



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Isobenzofuranonas de origen fúngico como inhibidores de la enzima
*hPTP1B*₁₋₄₀₀**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA**

PRESENTA:

Jorge Alberto Pardo Salinas

ASESOR:

Dr. José Alberto Rivera Chávez

COASESORA:

M. en C. Ixchel Adriana Loa Ramírez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

VOTOS APROBATORIOS



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN SECRETARÍA GENERAL DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis y Examen Profesional.**

Isobenzofuranonas de origen fúngico como inhibidores de la enzima hPTP1B1-400.

Que presenta el pasante: **Jorge Alberto Pardo Salinas**
Con número de cuenta: **314511261** para obtener el título de: **Químico**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de enero de 2024.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Ortega Jiménez	
VOCAL	Dr. Joel Omar Martínez	
SECRETARIO	Dr. José Alberto Rivera Chávez	
1er. SUPLENTE	Dra. Paulina Cortes Acevedo	
2do. SUPLENTE	Dra. Laura Denise López Barrera	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

MCVB/cga*

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. Ixchel Adriana Loa Ramírez



SUSTENTANTE (S):

Jorge Alberto Pardo Salinas

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por brindarme las herramientas necesarias para mi formación profesional, además de darme maravillosos momentos a lo largo de todos estos años académicos los cuales recordaré con mucho cariño.

Al Dr. José Rivera Chávez por no solo darme la oportunidad de ingresar y pertenecer a su grupo de trabajo, sino también por todo el apoyo, confianza y sobre todo las invaluable enseñanzas que me dio a lo largo de este proyecto. Gracias.

A la M. en C. Ixchel Loa por su guía y apoyo a lo largo de este proceso, además de su amistad.

Al Dr. Carlos Fajardo por el apoyo en la adquisición de los espectros de masas, en la interpretación de espectros de resonancia magnética nuclear y sobre todo por su sincera amistad.

Al Dr. Julio Acosta Calderón, de la Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, por la identificación taxonómica de las algas.

A la Dra. Patricia Vélez del instituto de biología UNAM por el apoyo en la identificación taxonómica del hongo IQ-1687.

A los M. en C. Karol Carrillo, Sahid Aguilar y a la Dra. Valeria Reyes por sus enseñanzas, amistad y orientación. Al M. en C. Enrique Aguilar por su apoyo, explicaciones y recomendaciones.

A María Fernanda Vargas por su apoyo en los ensayos de inhibición de la enzima y a mis compañeros de laboratorio 2-5.

Al Dr. René Miranda y al Dr. Guillermo Penieres por sus valiosas enseñanzas en química orgánica. A todos mis profesores de la licenciatura, que gracias a ellos he llegado a donde estoy ahora. Un agradecimiento especial a la profesora Brígida del Carmen ya que a través de su experiencia y profundo conocimiento en el área de química de productos naturales dejó una marca en mí, fomentando mi orientación académica hacia este campo.

A la Dra. Beatriz Quiroz y al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (**LURMN**) por la colección de datos espectroscópicos.

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: IN224424**) proporcionó el financiamiento para la realización de algunas de las actividades experimentales de investigación presentadas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, a través del proyecto: **CF-2019-263977**.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (**DGTIC, LANCAD-UNAM-DGTIC-374**) de la UNAM por la asignación de recursos de cómputo para la realización de algunos cálculos.

A la Dirección General de Orientación y Atención Educativa (**DGOAE**) y al Programa de Vinculación con los Egresados de la UNAM (**PVEU**) por el apoyo económico para mi proceso de titulación a través de la Beca de Titulación de Egresados de Alto Rendimiento 2023-2024.

Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano, al M. en C. Anuar Gómez-Tagle, al L.F. Alan Álvarez y al L.Q.I. Enrique Cárdenas por sus enseñanzas y su invaluable amistad.

A la Dra. Trinidad Velasco-Torrijos por abrirme las puertas de su laboratorio en Maynooth University, además de su apoyo y hospitalidad. Gracias.

A mi mamá Patricia Salinas, a mi papá Jorge Pardo y a mis hermanos María y Diego Pardo por su cariño, apoyo y amor incondicional.

A mi abuela María Valle y a mis tíos Carmen Salinas y Gilberto López por siempre abrirme las puertas de sus casas con mucho amor para que pudiera realizar este trabajo. Gracias. A mi *colega* Martha Cortés por todo su cariño y amor.

A mi novia Paula Vera por su amor y complicidad incondicional a lo largo de estos años.

