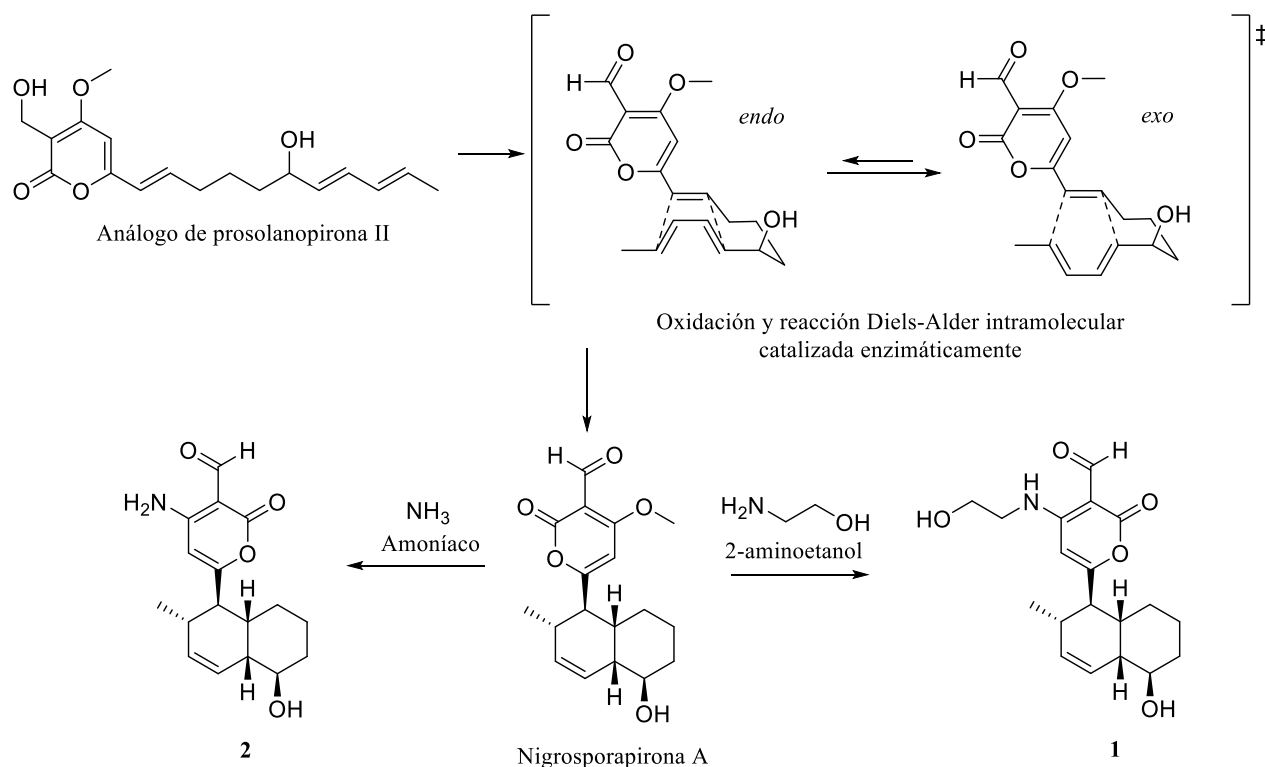


Figura 15. Ruta biosintética propuesta para los compuestos **1** y **2**.

8 CONCLUSIONES

Se destaca la importancia de dar continuidad a los estudios de bioprospección, como se dispuso en este trabajo al abordar el aislamiento de los metabolitos secundarios de un hongo, descrito con anterioridad como notable por la inhibición de un blanco molecular de interés reciente para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la DM2. Este trabajo es una contribución nueva al conocimiento químico de los hongos asociados a manglares hallados en la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México.

El estudio químico de *Nigrospora* sp. cepa IQ-064 permitió el aislamiento e identificación de dos compuestos mayoritarios de su extracto orgánico: la conocida nigrosporapirona B (**1**) y el producto nuevo nigrosporapirona E (**2**). Los compuestos aislados fueron caracterizados químicamente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, sin embargo, se determinó que no son los responsables de la actividad inhibitoria de la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ asociada al extracto, en consecuencia, la búsqueda de los metabolitos secundarios bioactivos debería mantenerse en consideración de los resultados reportados en este trabajo, al mismo tiempo que se abre la posibilidad de continuar con el aislamiento de nigrosporapironas novedosas. A partir del subfraccionamiento del extracto se presume que los compuestos bioactivos se hallan en mezclas de bajo rendimiento y un perfil cromatográfico complejo.

9 PERSPECTIVAS

- Determinar la configuración absoluta de los compuestos **1** y **2** mediante análisis de dicroísmo circular electrónico.
- Continuar con el estudio químico del hongo IQ-064, tomando en consideración las dificultades asociadas a la disponibilidad de sus metabolitos secundarios en el extracto. Al respecto, el aislamiento de sus constituyentes bioactivos continúa pendiente, así como la exploración de potenciales nigrosporapironas novedosas.
- Basados en los reportes previos, estudiar la actividad antibiótica de las nigrosporapironas aisladas.
- Por su similitud estructural con las estatinas, medicamentos administrados para reducir los niveles sanguíneos de colesterol en humanos, determinar su capacidad para inhibir *in vitro* o *in silico* a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima (HMG-CoA) reductasa, implicada en la síntesis endógena de colesterol.

10 REFERENCIAS

- (1) International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 10th edition.; 2021.
- (2) Zheng, Y.; Ley, S. H.; Hu, F. B. Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group 2018, pp 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>.
- (3) Singh, S.; Singh Grewal, A.; Grover, R.; Sharma, N.; Chopra, B.; Kumar Dhingra, A.; Arora, S.; Redhu, S.; Lather, V. Recent Updates on Development of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Treatment of Diabetes, Obesity and Related Disorders. *Bioorg Chem* **2022**, *121*, 105626. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>.
- (4) Kerru, N.; Singh-Pillay, A.; Awolade, P.; Singh, P. Current Anti-Diabetic Agents and Their Molecular Targets: A Review. *Med Chem (Los Angeles)* **2018**, *152*, 436–488. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.061>.
- (5) Liu, R.; Mathieu, C.; Berthelet, J.; Zhang, W.; Dupret, J.-M.; Rodrigues Lima, F. Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): From Structure to Clinical Inhibitor Perspectives. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (13), 7027. <https://doi.org/10.3390/ijms23137027>.
- (6) Krishnan, N.; Konidaris, K. F.; Gasser, G.; Tonks, N. K. A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the Protein-Tyrosine Phosphatase PTP1B Improves Insulin and Leptin Signaling in Animal Models. *Biol Chem* **2018**, *293* (5), 1517–1525. <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.819110>.
- (7) Liu, Z.; Gao, H.; Zhao, Z.; Huang, M.; Wang, S.; Zhan, J. Status of Research on Natural Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors as Potential Antidiabetic Agents: Update. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2023**, *157*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113990>.
- (8) Omokhefe Bruce, S. *Secondary Metabolites from Natural Products*; IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102222>.
- (9) Avalos, J.; Limón, M. C. Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia*; 2021; Vol. 2, pp 1–13. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001>.
- (10) Lumbreras Martínez, H.; Espinoza, C.; Fernández, J. J.; Norte, M.; Lagunes, I.; Padrón, J. M.; López-Portillo, J.; Trigos, Á. Bioprospecting of Fungi with Antiproliferative Activity from the

- Mangrove Sediment of the Tampamachoco Coastal Lagoon, Veracruz, Mexico. *Sci Fungorum* **2018**, *48*, 53–60. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.48.1234>.
- (11) CONABIO. *Extensión y distribución de manglares-Biodiversidad Mexicana*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/monitoreo/smmm/extensionDist> (revisado el 2023-08-08).
- (12) Goyal R; Singhal M; Jialal I. *Type 2 Diabetes*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>.
- (13) Gutiérrez-Rodelo, C.; Roura-Guiberna Jesús Alberto Olivares-Reyes, A.; Alberto Olivares-Reyes, J. Mecanismos Moleculares de La Resistencia a La Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex* **2017**, *153*, 214–242.
- (14) DeFronzo, R. A.; Ferrannini, E.; Groop, L.; Henry, R. R.; Herman, W. H.; Holst, J. J.; Hu, F. B.; Kahn, C. R.; Raz, I.; Shulman, G. I.; Simonson, D. C.; Testa, M. A.; Weiss, R. Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>.
- (15) Basto-Abreu, A.; López-Olmedo, N.; Rojas-Martínez, R.; Aguilar-Salinas, C. A.; Moreno-Banda, G. L.; Carnalla, M.; Rivera, J. A.; Romero-Martinez, M.; Barquera, S.; Barrientos-Gutiérrez, T. Prevalencia de Prediabetes y Diabetes En México: Ensanut 2022. *Salud Publica Mex* **2023**, *65*, s163–s168. <https://doi.org/10.21149/14832>.
- (16) INEGI. *Estadísticas de Defunciones Registradas de Enero a Junio de 2022 (Preliminar) I*; 2023. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf> (revisado el 2023-07-10).
- (17) Vivó-Barrachina, L.; Rojas-Chacón, M. J.; Navarro-Salazar, R.; Belda-Sanchis, V.; Pérez-Murillo, J.; Peiró-Puig, A.; Herran-González, M.; Pérez-Bermejo, M. The Role of Natural Products on Diabetes Mellitus Treatment: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010101>.
- (18) Mata, R.; Flores-Bocanegra, L.; Ovalle-Magallanes, B.; Figueroa, M. Natural Products from Plants Targeting Key Enzymes for the Future Development of Antidiabetic Agents. *Natural Product Reports*. Royal Society of Chemistry 2023. <https://doi.org/10.1039/d3np00007a>.

- (19) Popov, D. Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors: Interaction Requirements for Improved Intracellular Efficacy in Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity Control. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *410* (3), 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.009>.
- (20) Ruddraraju, K. V.; Zhang, Z.-Y. Covalent Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatases. *Mol Biosyst* **2017**, *13* (7), 1257–1279. <https://doi.org/10.1039/C7MB00151G>.
- (21) Tabernero, L.; Aricescu, A. R.; Jones, E. Y.; Szedlacsek, S. E. Protein Tyrosine Phosphatases: Structure-Function Relationships. *FEBS Journal* **2008**, *275* (5), 867–882. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06251.x>.
- (22) Zhang, S.; Zhang, Z. Y. PTP1B as a Drug Target: Recent Developments in PTP1B Inhibitor Discovery. *Drug Discovery Today*. May 2007, pp 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.03.011>.
- (23) Zinker, B. A.; Rondinone, C. M.; Trevillyan, J. M.; Gum, R. J.; Clampit, J. E.; Waring, J. F.; Xie, N.; Wilcox, D.; Jacobson, P.; Frost, L.; Kroeger, P. E.; Reilly, R. M.; Koterski, S.; Opgenorth, T. J.; Ulrich, R. G.; Crosby, S.; Butler, M.; Murray, S. F.; McKay, R. A.; Bhanot, S.; Monia, B. P.; Jirousek, M. R. PTP1B Antisense Oligonucleotide Lowers PTP1B Protein, Normalizes Blood Glucose, and Improves Insulin Sensitivity in Diabetic Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (17), 11357–11362. <https://doi.org/10.1073/pnas.142298199>.
- (24) Qian, S.; Zhang, M.; He, Y.; Wang, W.; Liu, S. Recent Advances in the Development of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Type 2 Diabetes. *Future Med Chem* **2016**, *8* (11), 1239–1258. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0064>.
- (25) Wang, L.-J.; Jiang, B.; Wu, N.; Wang, S.-Y.; Shi, D.-Y. Natural and Semisynthetic Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitors as Anti-Diabetic Agents. *RSC Adv* **2015**, *5* (60), 48822–48834. <https://doi.org/10.1039/C5RA01754H>.
- (26) Bharatham, K.; Bharatham, N.; Kwon, Y. J.; Lee, K. W. Molecular Dynamics Simulation Study of PTP1B with Allosteric Inhibitor and Its Application in Receptor Based Pharmacophore Modeling. *J Comput Aided Mol Des* **2008**, *22* (12), 925–933. <https://doi.org/10.1007/s10822-008-9229-0>.

- (27) Jiménez-Arreola, B. S.; Aguilar-Ramírez, E.; Cano-Sánchez, P.; Morales-Jiménez, J.; González-Andrade, M.; Medina-Franco, J. L.; Rivera-Chávez, J. Dimeric Phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) Inhibit hPTP1B₁₋₄₀₀: Insights into Mechanistic Kinetics from *in vitro* and *in silico* Studies. *Bioorg Chem* **2020**, *101*. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>.
- (28) 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. Targeting the Disordered C Terminus of PTP1B with an Allosteric Inhibitor. *Nat Chem Biol* **2014**, *10* (7), 558–566. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1528>.
- (29) Mosunova, O.; Navarro-Muñoz, J. C.; Collemare, J. The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. In *Encyclopedia of Mycology*; Elsevier, 2021; pp 458–476. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21072-8>.
- (30) González-Medina, M.; Owen, J. R.; El-Elimat, T.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H.; Figueroa, M.; Medina-Franco, J. L. Scaffold Diversity of Fungal Metabolites. *Front Pharmacol* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00180>.
- (31) Deshmukh, S. K.; Agrawal, S.; Gupta, M. K. Fungal Metabolites: A Potential Source of Antidiabetic Agents with Particular Reference to PTP1B Inhibitors. *Curr Pharm Biotechnol* **2023**, *24* (8), 927–945. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220506104219>.
- (32) Sun, W.; Zhang, B.; Zheng, H.; Zhuang, C.; Li, X.; Lu, X.; Quan, C.; Dong, Y.; Zheng, Z.; Xiu, Z. Trivaric Acid, a New Inhibitor of PTP1b with Potent Beneficial Effect on Diabetes. *Life Sci* **2017**, *169*, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.012>.
- (33) Deshmukh, S. K.; Agrawal, S.; Gupta, M. K. Fungal Metabolites: A Potential Source of Antidiabetic Agents with Particular Reference to PTP1B Inhibitors. *Curr Pharm Biotechnol* **2022**, *24* (8), 927–945. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220506104219>.
- (34) NCBI. *Taxonomy browser*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. (revisado el 2023-08-09).
- (35) Index Fungorum Partnership. *Index Fungorum*. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. (revisado el 2023-08-09).