A José Antonio y a Jorge García Berrúm, amigos que me han acompañado en cada etapa de este proceso de titulación.

DEDICATORIA

A *Maya*, por enseñarme el significado de *fortaleza*.

ÍNDICE

I.	Índice de figuras y esquemas	i
II.	Índice de tablas	iii
III.	Lista de abreviaturas, fórmulas y símbolos	iv
IV.	Resumen	vii
1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	3
	2.1. Productos naturales de origen fúngico	3
	2.2. Proteínas tirosina fosfatasas y cinasas	7
	2.3. Diabetes mellitus	8
	2.4. Insulina y su señalización	10
	2.5. Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)	12
	2.6. Inhibidores de la PTP1B	15
3.	Justificación y objetivos	19
4.	Hipótesis	21
5.	Metodología	22
	5.1. Área de estudio	22
	5.2. Reactivos	22
	5.3. Cultivo en pequeña escala de microorganismos fúngicos	22
	5.4. Obtención de extractos orgánicos	23
	5.5. Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando los extractos orgánicos	23
	5.6. Escalamiento del hongo seleccionado	23
	5.7. Aislamiento y caracterización de metabolitos aislados	24
	5.8. Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando compuestos puros	24
6.	Resultados y discusión	25
	6.1. Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos	25
	6.2. Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando los extractos orgánicos	25
	6.3. Perfil cromatográfico del extracto	26
	6.4. Identificación taxonómica del hongo seleccionado.....	27
	6.5. Rendimientos obtenidos	28

6.6. Caracterización estructural de los productos 1 , 3a/3b y 2	28
6.7. Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando compuestos puros	39
6.8. Acoplamiento molecular	39
7. Conclusiones	44
8. Referencias	45
9. Anexo.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Algunos metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos de macroalgas.....	4
Figura 2. Ejemplos representativos de PNFs con esqueletos carbonados inusuales.....	6
Figura 3. Mecanismo de acción de las enzimas cinasas y fosfatasa sobre las señales químicas.....	7
Figura 4. Defunciones en México por causa y por tipo de diabetes 2021.....	9
Figura 5. Proinsulina humana, mostrando sus cadenas A y B, así como el péptido conector C.....	10
Figura 6. Mecanismo de acción del receptor de insulina (IR) sobre las enzimas IRS.....	11
Figura 7. Modelo de activación del transporte de glucosa por la insulina.....	12
Figura 8. Rol de la PTP1B en la señalización de la insulina y leptina.....	13
Figura 9. Generalidades de la PTP1B A) Modelo tridimensional de la <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ , B) Dominios estructurales y C) Mecanismo catalítico de la enzima PTP1B.....	14
Figura 10. Algunos inhibidores de la PTP1B.....	16
Figura 11. Inhibidores de la PTP1B discontinuados en fases clínicas.....	17
Figura 12. Inhibidores de la <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ descritos por este grupo de trabajo.....	18
Figura 13. Mapa de la zona de estudio. Playa Aragón, Oaxaca.....	22
Figura 14. Actividad inhibitoria sobre la enzima <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ de los 52 extractos fúngicos, evaluados a 10 ppm.....	26
Figura 15. Cromatograma de HPLC fase reversa, columna analítica C ₁₈ elución por método general 30 minutos, λ 254nm.....	27
Figura 16. IQ 1687 en cereal Cheerios ®.....	27
Figura 17. Espectros de masas (19.8 eV) de los compuestos 1-3	30
Figura 18. Espectro de absorción UV de los compuestos 1-3 , estructura general de una lactona α,β -insaturada.....	31
Figura 19. Espectros de RMN- ¹ H (700MHz, CD ₃ OD) de 1-3	33
Figura 20. Espectros de RMN- ¹³ C (175MHz, CD ₃ OD) de 1-3	34

Figura 21. Espectros de DCE de los metabolitos aislados 1-3	38
Figura 22. Espectro de DCE de la Pseudaboydina B reportado por Wen-Jian y colaboradores.....	38
Figura 23. Espectro de DCE de la Pseudaboydina B experimental, 2	38
Figura 24. Energía de unión predicha para los compuestos 1-3 con la <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀	40
Figura 25. Modelo estructural obtenido del estudio por acoplamiento molecular.....	41
Figura 26. Modelos 2D generados por acoplamiento molecular para los complejos proteína-ligante entre 1-h PTP1B ₁₋₄₀₀ , 2-h PTP1B ₁₋₄₀₀ , 3a-h PTP1B ₁₋₄₀₀ y 4a-h PTP1B ₁₋₄₀₀	42
Figura 27. Espectro de RMN- ¹ H (700MHz, CD ₃ OD) de 1	50
Figura 28. Espectro de RMN- ¹³ C (175MHz, CD ₃ OD, contaminado con CDCl ₃) de 1	51
Figura 29. Espectro de RMN bidimensional HSQC de 1	51
Figura 30. Espectro de RMN bidimensional HMBC de 1	52
Figura 31. Espectro de RMN bidimensional COSY de 1	52
Figura 32. Espectro de RMN- ¹ H (700MHz, CD ₃ OD) de 2	53
Figura 33. Espectro de RMN- ¹³ C (175MHz, CD ₃ OD, contaminado de CDCl ₃) de 2	53
Figura 34. Espectro de RMN bidimensional HSQC de 2	54
Figura 35. Espectro de RMN bidimensional HMBC de 2	54
Figura 36. Espectro de RMN bidimensional COSY de 2	55
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H (700MHz, CD ₃ OD) de 3a/3b	55
Figura 38. Espectro de RMN- ¹³ C (175MHz, CD ₃ OD, contaminado con CDCl ₃) de 3a/3b	56
Figura 39. Espectro de RMN bidimensional HSQC de 3a/3b	56
Figura 40. Espectro de RMN bidimensional HMBC de 3a/3b	57
Figura 41. Espectro de RMN bidimensional COSY de 3a/3b	57
Esquema 1. Estructura de los metabolitos aislados 1-3	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios fúngicos reportados con actividad biológica.....	4
Tabla 3. Microorganismos fúngicos aislados junto con el género y división del alga de procedencia.....	25
Tabla 4. Rendimiento de los metabolitos aislados.....	28
Tabla 5. Datos de RMN- ¹ H y ¹³ C de 1 y 2 reportados en literatura por Wen-Jian Lan y colaboradores obtenidos a 400 y 100 MHz, CD ₃ OD.	35
Tabla 6. Asignación de señales de RMN a 700 (¹ H) y 175 (¹³ C) MHz, registrados en CD ₃ OD, respectivamente para los compuestos 1 y 2	36
Tabla 7. Asignación de señales de resonancia magnética nuclear de los compuestos 3a y 3b	37
Tabla 8. Porcentaje de inhibición sobre la <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ de los metabolitos aislados.....	39
Tabla 9. Datos obtenidos por acoplamiento molecular de interacción de los productos 1-3 con residuos de la enzima.	43

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

(CH ₃) ₂ CO	Acetona
Å	Ángstrom
MeCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
°C	Grados Celsius
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CoA	Coenzima A
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real
DCE	Dicroísmo circular electrónico
DCM	Diclorometano
DMAT	Dimetilalilriptófano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DTT	Ditiotreitol
EM	Espectrometría de masas
ENT	Enfermedades no transmitibles
eV	Electronvoltio
g	Gramo
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
GLUT4	Transportador de glucosa
Gly	Glicina
H ₂ O	Agua
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
<i>h</i> PTP1B ₁₋₃₀₀	Proteína tirosina fosfatasa 1B de 300 aminoácidos
<i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀	Proteína tirosina fosfatasa 1B humana de 400 aminoácidos
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
Hz	Hertz, ciclo por segundo
IDF	Federación Internacional de Diabetes

IDH	Índice de deficiencia de hidrógenos
Ile	Isoleucina
IR	Receptor de insulina
IRS	Familia de enzimas llamada Receptores de insulina-sustrato
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
JAK2	Cinasa jano 2
kDa	Kilodalton
LepR	Receptor de leptina
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
NRPS	Péptidos no ribosomales
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
PDA	Agar de papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
Phe	Fenilalanina
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PIP3	3-Fosfoinositol
PK	Policétido
PKB	Tipo de proteína cinasa presente en la señalización de la insulina
PK-NRPS	Híbrido de policétido sintasa y péptido no ribosomal
PNF	Productos naturales fúngicos
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
RiPPs	Péptido sintetizado ribosomalmente y post-traduccionalmente modificado
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	Señal simple
Ser	Serina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UA	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
Val	Valina

δ	Desplazamiento químico
Δ	Delta de error del cálculo fórmula molecular
δ_C	Desplazamiento químico de carbono
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno
λ_{\max}	Longitud de onda máxima
μM	Micromolar
Ω	Índice de deficiencia de hidrógenos