- (36) Wang, M.; Liu, F.; Crous, P. W.; Cai, L. Phylogenetic Reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous Endophytes, Plant and Human Pathogens. *Persoonia* **2017**, *39*, 118–142. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.06>.
- (37) Xu, T.; Song, Z.; Hou, Y.; Liu, S.; Li, X.; Yang, Q.; Wu, S. Secondary Metabolites of the Genus *Nigrospora* from Terrestrial and Marine Habitats: Chemical Diversity and Biological Activity. *Fitoterapia* **2022**, *161*, 105254. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105254>.
- (38) McGlacken, G. P.; Fairlamb, I. J. S. 2-Pyrone Natural Products and Mimetics: Isolation, Characterisation and Biological Activity. *Nat Prod Rep* **2005**, *22* (3), 369. <https://doi.org/10.1039/b416651p>.
- (39) Jenkins, K. M.; Toske, S. G.; Jensen, P. R.; Fenical, W. Solanapyrones E-G, Antialgal Metabolites Produced by a Marine Fungus. *Phytochemistry* **1998**, *38*.
- (40) Kawabata, J.; Fukushi, E.; Mizutani, J.; Walker, R. P.; Faulkner, D. H.; Engen, D. V.; Clardy, J.; Bandaranayake, W. M.; Banfield, J. E.; Black, D. S. C.; Cane, D. E.; Tan, W.; Ott, W. R.; Sanz-Cervera, J. F.; Glinka, T.; Williams, R.; Oikawa, H.; Murakami, Y.; Ichihara, A.; Baldwin, J. E.; Whitehead, R. C.; Ayukawa, A.; Nomura, T.; Ueda, S.; Naturwis-Senschaften; Nomura, T.; Sakamura, S. First Direct Evidence in Biological Diels-Alder Reaction of Incorporation of Diene-Dienophile Precursors in the Biosynthesis of Solanapyrones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, *116* (2), 600–602.
- (41) Ola, A. R. B.; Lapailaka, T.; Wogo, H. E.; Henuk, J. B. D.; Simamora, A.; Mukkun, L.; Proksch, P.; Pham, C. D. Bioactive Secondary Metabolites from the Mangrove Endophytic Fungi *Nigrospora oryzae*. *Indonesian Journal of Chemistry* **2021**, *21* (4), 1016. <https://doi.org/10.22146/ijc.63129>.
- (42) Fukushima, T.; Tanaka, M.; Gohbara, M.; Fujimori, T. Phytotoxicity of Three Lactones from *Nigrospora sacchari*. *Phytochemistry* **1998**, *48* (4), 625–630. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01023-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01023-6).
- (43) Ichihara, A.; Tazaki, H.; Sakamura, S. Solanapyrones A, B and C, Phytotoxic Metabolites from the Fungus *Alternaria solani*. *Tetrahedron Lett* **1983**, *24* (48), 5373–5376.

- (44) Oikawa, H.; Yokota, T.; Sakano, C.; Suzuki, Y.; Naya, A.; Ichihara, A. Solanapyrones, Phytotoxins Produced by *Alternaria solani*: Biosynthesis and Isolation of Minor Components. *Biosci Biotechnol Biochem* **1998**, *62* (10), 2016–2022. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2016>.
- (45) Luo, D.; Chen, L.-L.; Guo, Z.-Y.; Tu, X.; Deng, Z.-S. Solanapyrone Analogues from the Endophytic Fungus *Nigrospora* sp. *Chem Nat Compd* **2015**, *51* (5), 954–955. <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1459-5>.
- (46) Wu, S. H.; Chen, Y. W.; Shao, S. C.; Wang, L. D.; Yu, Y.; Li, Z. Y.; Yang, L. Y.; Li, S. L.; Huang, R. Two New Solanapyrone Analogues from the Endophytic Fungus *Nigrospora* sp. YB-141 of *Azadirachta Indica*. *Chem Biodivers* **2009**, *6* (1), 79–85. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200700421>.
- (47) Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J. Epoxydons and a Pyrone from the Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *J Nat Prod* **2008**, *71* (8), 1323–1326. <https://doi.org/10.1021/np8002595>.
- (48) Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. Pyrone Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18. *Phytochemistry* **2009**, *70* (4), 554–557. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.008>.
- (49) Qian, S.; Zhang, M.; He, Y.; Wang, W.; Liu, S. Recent Advances in the Development of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Type 2 Diabetes. *Future Med Chem* **2016**, *8* (11), 1239–1258. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0064>.
- (50) Marín, J. G. Propuesta de Un Modelo Computacional Para El Estudio de La Selectividad de Los Inhibidores Alostéricos de PTP1B. *An Real Acad Farm* **2020**, *86*, 99–112.
- (51) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod* **2017**, *80* (3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
- (52) Martínez-Aldino, I. Y.; Villaseca-Murillo, M.; Morales-Jiménez, J.; Rivera-Chávez, J. Absolute Configuration and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity of

Xanthoepocin, a Dimeric Naphtopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429. *Bioorg Chem* **2021**, *115*.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105166>.

- (53) Martínez Aldino Ingrid Yadira. Estudio Químico-Biológico de Ascomicetos Para El Descubrimiento de Moduladores Alostéricos de La Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (*hPTP1B* 1-400) e Inhibidores Del Crecimiento Bacteriano de Cepas Intrahospitalarias. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2023.
- (54) Zheng, X. rong; Liu, C. long; Zhang, M. jiao; Shang, X. lan; Fang, S. zuo; Chen, F. mao. First Report of Leaf Blight of *Cyclocarya paliurus* Caused by *Nigrospora sphaerica* in China. *Crop Protection* **2021**, *140*. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105453>.
- (55) Adusumilli, R.; Mallick, P. Data Conversion with ProteoWizard MsConvert. *Methods Mol Biol* **2017**, *1550*, 339–368. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6_23.
- (56) Mohimani, H.; Gurevich, A.; Shlemov, A.; Mikheenko, A.; Korobeynikov, A.; Cao, L.; Shcherbin, E.; Nothias, L.-F.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P. A. Dereplication of Microbial Metabolites through Database Search of Mass Spectra. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>.
- (57) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapono, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; P, C. A. B.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti,

- J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. O.; Pogliano, K.; Linington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **2016**, *34* (8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- (58) American Chemical Society. *SciFinder*. <https://scifinder-n.cas.org> (revisado el 2023-09-03).
- (59) Elsevier. *Reaxys*. <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/search/quick> (revisado el 2023-09-03).
- (60) Taylor & Francis Group. *Dictionary of Natural Products*. <https://dnp.chemnetbase.com/chemical/ChemicalSearch.xhtml?dswid=-1603> (revisado el 2023-09-03).
- (61) Oikawa, H.; Yokota, T.; Abe, T.; Ichihara, A.; Sakamura, S.; Yoshizawa, Y.; Vederasb, J. C. *Biosynthesis of Solanapyrone A, a Phytotoxin of Alternaria Solani*; 1989.
- (62) Oikawa, H.; Suzuki, Y.; Katayama, K.; Naya, A.; Sakano, C.; Ichihara, A. *Involvement of Diels-Alder Reactions in the Biosynthesis of Secondary Natural Products: The Late Stage of the Biosynthesis of the Phytotoxins Solanapyrones*; 1999.
- (63) Oikawa, H.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A. *Enzymatic Activity Catalysing Exo-Selective Diels-Alder Reaction in Solanapyrone Biosynthesis*; 1995.
- (64) Kasahara, K.; Miyamoto, T.; Fujimoto, T.; Oguri, H.; Tokiwano, T.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y.; Fujii, I. Solanapyrone Synthase, a Possible Diels–Alderase and Iterative Type I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria Solani*. *ChemBioChem* **2010**, *11* (9), 1245–1252. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000173>.
- (65) Katayama, K.; Kobayashi, T.; Chijimatsu, M.; Ichihara, A.; Oikawa, H. Purification and N-Terminal Amino Acid Sequence of Solanapyrone Synthase, a Natural Diels-Alderase from *Alternaria solani*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2008**, *72* (2), 604–607. <https://doi.org/10.1271/bbb.70600>.

- (66) Tominaga Yoshinori; Ushirogochi Atsuyuki; Matsuda Yoshiro. Synthesis and Reaction of 6-Substituted 3-Metoxycarbonyl-4-Metylthio-2H-Pyran-2-One Derivates. *Heterocyclic Chem* **1987**, 1557–1567.

11 ANEXOS

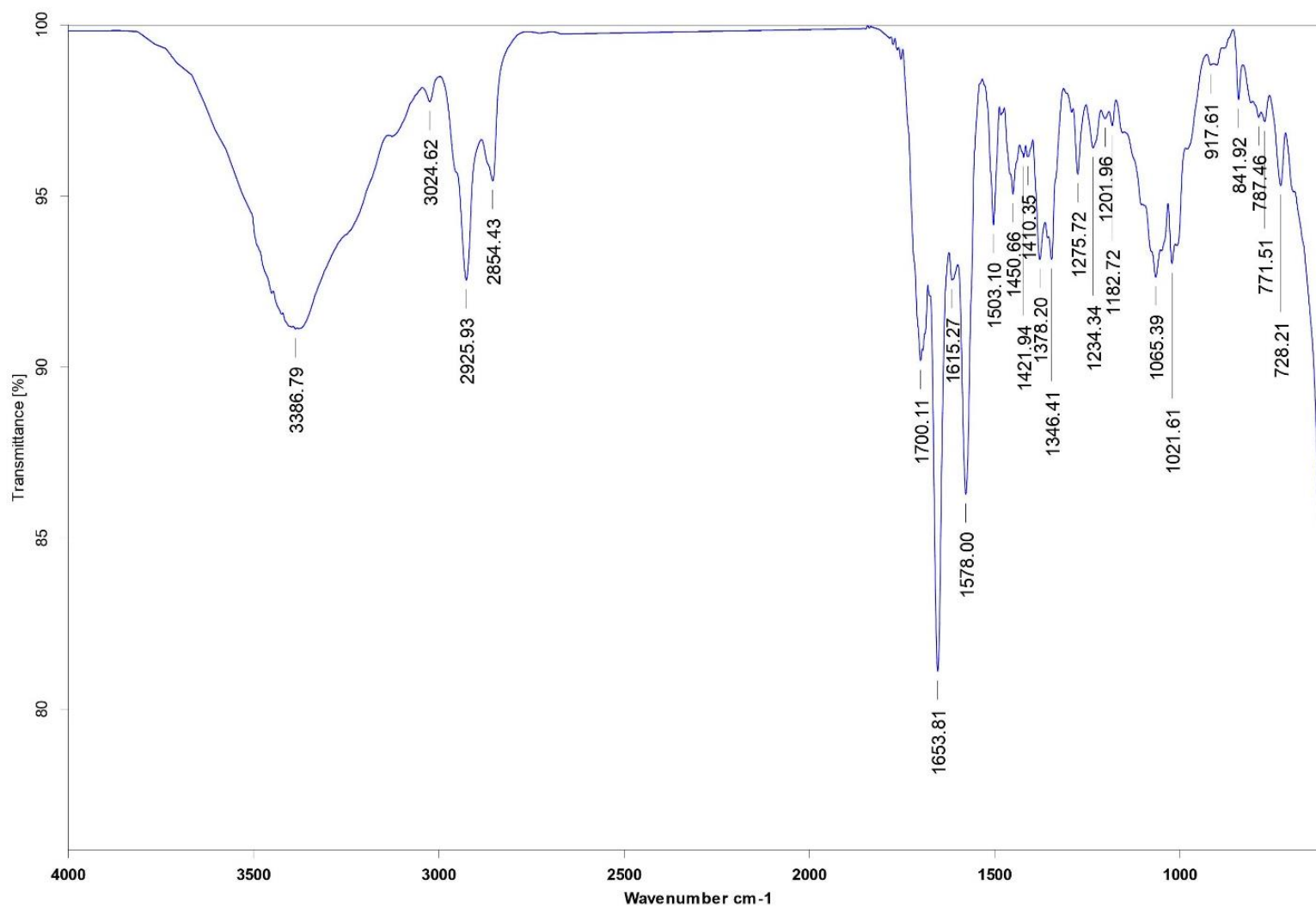


Figura A1. Espectro de IR de Nigrosporapirona B (**1**).