RESUMEN

El presente estudio forma parte de un proyecto de mayor alcance que busca contribuir al conocimiento de la diversidad fúngica del territorio y a la bioprospección de estos organismos como fuentes de moléculas útiles como prototipo estructural para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), a través de la inhibición de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

En este sentido, a partir de una colección de algas colectadas en las costas oaxaqueñas se aisló el hongo identificado con el código IQ-1687 (Ascomiceto; Daikarya; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; *Aspergillus*), como endófito de la macroalga *Ahnfeltiopsis* sp. Este organismo se cultivó en medio sólido Cheerios® y posteriormente, se obtuvo su extracto, el cual fue separado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Este procedimiento condujo al aislamiento de cuatro moléculas con actividad inhibitoria sobre la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ (evaluados a 100µM), las pseudaboydinas A y B (**1** y **2**; 43.3 y 12.6% de inhibición, respectivamente) y dos nuevos compuestos en mezcla epimérica: la (*R*)-6-Hidroxi-3-metil-3-((*R*)-5-hidroxi-4-metilpentil)isobenzofuran-1(3*H*)ona (**3a**) y la (*R*)-6-Hidroxi-3-metil-3-((*S*)-5-hidroxi-4-metilpentil)isobenzofuran-1(3*H*)ona (**3b**). Esta mezcla inhibió la actividad de la enzima en un 28.2%.

Palabras clave: Hongos endófitos, metabolitos secundarios, Ftálidas, Isobenzofuranonas, Enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de metabolitos especializados biosintetizados por plantas, animales y microorganismos se hace a través de la química de productos naturales; su importancia radica en las aplicaciones que han demostrado tener, principalmente actividad farmacológica, pero también nutracéutica, insecticida y psicoactiva, entre otras. Por lo tanto, el desarrollo de la industria química tal y como lo conocemos no sería posible de no ser por la investigación en química de productos naturales.

El empleo de microorganismos fúngicos como fuente de nuevos metabolitos especializados es un campo con gran potencial de investigación, principalmente, por la facilidad que existe en su cultivo a pequeña, mediana y gran escala. Gran parte de los principios activos utilizados en la industria farmacéutica proceden de organismos fúngicos, esto por la enorme capacidad que tienen de sintetizar metabolitos altamente especializados (Padhi *et al.*, 2013).

Desde el año 1981 hasta el 2019 el porcentaje de fármacos aprobados provenientes de productos naturales fue de 4.6%, fármacos provenientes de un producto natural pero con alguna modificación semisintética fue de 18.9%, 14% para los obtenidos por vías completamente sintéticas pero inspirados en la estructura de un producto natural y el 24.6 % también de vías sintéticas pero con estructuras obtenidas al azar o modificaciones de compuestos ya existentes (Newman y Cragg, 2020); esto demuestra que un gran porcentaje de los fármacos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de enfermedades crónicas e infecciosas, provienen de productos naturales.

Hoy en día las causas de muerte han cambiado drásticamente por el actual estilo de vida de la población mundial, las enfermedades crónicas o enfermedades no transmitibles (ENT) son un grupo de enfermedades que no son causadas por una infección aguda y son causantes del mayor número de defunciones al año (71%), siendo responsables de 41 millones, cifra que aumenta año tras año (OPS/OMS). Entre las principales ENT y con mayor mortalidad se encuentran las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cánceres y enfermedades pulmonares.

La diabetes como enfermedad metabólica se caracteriza por producir altos niveles de glucosa en sangre y es la responsable de 1.5 millones de muertes a nivel mundial cada año. La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es la más común dentro de la población mundial (más del 95% de los

casos) y se caracteriza por presentar resistencia a la insulina (OPS/OMS), condición directamente ligada con la expresión de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).

La PTP1B es una enzima que pertenece al grupo de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) y funge como un modulador negativo de la señalización de insulina y leptina, siendo un blanco farmacológico validado para tratamientos contra la diabetes y obesidad (Kerru *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1 Productos naturales de origen fúngico (PNF)

Los organismos fúngicos han sido objeto de explotación por parte de las grandes farmacéuticas ya que sus metabolitos secundarios comúnmente sobrepasan los alcances puramente sintéticos dentro del desarrollo farmacéutico. La obtención de estos organismos para su estudio es otra de las ventajas de trabajar con ellos, ya que se encuentran en todos los ecosistemas (terrestres y acuáticos) y pueden desarrollarse en diversas condiciones ambientales, por ejemplo, se han aislado organismos de naturaleza saprófita, patógena y no patógena, así como relacionados por interacciones simbióticas a otros organismos como plantas, protozoarios y algas como es el caso de los hongos endófitos (Bhattarai *et al.*, 2021).