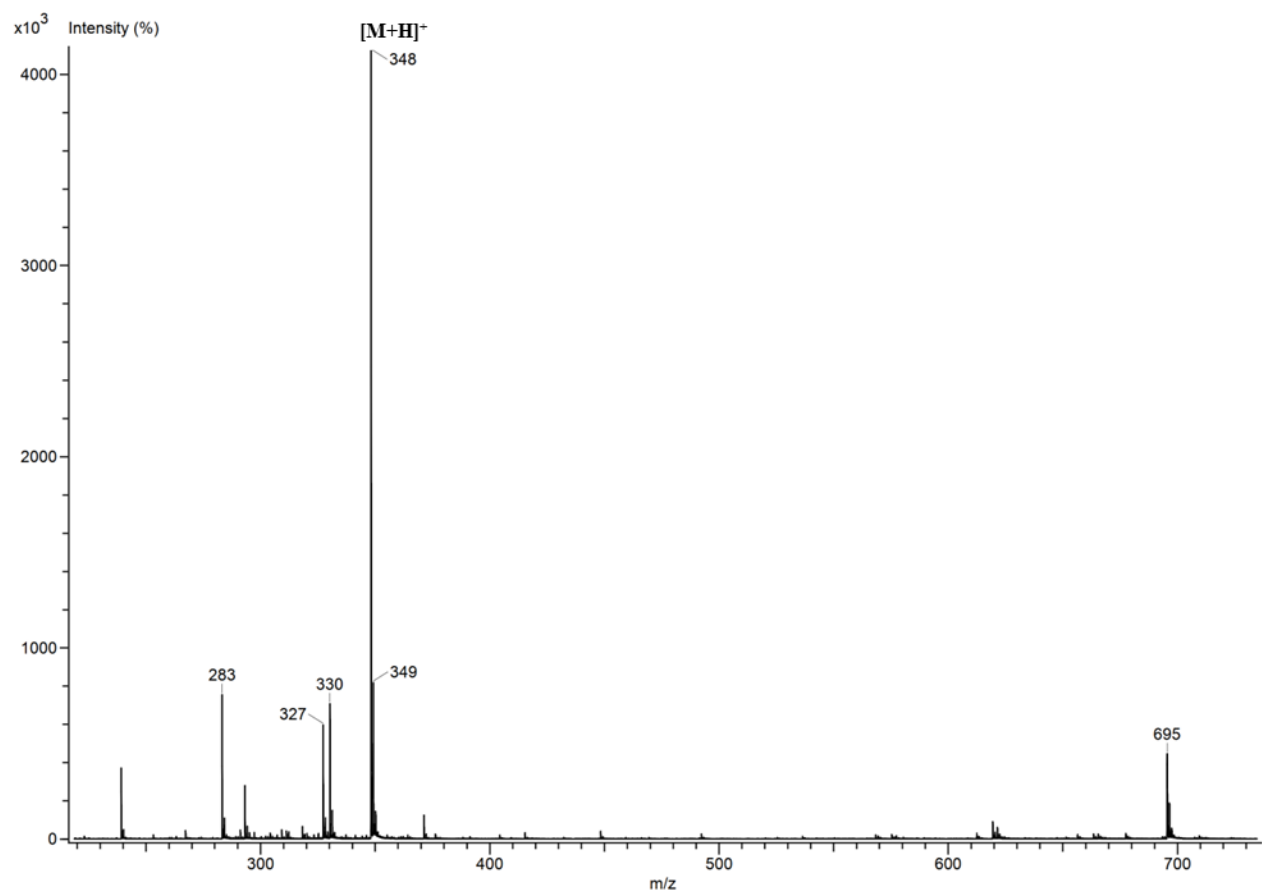


Figura A2. Espectro de masas DART+ de Nigrosporapirona B (1).

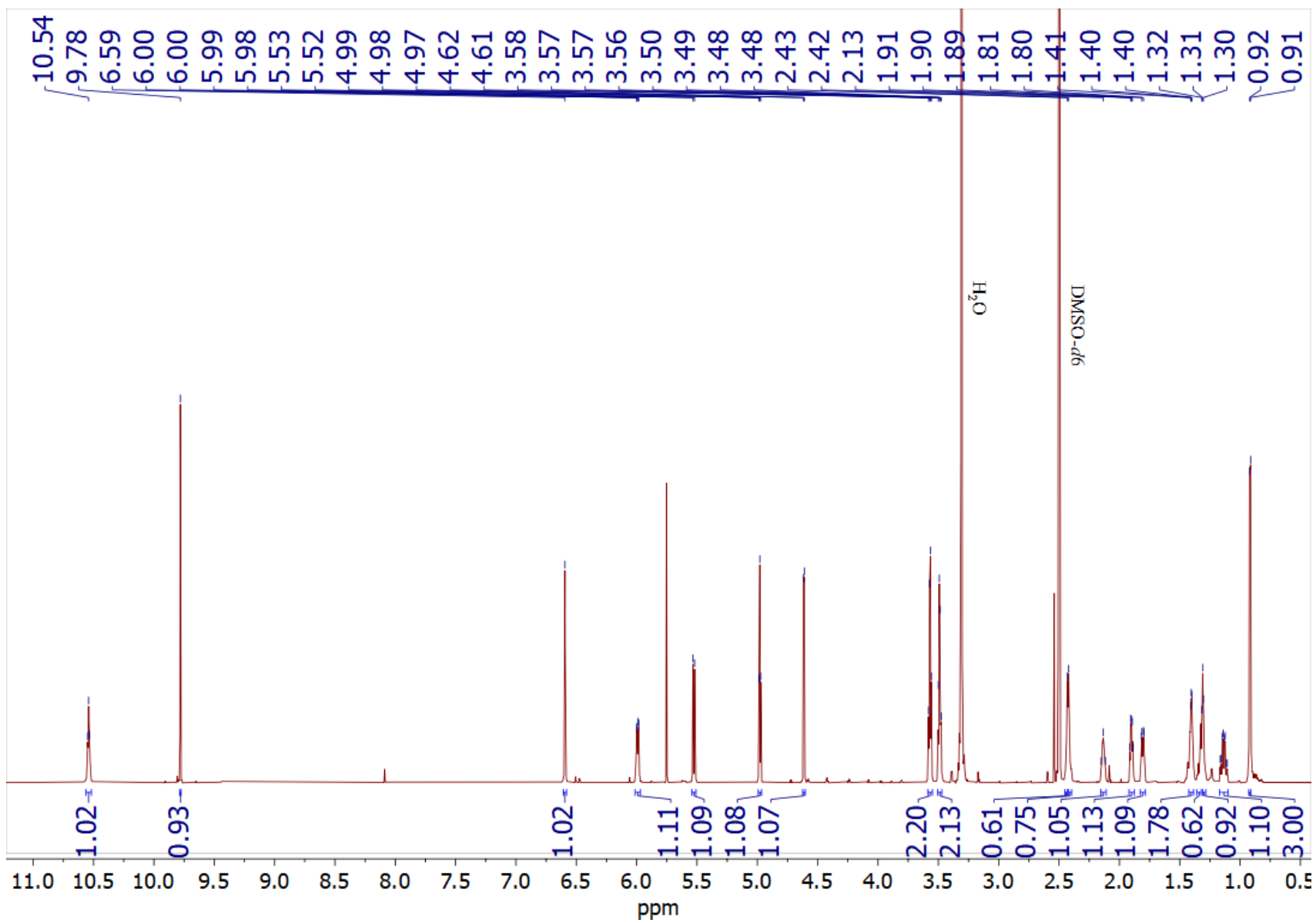


Figura A3. Espectro de RMN ^1H de 700MHz de Nigrosporapirona B (**1**) en DMSO-*d*₆.

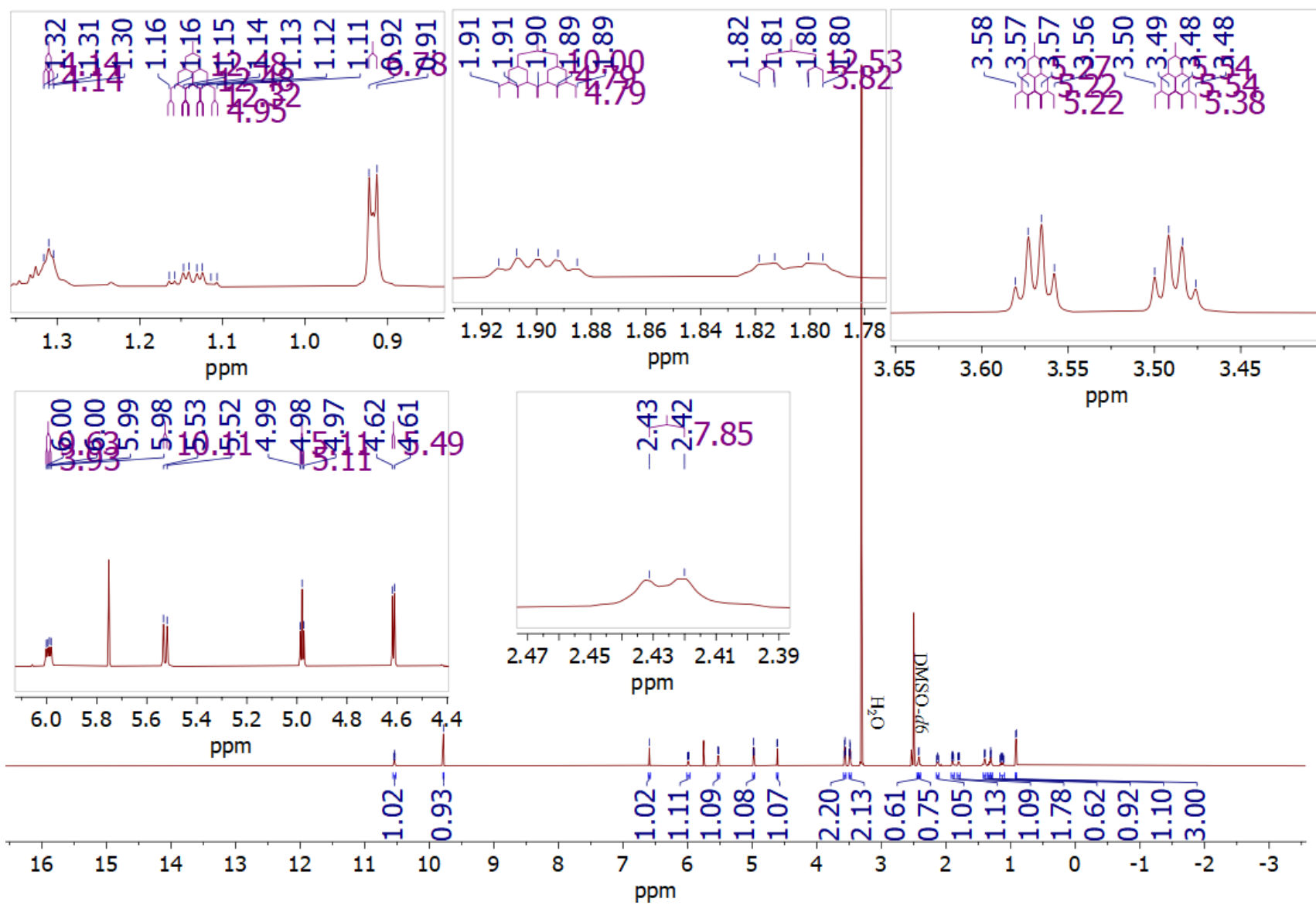


Figura A4. Espectro de RMN ^1H de 700MHz de Nigrosporapirona B (1) en $\text{DMSO-}d_6$.

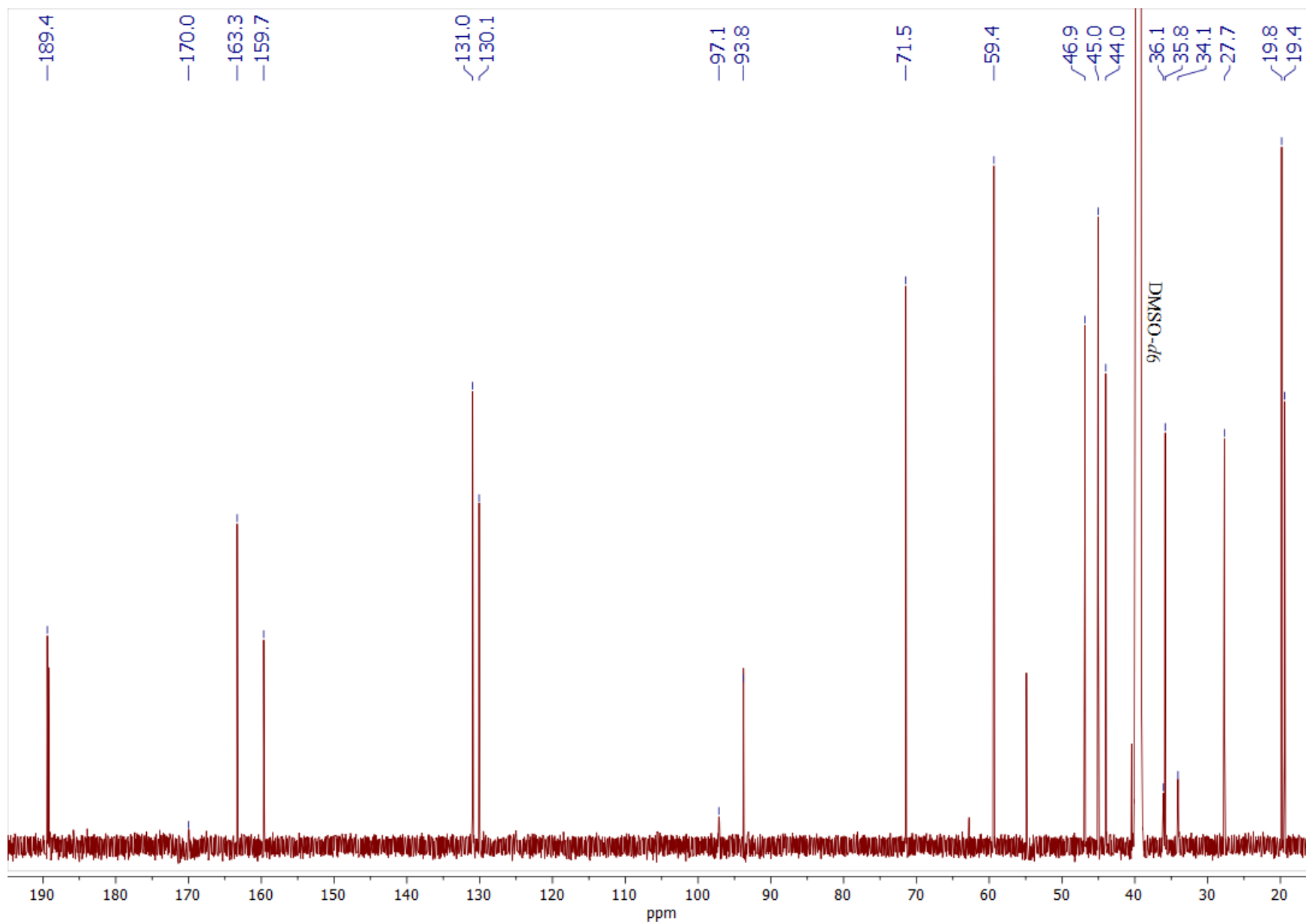


Figura A5. Espectro de RMN ^{13}C de 700MHz de Nigrospirapirone B (**1**) en DMSO-*d*₆.

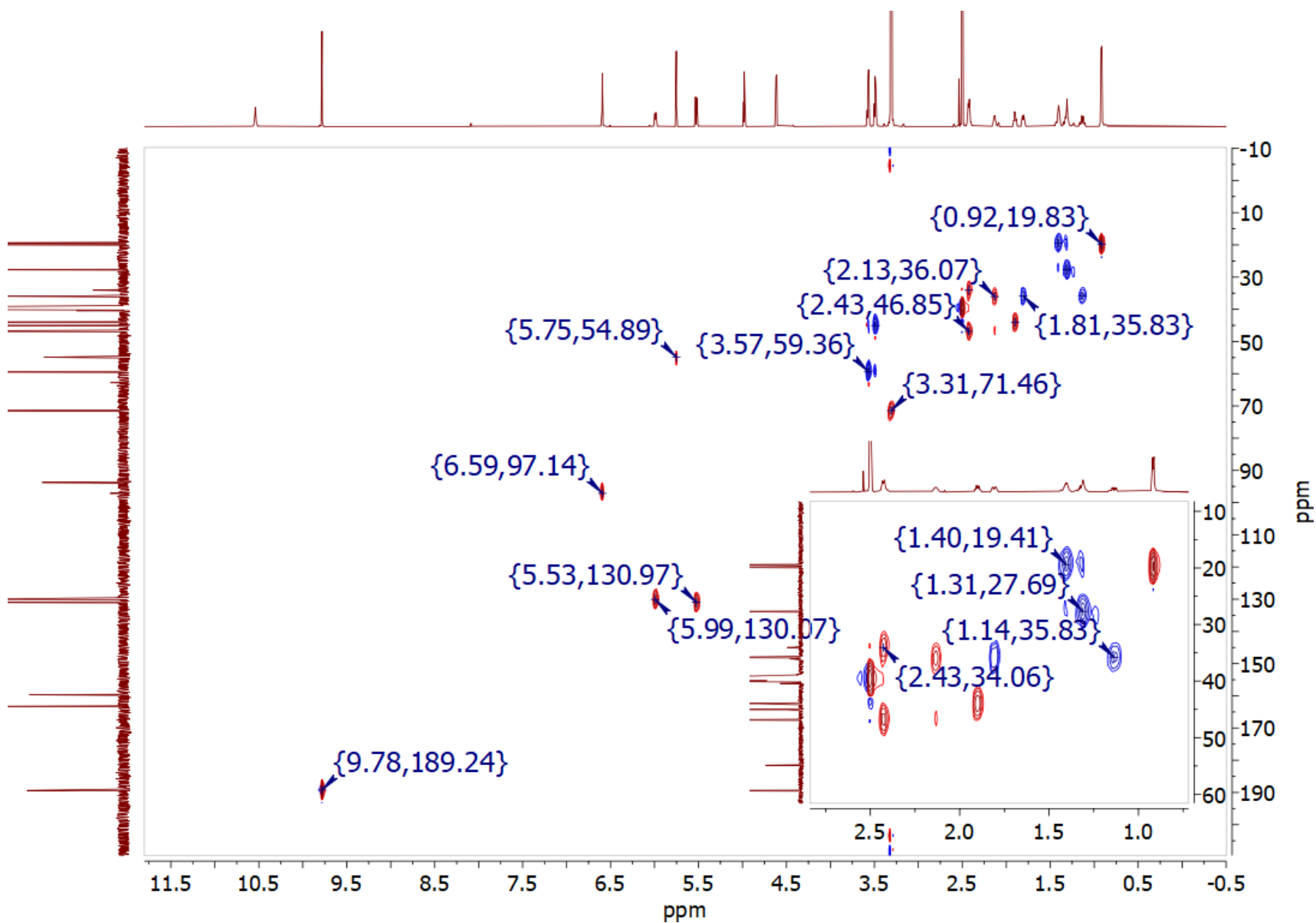


Figura A6. Espectro de RMN HSQC de 700MHz de Nigrosporapirona B (**1**) en DMSO-*d*₆.

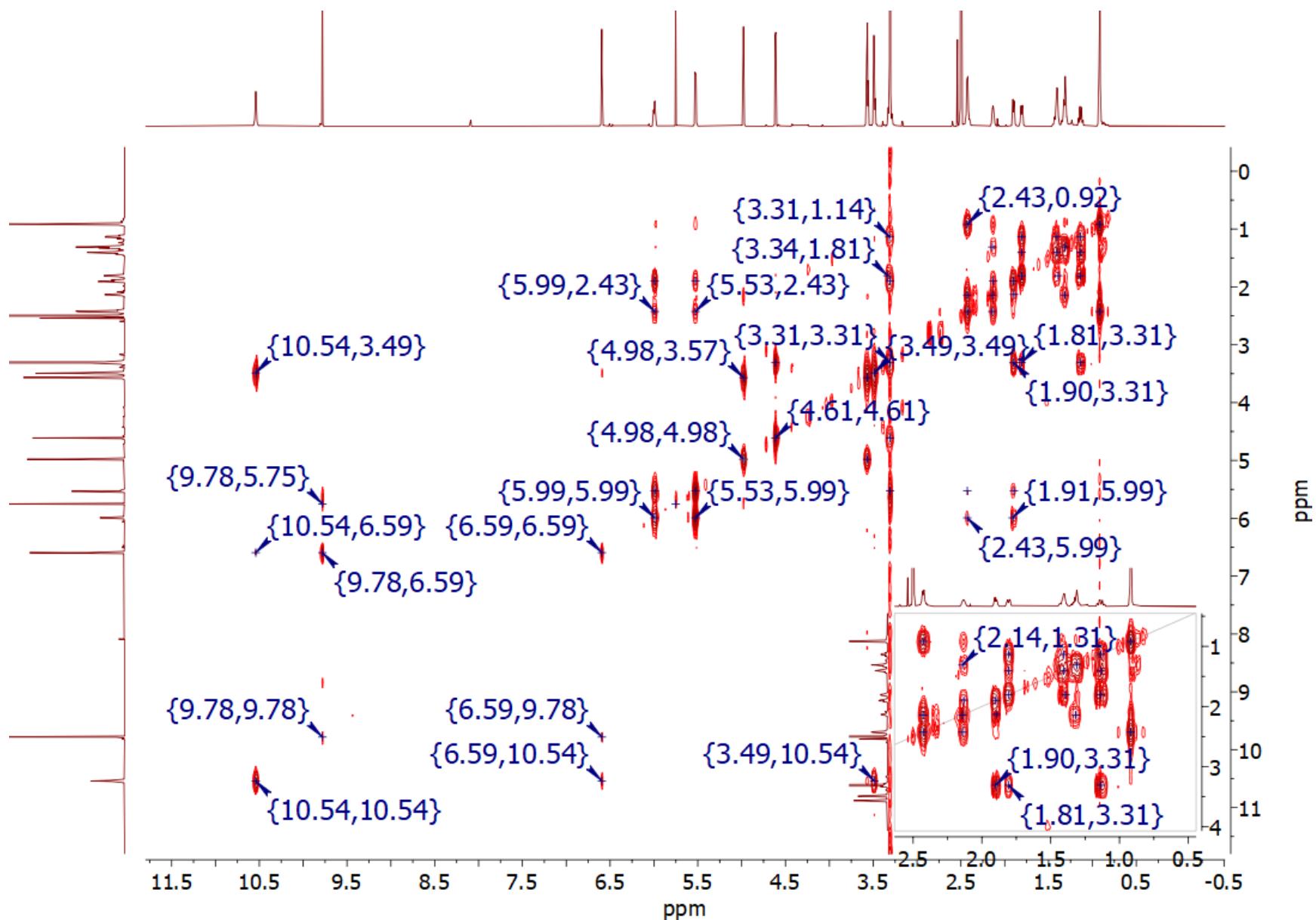


Figura A7. Espectro de RMN COSY de 700MHz de Nigrosporapirona B (1) en DMSO-*d*₆.

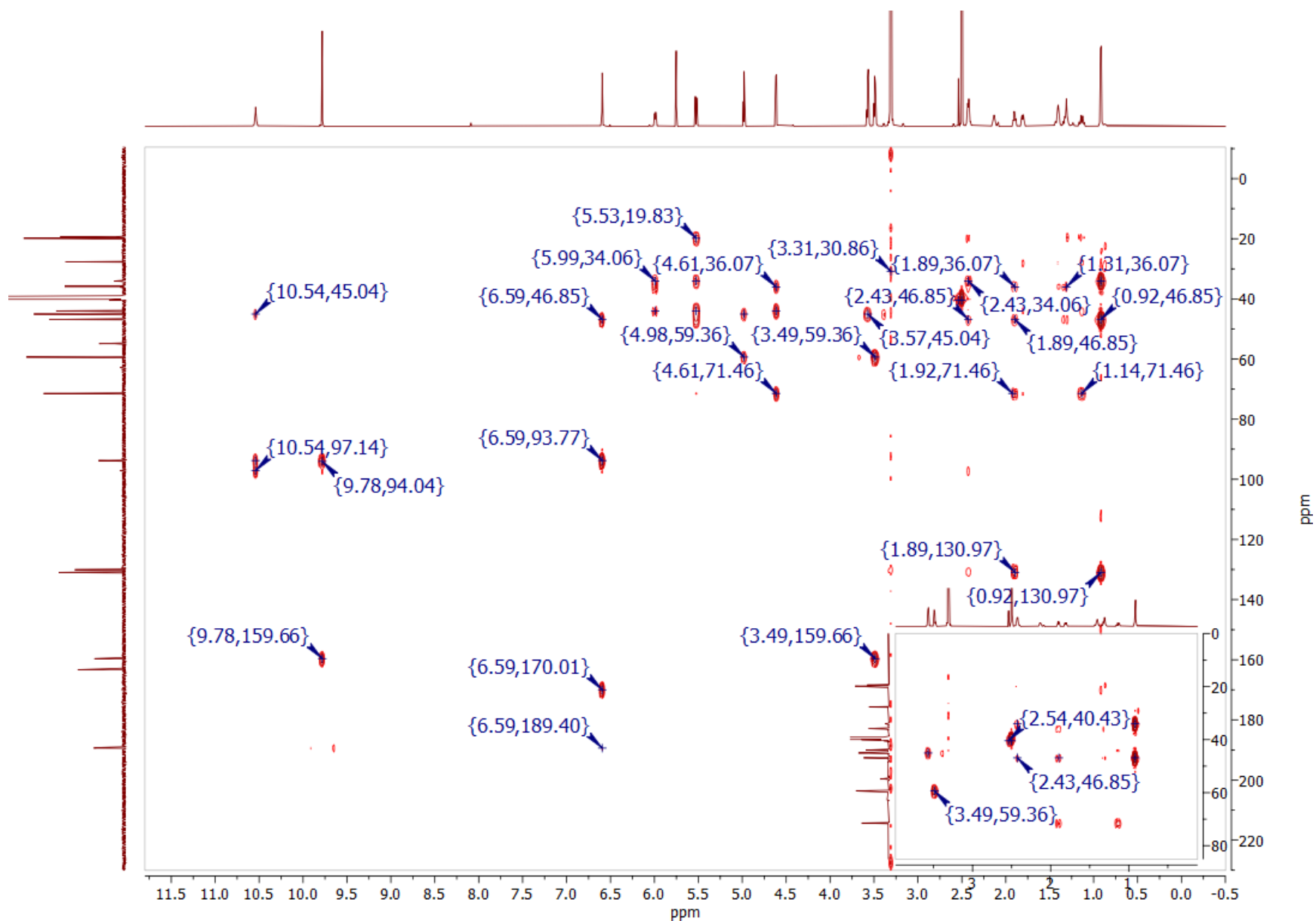


Figura A8. Espectro de RMN HMBC de 700MHz de Nigrosporapirona B (1) en DMSO- d_6 .