Los hongos endófitos habitan dentro de organismos como plantas o algas sin causar una enfermedad aparente. La relación que ambos organismos tienen se considera de gran importancia, ya que el organismo hospedero le brinda alimento y hospedaje al hongo, mientras este último a cambio es capaz de producir metabolitos que benefician al hospedero, incrementando o modificando sus mecanismos de defensa, de esta manera se incrementa la supervivencia de ambos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

En ambientes acuáticos, un tercio de los hongos endófitos están asociados a algas. Estudios químicos realizados sobre hongos endófitos de algas llevaron a la obtención de la ascosalipyrrolidinona, microsphaeropsisina, mactanamida y acremonina A (Abdel-Lateff *et al.*, 2003) (**Figura 1**), metabolitos especializados con elevada diversidad estructural.

Existen diferentes clasificaciones de metabolitos secundarios de origen fúngico, las cuales se centran en las rutas biosintéticas de procedencia, por ejemplo, los policétidos (PK), péptidos no ribosomales (NRPS), péptidos ribosomales, híbridos PKS-NRPS, péptidos sintetizados ribosomalmente y post-traduccionalmente modificados (RiPPs), alcaloides indólicos, derivados de dimetilaliltriptófano (DMAT) y terpenoides (Bhattarai *et al.*, 2021). En la **Tabla 1**, se muestran algunos metabolitos secundarios de origen fúngico y la actividad biológica que presentan.

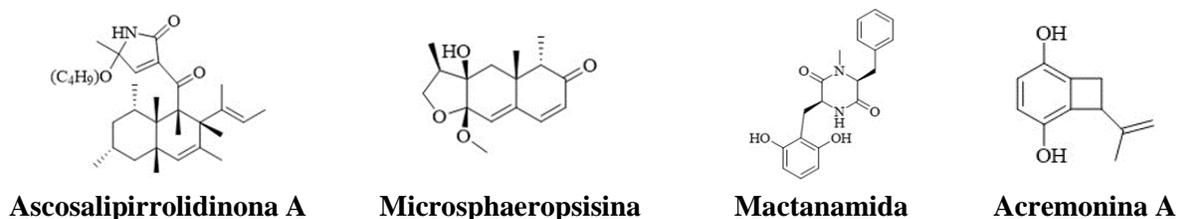


Figura 1. Algunos metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos de macroalgas.

Tabla 1. Metabolitos secundarios fúngicos reportados con actividad biológica (Bhattarai *et al.*, 2021).

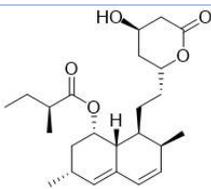
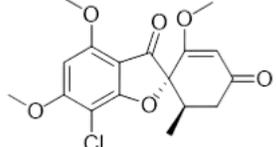
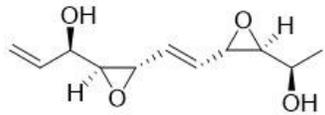
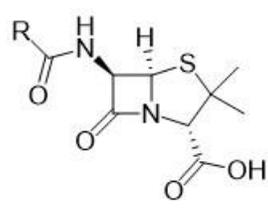
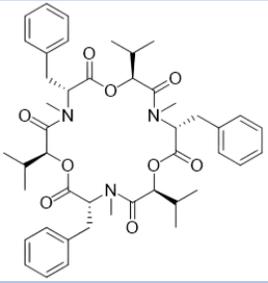
Compuesto	Organismo aislado	Actividad biológica	Estructura	Referencia
Policétidos				
Lovastatina	<i>Monascus ruber</i> , <i>Aspergillus terreus</i>	Disminución de colesterol en sangre		Zeller y Uvodich, 1988)
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Antifúngico		Chooi y Tang, 2012)
Depudecin	<i>Alternaria brassicicola</i>	Inhibidor de la histona desacetilasa		(Chooi y Tang, 2012)
NRPS				
Penicilina V y G	<i>Penicillium rubens</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	Inhibidor de la biosíntesis de peptoglicano, antibiótico		(Curtis, <i>et al.</i> , 1976) y (Oka y Hashizume., 1980)
Beauvericina	<i>Beauveria bassiana</i>	Antibiótico e insecticida		(Fornelli <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 1 (Continuación). Metabolitos secundarios fúngicos reportados con actividad biológica (Bhattarai *et al.*, 2021).