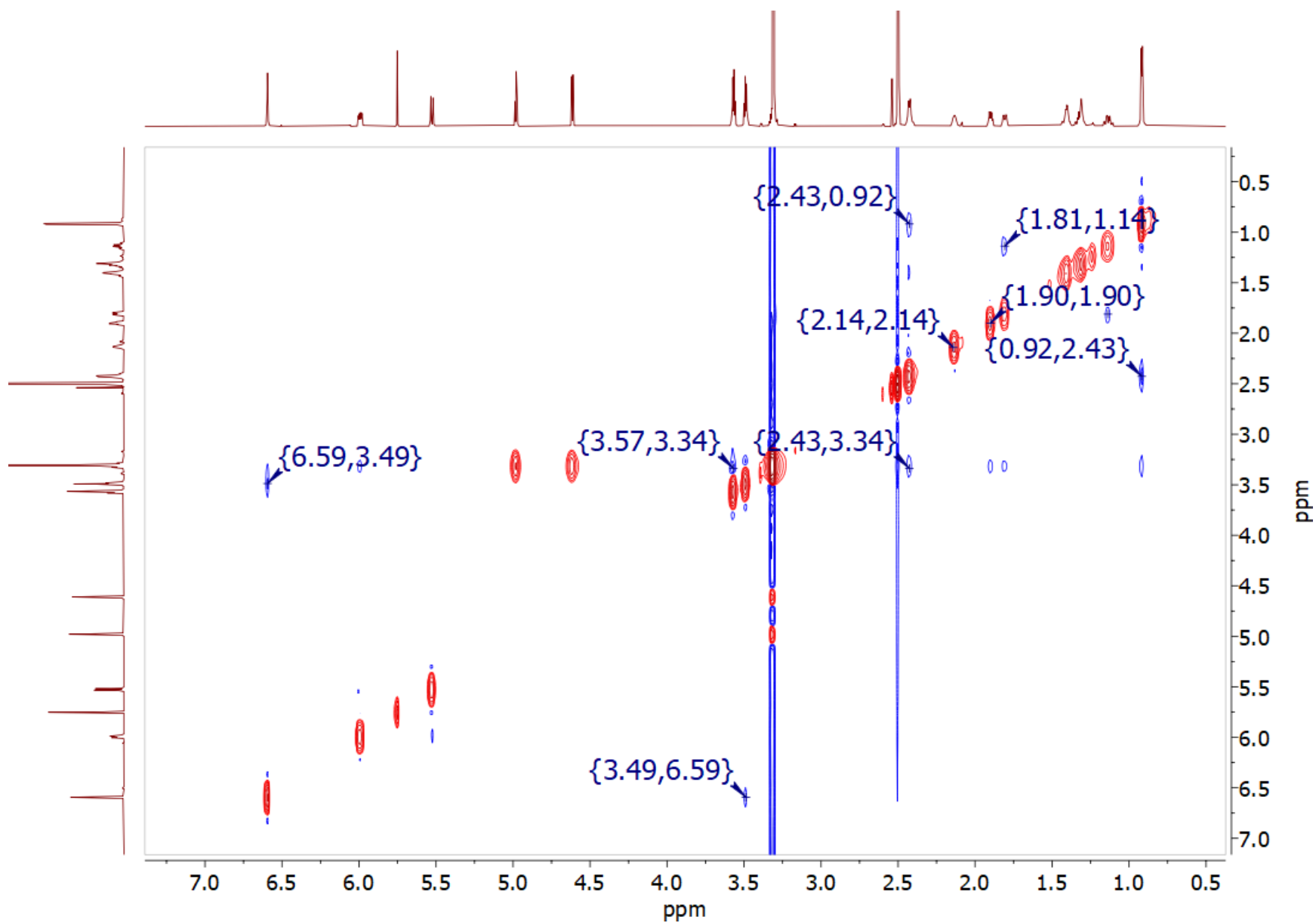


Figura A9. Espectro de RMN NOESY de 700MHz de Nigrosporapirona B (1) en DMSO-*d*₆.

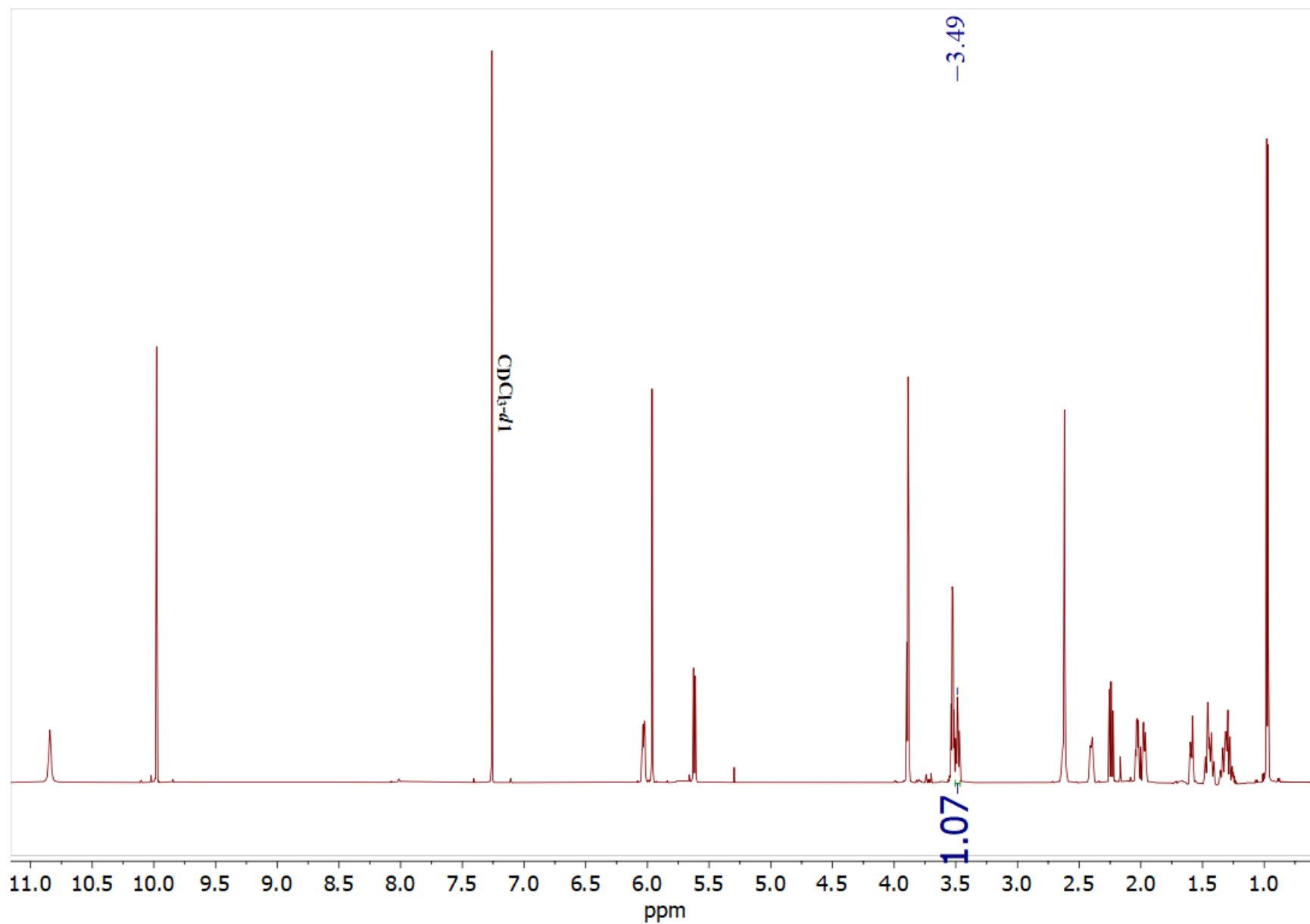


Figura A10. Espectro de RMN ^1H de 700MHz de Nigrosporapirona B (1) en CDCl_3 .

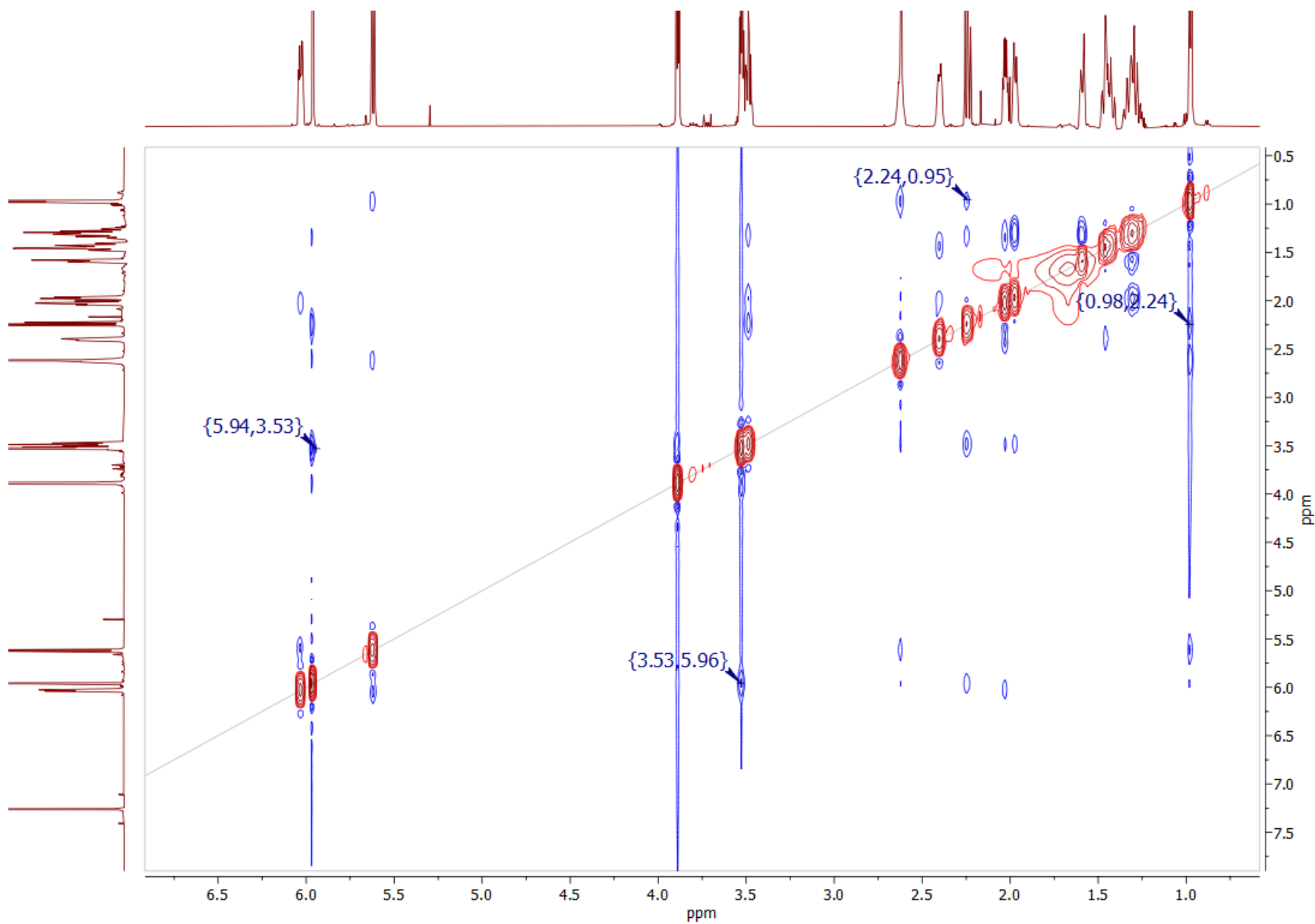


Figura A11. Espectro de RMN NOESY de 700MHz de Nigrosporapirona B (**1**) en CDCl_3 .

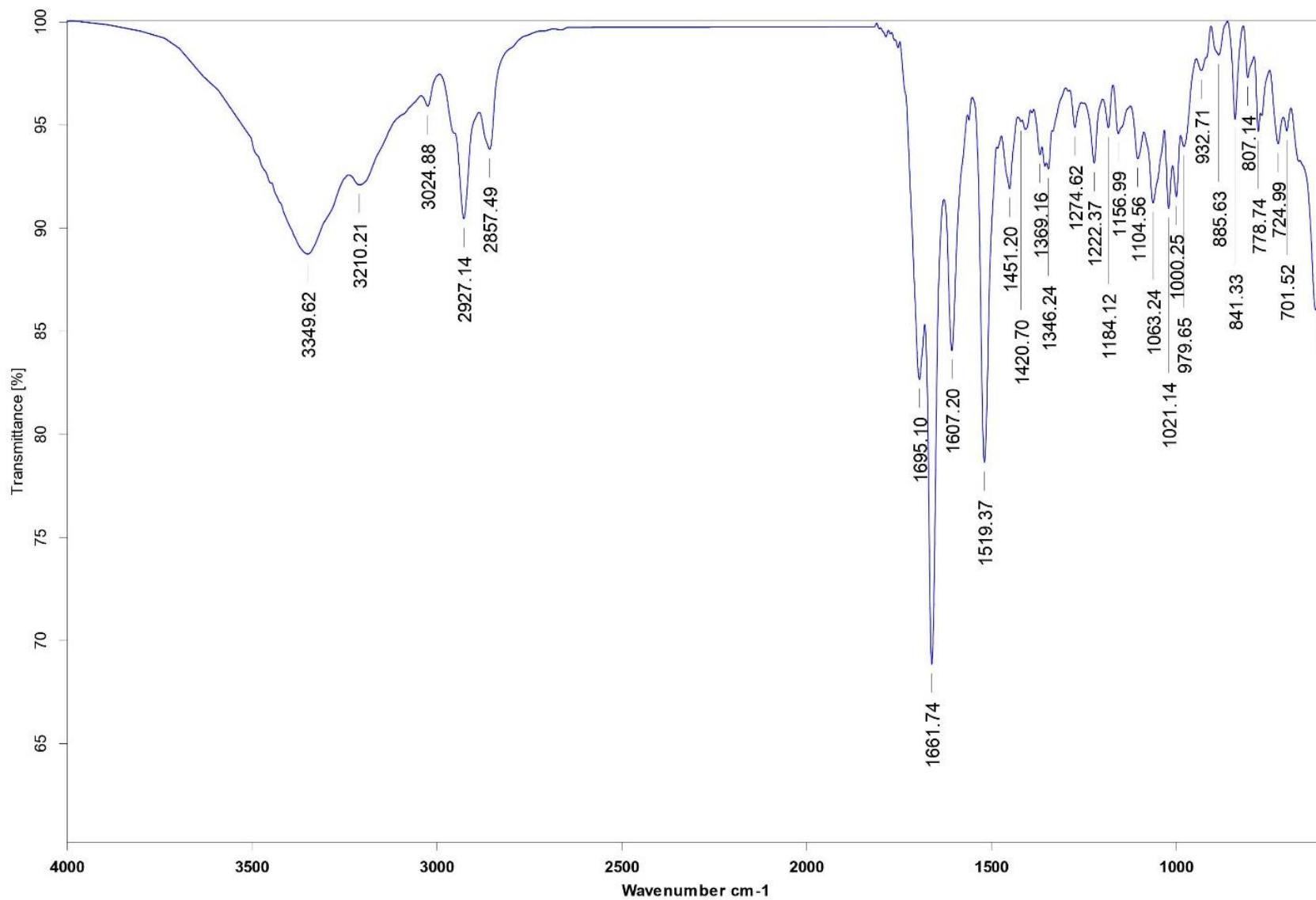


Figura A12. Espectro de IR del Nigrosporapirona E (2).