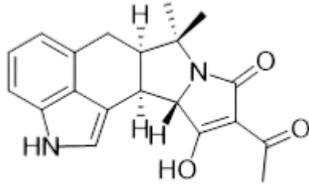
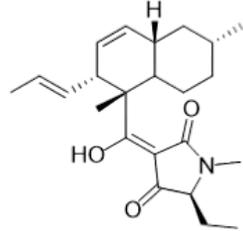
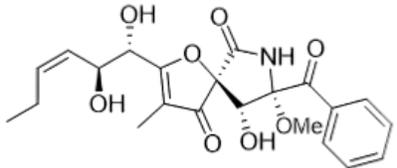
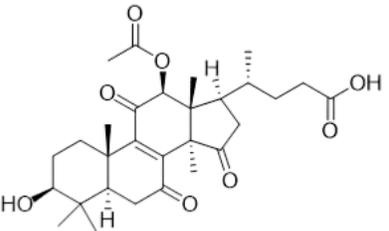
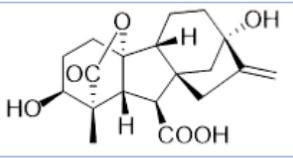
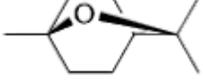
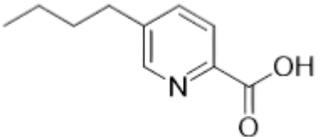
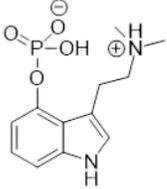
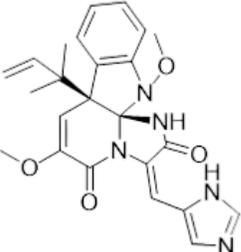
Compuesto	Organismo aislado	Actividad biológica	Estructura	Referencia
PKS-NRPS				
Ácido ciclopiazónico	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. flavus</i>	Inhibidor de ATPasa-Ca ²⁺		(Chang <i>et al.</i> , 2009)
Equisetin	<i>Fusarium heterosporum</i>	Inhibidor de la VIH integrasa, antibiótico		(Hazuda <i>et al.</i> , 1999)
Pseurotin A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Inmunosupresor		(Wenke <i>et al.</i> , 1993)
Terpenoides				
Ácido lucidénico	<i>G. leucidum</i>	Anticáncer		(Weng y Yen, 2010)
Gibberellin	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cladosporium</i>	Uso en agricultura y horticultura		(Khan <i>et al.</i> , 2011)
1,8-Cineole	<i>Hypoxyylon sp.</i>	Aditivo para biocombustibles		(Shaw <i>et al.</i> , 2015)
Alcaloides				
Ácido fusárico	<i>Fusarium sp.</i>	Inhibidor de la dopamina β-hidrolasa		(Hidaka <i>et al.</i> , 1969)

Tabla 1 (Continuación). Metabolitos secundarios fúngicos reportados con actividad biológica (Bhattarai *et al.*, 2021).

Compuesto	Organismo aislado	Actividad biológica	Estructura	Referencia
Alcaloides				
Psilocibina	<i>Psilocybe azurescens</i> , <i>P. cyanescens</i>	Alucinaciones y cambio en la percepción		(Mahmood, 2013)
Oxalina	<i>Penicillium oxalicum</i>	Inhibidor de la polimerización de la tubulina		(Koizumi <i>et al.</i> , 2004)

Los PNF tienen una gran diversidad estructural, algunos de ellos presentan esqueletos base no reportados en otras fuentes naturales, por ejemplo, los alcaloides lolina y sus derivados presentan un núcleo base de 2-oxa-6-azatriciclo[4.2.1.0]nonano, así como los alcaloides indoloditerpénicos tipo lolitrem, que consisten en sistemas heterociclos de ocho anillos fusionados (**Figura 2**). Los hongos endófitos también producen metabolitos secundarios con estructuras terpénicas novedosas y exclusivas; un claro ejemplo de la importancia de estos compuestos como fuente potencial de fármacos es el taxol (**Figura 2**), un diterpeno aislado de un endófito del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*, Taxaceae) utilizado en el tratamiento del cáncer ovárico y de mama (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