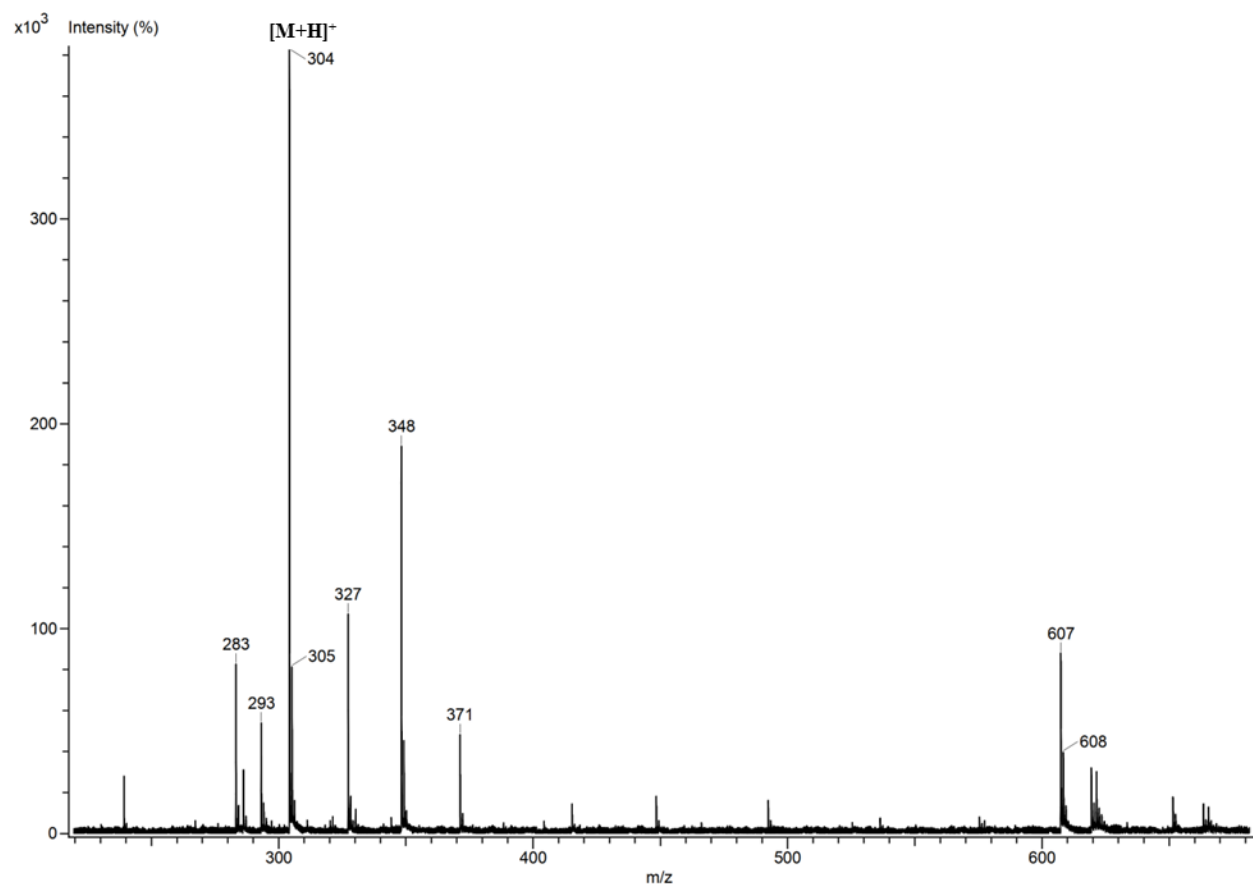


Figura A13. Espectro de masas DART+ de Nigrosporapirona E (2).

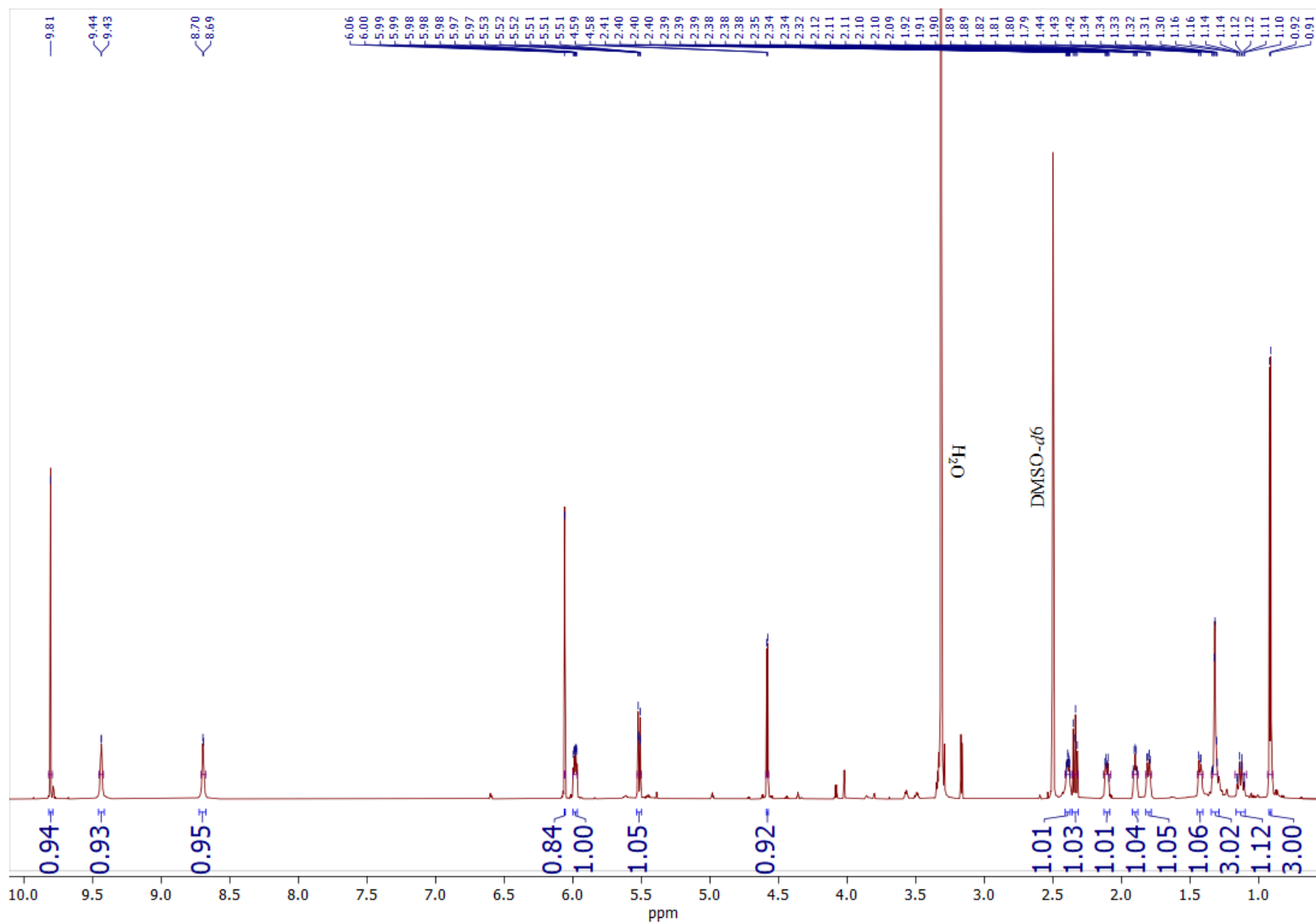


Figura A14. Espectro de RMN ^1H de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en $\text{DMSO-}d_6$.

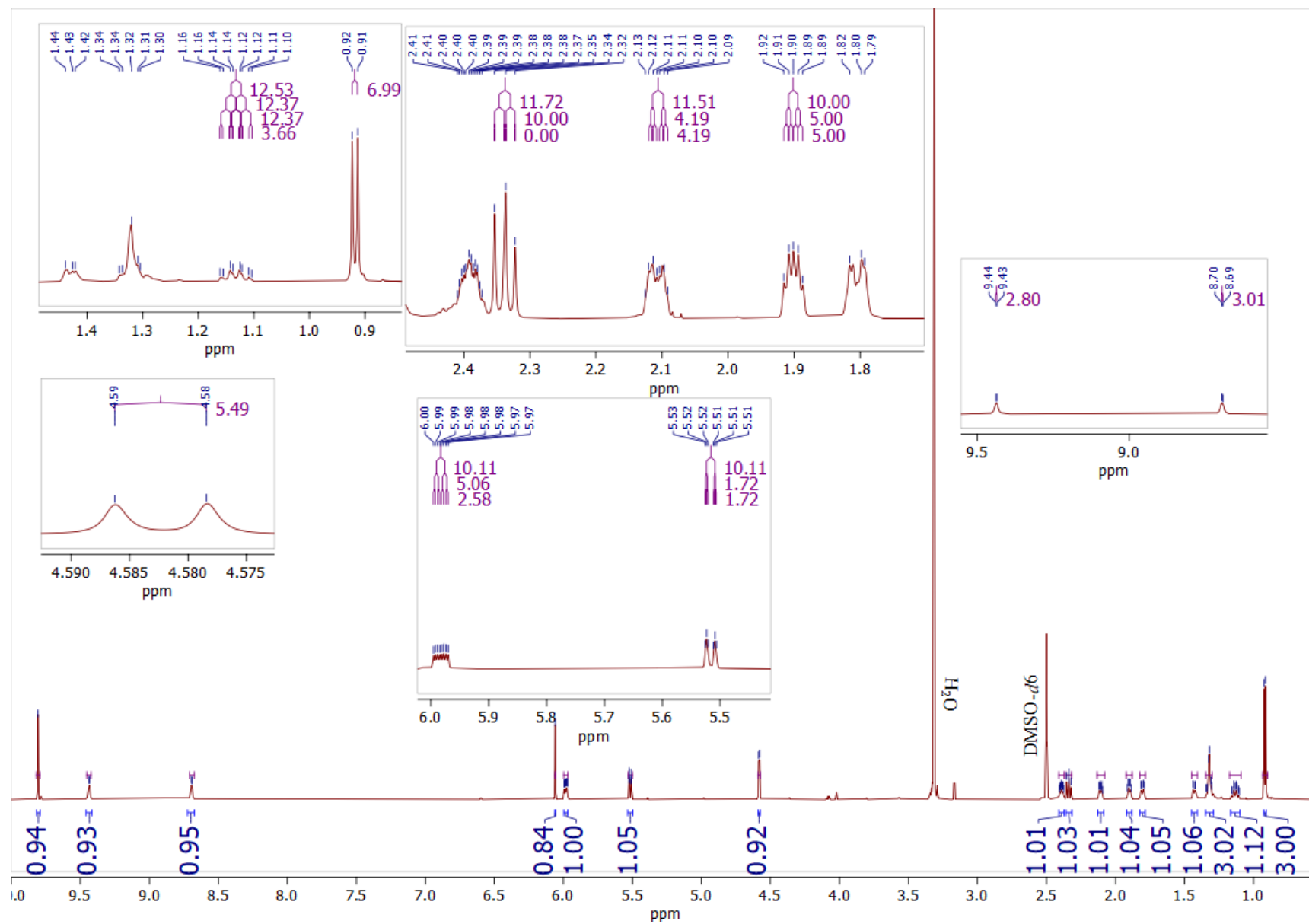


Figura A15. Espectro de RMN ^1H de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en $\text{DMSO-}d_6$.

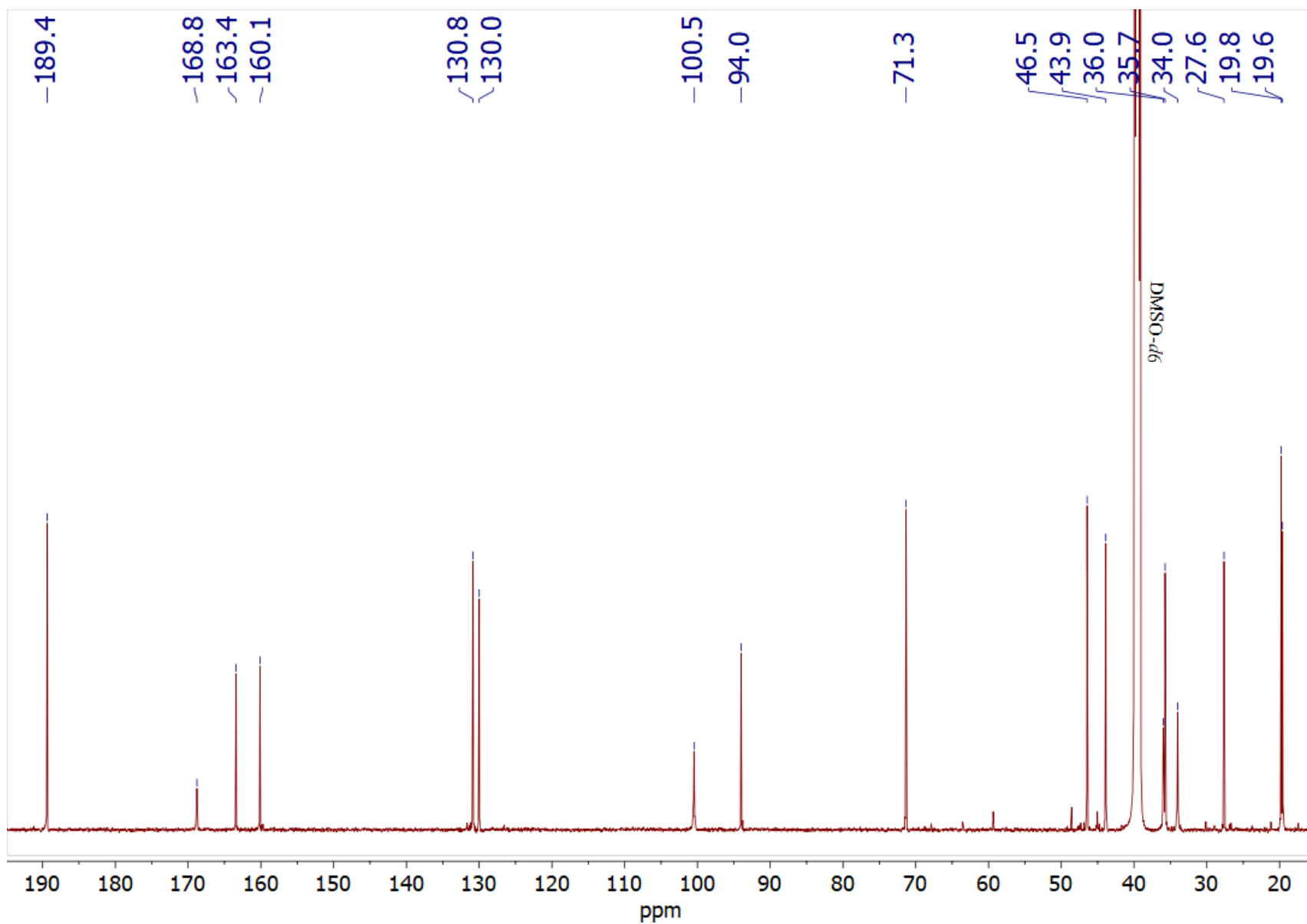


Figura A16. Espectro de RMN ^{13}C de 700MHz de Nigrosporapirona E (**2**) en DMSO-*d*₆.

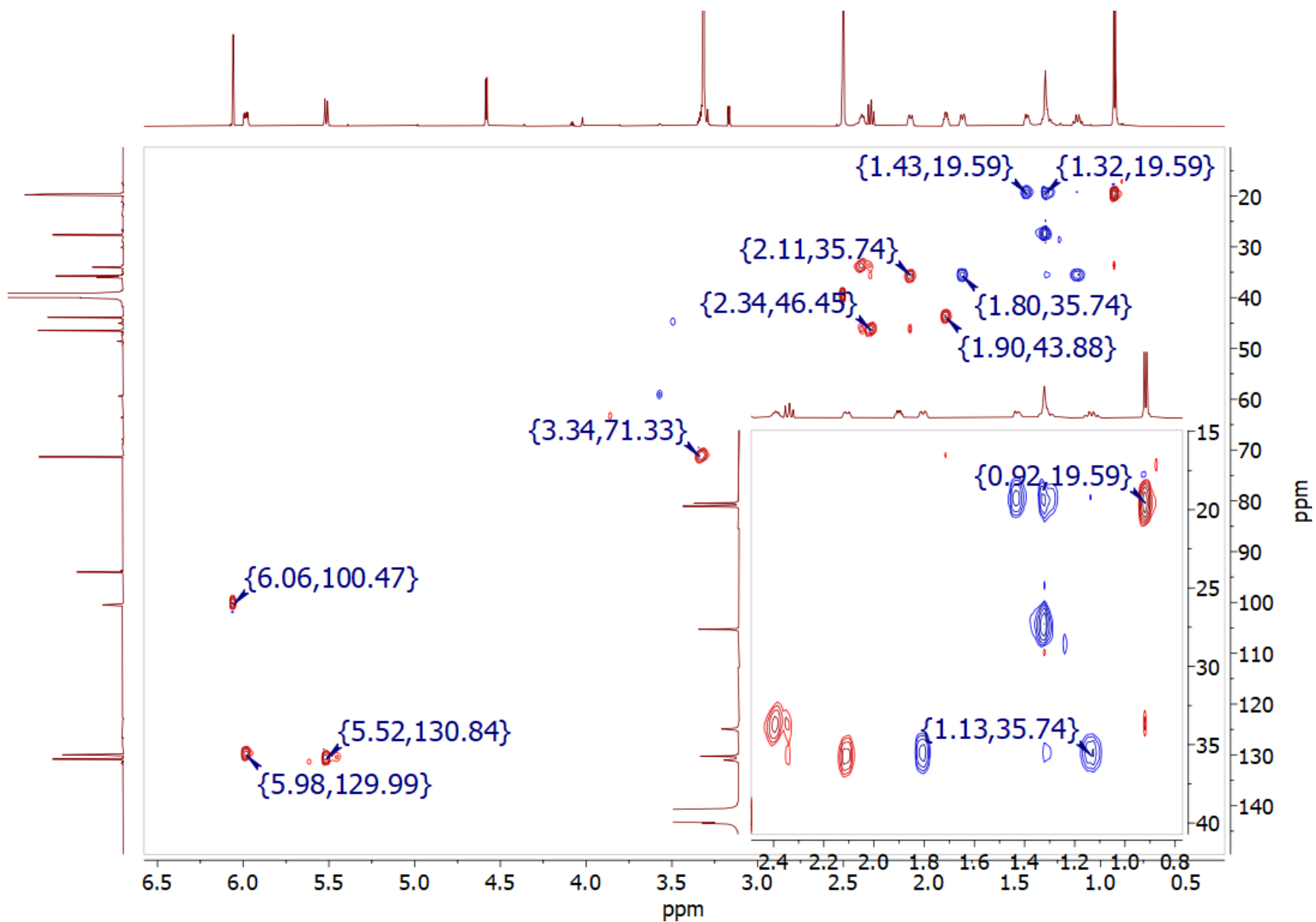


Figura A17. Espectro de RMN HSQC de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en DMSO-*d*₆.

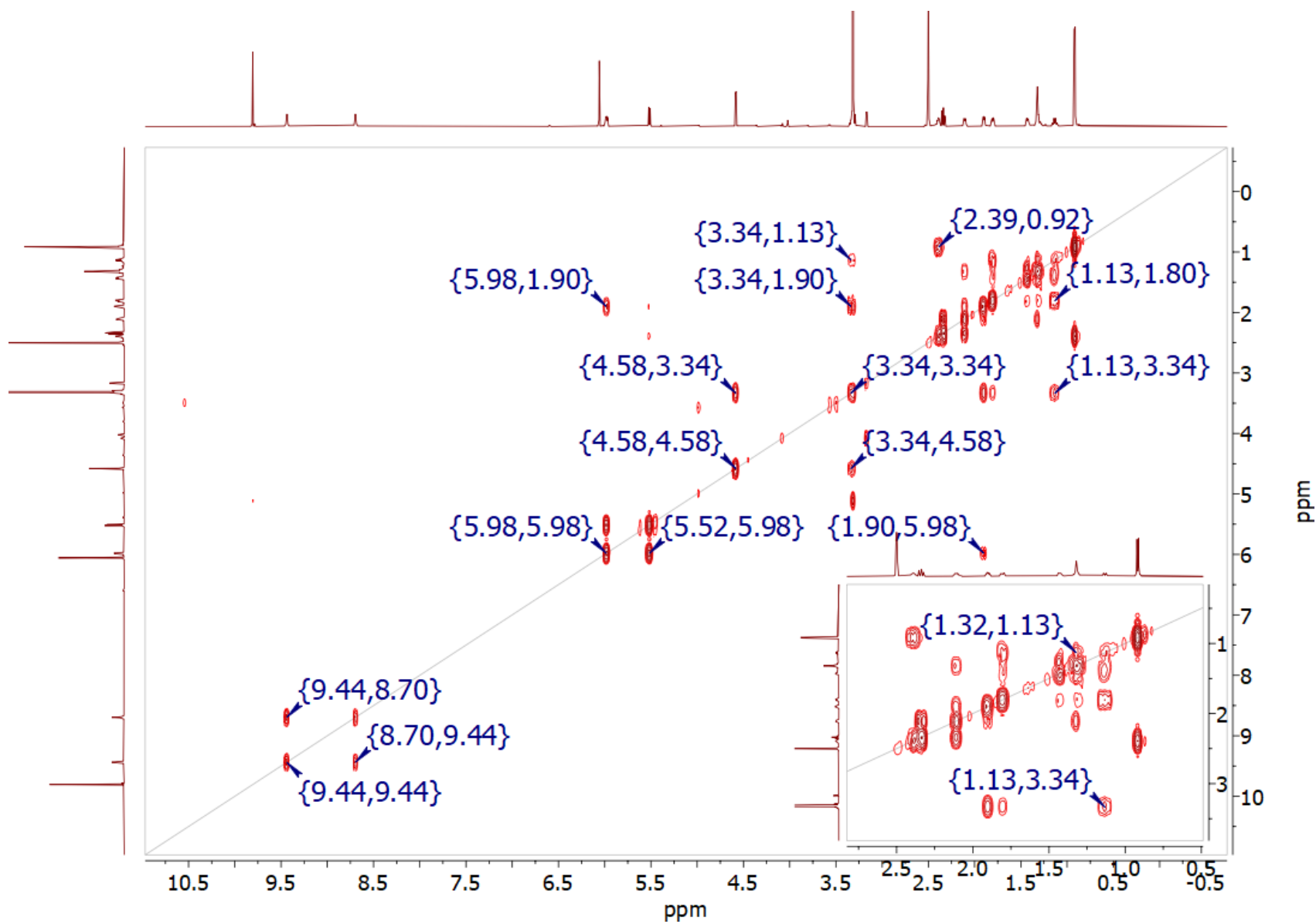


Figura A18. Espectro de RMN COSY de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en DMSO- d_6 .

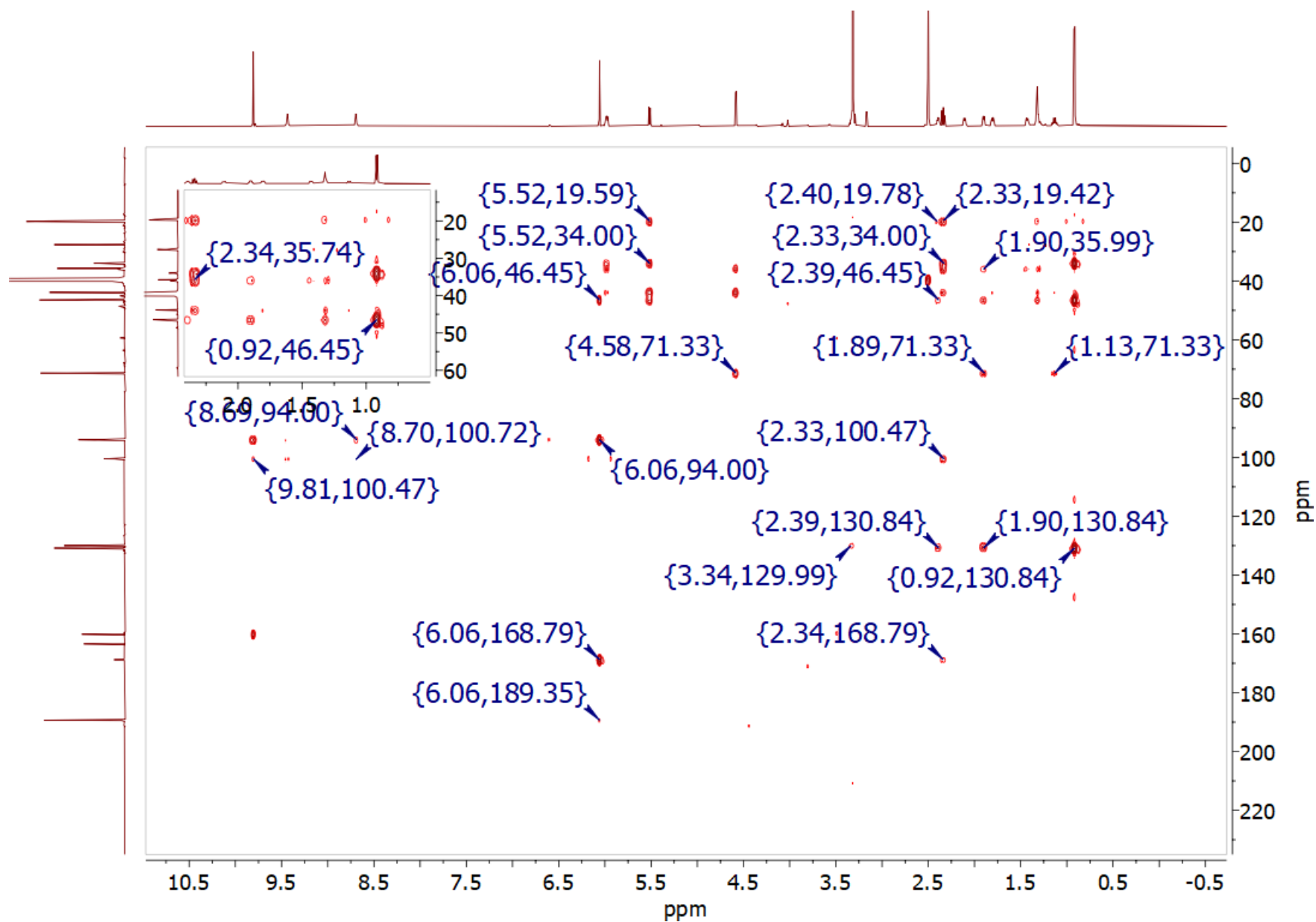


Figura A19. Espectro de RMN HMBC de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en DMSO- d_6 .