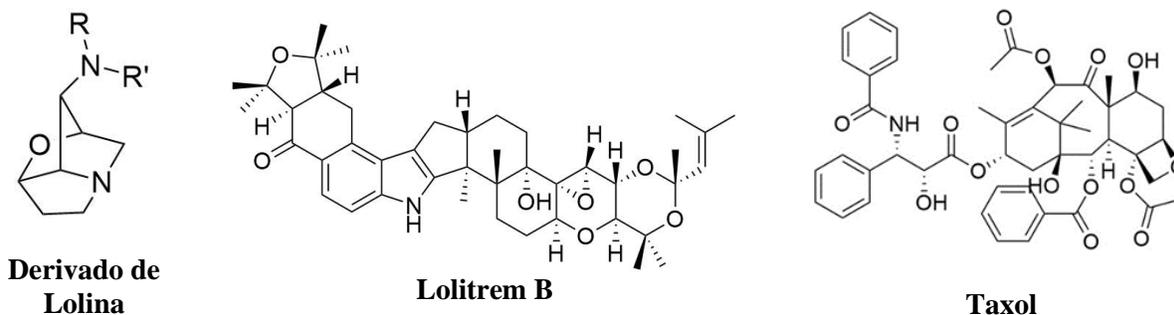


Figura 2. Ejemplos representativos de PNFs con esqueletos carbonados inusuales.

2.2 Proteínas tirosina fosfatasas y cinasas

Uno de los receptores más importantes dentro de la comunicación celular son los llamados enzimáticos o acoplados a enzimas (García Sáinz, 2016), existen dos procesos muy importantes relacionados con estos, de los cuales dependen casi todas las señales celulares desencadenadas por la unión receptor-ligando, estos son la fosforilación y su contraparte la eliminación de un grupo fosfato (desfosforilación) de blancos proteicos o de otra macromolécula. Estos procesos son de tan alta importancia, que dependiendo del estado en que se encuentran estas proteínas o señales bioquímicas, estarán activados o desactivados (Cortinas, 2011).

Las enzimas encargadas de realizar la fosforilación se conocen como cinasas (o quinasas) y algunas pueden ser directamente receptores (como en el caso del receptor de insulina y varios factores de crecimiento). Dependiendo del tipo de cinasa que sea, esta tendrá la capacidad de fosforilar otras proteínas, o incluso pueden fosforilarse a ellas mismas en diferentes aminoácidos como la serina, treonina y la tirosina (García Sáinz, 2016).

Por otro lado, las enzimas proteína fosfatasas, que igualmente pueden encontrarse como receptores, tienen la función de desfosforilar sustratos. En la correcta señalización celular es importante que exista un equilibrio entre las funciones de estos dos tipos de enzimas, ya que las enzimas fosfatasas eliminan grupos fosfato de proteínas que anteriormente alguna proteína cinasa fosforiló. Generalmente, su actividad se centra en los aminoácidos serina, treonina y la tirosina (PTP) (García Sáinz, 2016), siendo este último de mayor importancia en el presente trabajo. Estas proteínas están estrechamente relacionadas con la señalización celular por modulación negativa o positiva, algunas de ellas están involucradas en diferentes enfermedades, razón por la que existe gran interés en encontrar inhibidores selectivos de estas, ya sea de tipo natural o sintético.

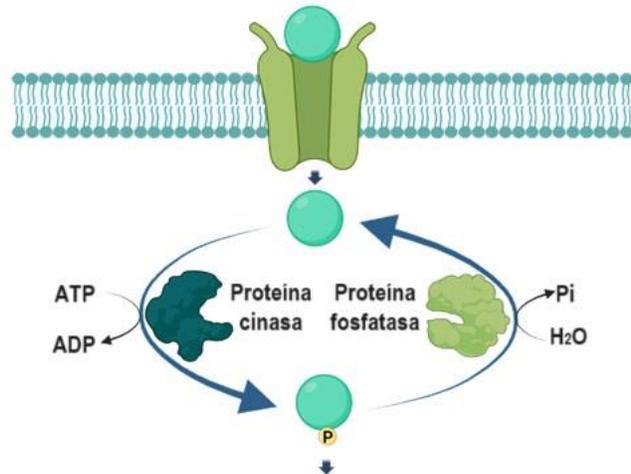


Figura 3. Mecanismo de acción de las enzimas cinasas y fosfatasas sobre las señales químicas. (García Sáinz, 2016).

A partir del genoma humano se expresan 107 PTPs diferentes (Cho, 2013) y aproximadamente 90 proteínas cinasas con actividad sobre tirosina (García Sáinz, 2016). Las reacciones bioquímicas catalizadas por estas enzimas se indican en la **Figura 3**.