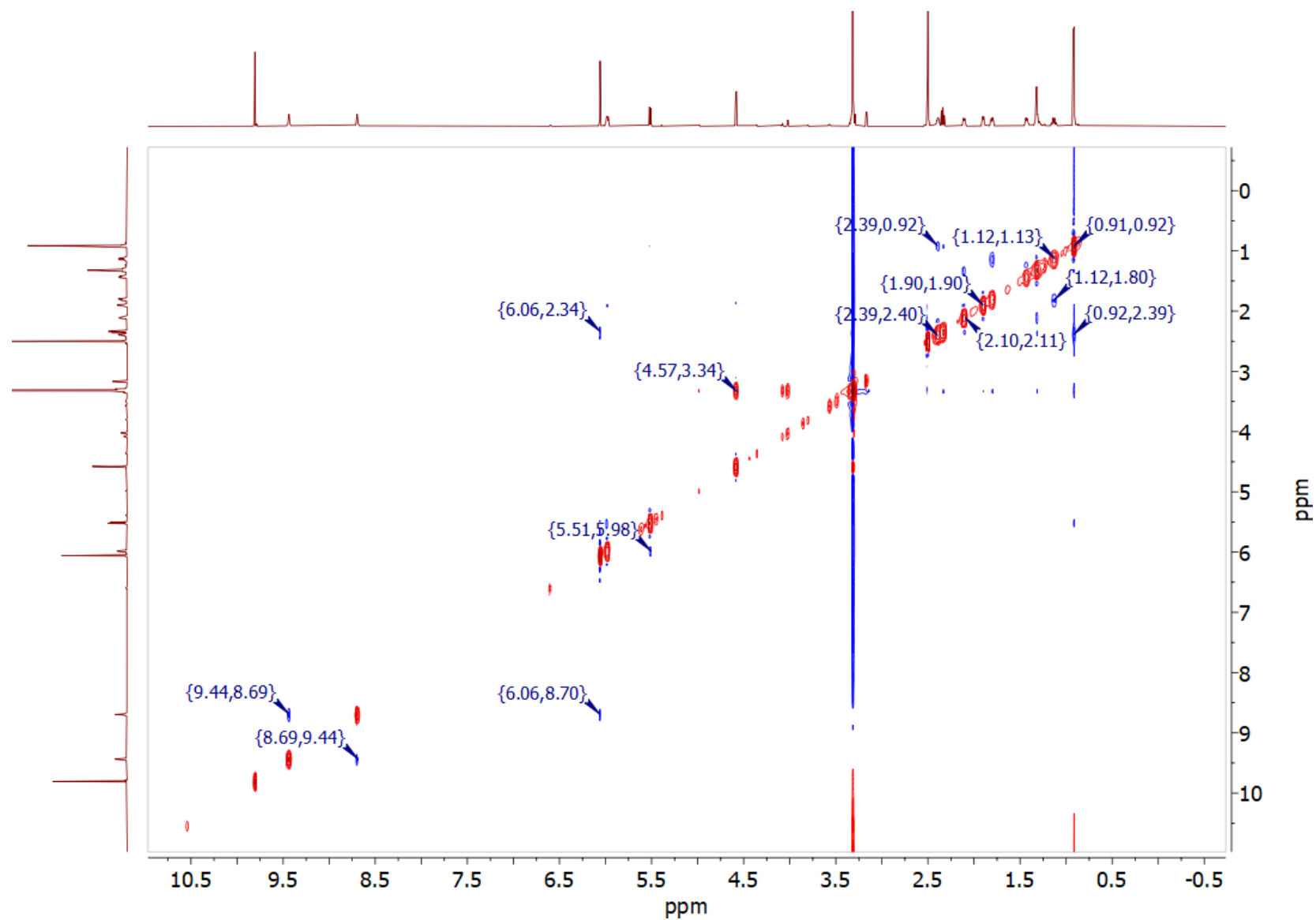


Figura A20. Espectro de RMN NOESY de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en DMSO-*d*₆.

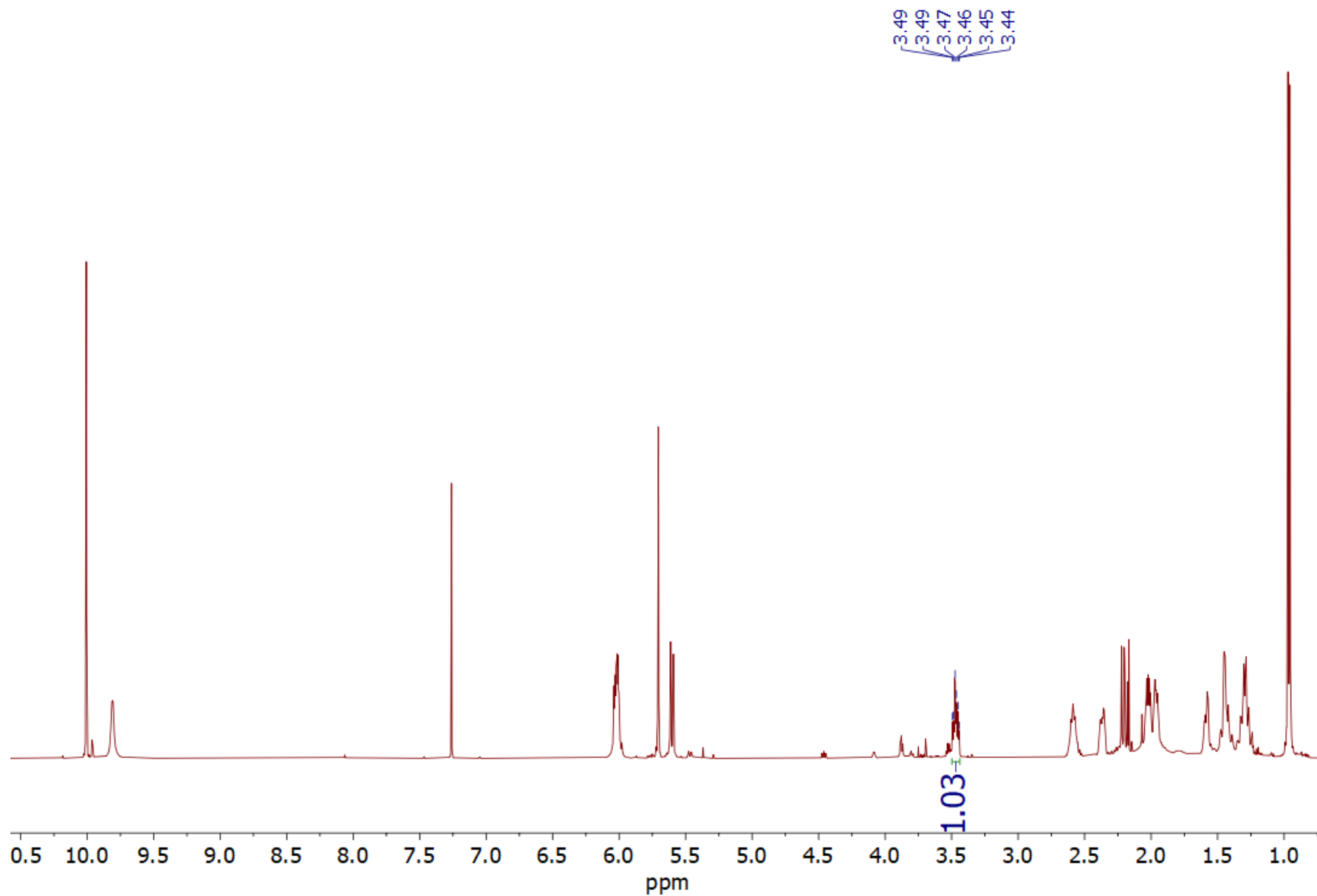


Figura A21. Espectro de RMN ^1H de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en CDCl_3 .

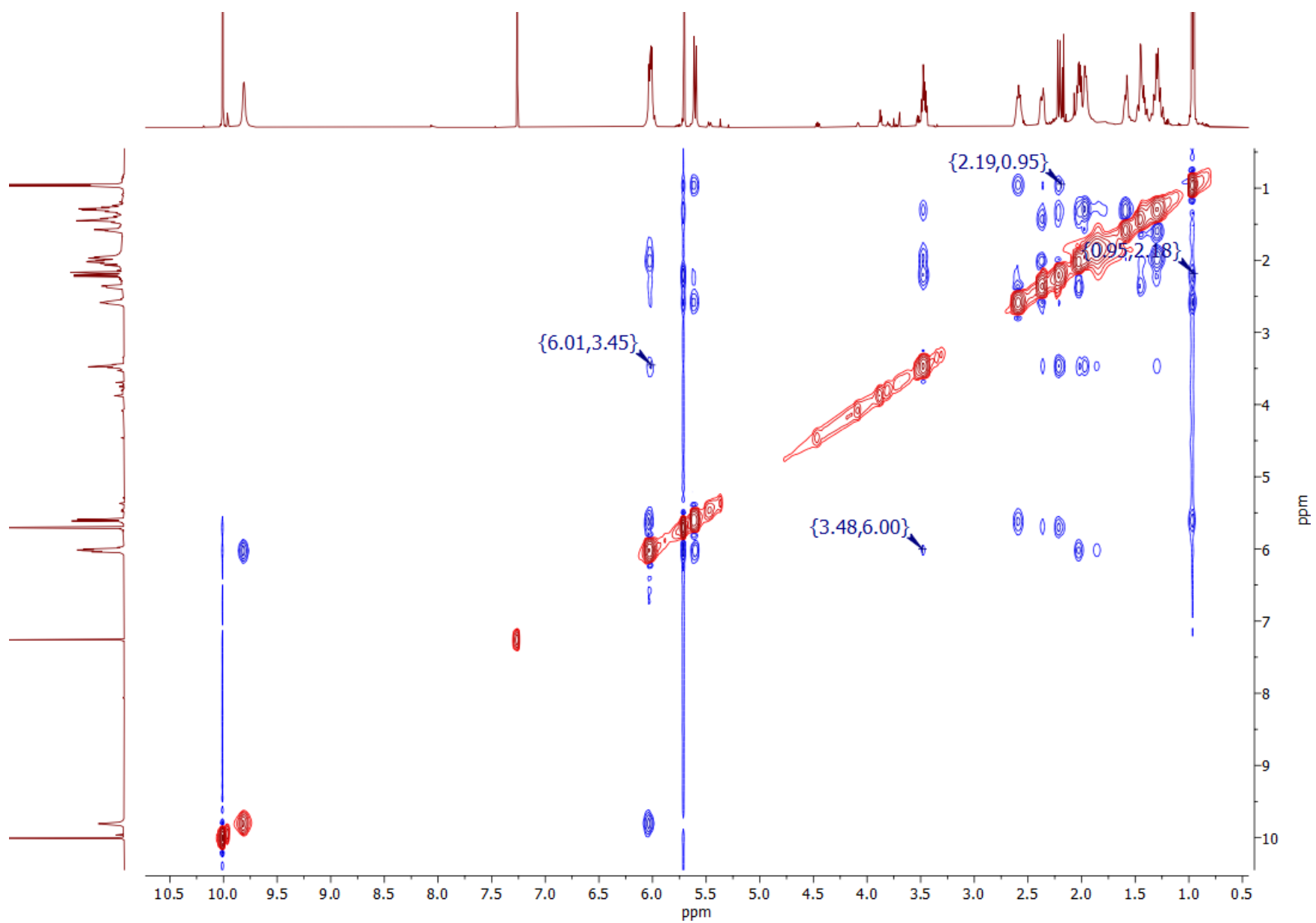


Figura A21. Espectro de RMN NOESY de 700MHz de Nigrosporapirona E (2) en CDCl₃.