2.3 Diabetes mellitus

La diabetes es una enfermedad crónica y metabólica que se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre, lo cual trae con el tiempo serios daños al corazón, vasos sanguíneos, ojos, úlceras, riñón y nervios (World Health Organization, 2023), estos elevados niveles son ocasionados por deficiencia en la producción y/o acción de la insulina (Abdel Raof y Mohamed, 2018). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) existen 422 millones de casos de diabetes a nivel mundial, y se estima que para el año 2040 la cifra se eleve a 642 millones ya que la prevalencia de esta enfermedad incrementa año con año (Abdel Raof y Mohamed, 2018).

Estadísticas de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) (IDF)

- Para el año 2030 se proyecta que el número de personas con diabetes se eleve a 643 millones y para el año 2045 se proyecta que 1 de cada 8 adultos (aproximadamente 783 millones) padezcan esta enfermedad, esto representa un incremento del 46%.
- Más del 90% de personas con diabetes padecen DMT2.
- En el año 2021 aproximadamente 537 millones de adultos (20 a 79 años) padecían diabetes.
- 3 de cada 4 adultos con diabetes viven en países subdesarrollados o en vías de desarrollo.

La diabetes se ha clasificado en muchos tipos, sin embargo, los dos más comunes son la Diabetes Mellitus tipo 1 y tipo 2 (DMT1 y DMT2). La DMT1 se asocia a un daño en la producción de insulina producido por la destrucción de las células β -pancreáticas a través un proceso autoinmune de los linfocitos T; mientras que en la DMT2 existe resistencia a la insulina por parte del organismo, siendo este último el tipo más común y con la menor esperanza de vida por tener mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares y desórdenes metabólicos (Tan *et al.*, 2019).

Estadísticas oficiales de diabetes en México por INEGI (INEGI, s. f.)

- En 2021, 13 % de las defunciones en México fueron por diabetes (140,729), de acuerdo con las Estadísticas de Defunciones Registradas.
- De las personas que fallecieron por diabetes, 74.9 % no era insulino-dependiente (DMT2) y 2.2 % lo era (DMT1).
- En 2021, del total de defunciones por diabetes, 51 % correspondió a hombres (71,330) y 49 % a mujeres (69,396).
- A nivel nacional, la tasa de mortalidad por diabetes mellitus fue de 11 por cada 10 mil habitantes (**Figura 4**).

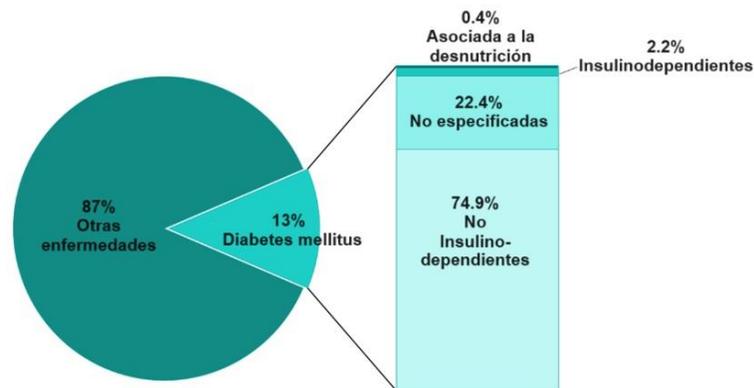


Figura 4. Defunciones en México por causa y por tipo de diabetes 2021(INEGI, s. f.)

Tratamientos contra la DM

En la **Tabla 2** se resumen los fármacos empleados actualmente para el tratamiento de la diabetes, con su nombre genérico y su mecanismo de acción.

Tabla 2. Agentes antidiabéticos actuales y su mecanismo de acción

Fármaco tratamiento	Nombre genérico	Mecanismo de acción
DMT1		
Terapia con insulina	Insulina	Estimula la fosforilación de los receptores de insulina
Amilina	Pramlinitida	Actúa mejorando el control glicémico, prevención de aumento posprandial en niveles de glucagón y por sensaciones crecientes de saciedad

Continuación Tabla 2		
DMT2		
Sulfonilureas	Gliclazida, Glimpirida, Gliburida	Estimula al páncreas para producir más insulina
Meglitinidas	Nateglinida, Repaglinida	Estimula al páncreas para producir más insulina
Biguanidas	Metformina	Reduce la producción hepática de glucosa
Tiazolidinedionas (TZD)	Pioglitazona, Rosiglitazona	Incrementa la sensibilidad a la insulina por parte de las células y reduce la producción hepática de glucosa
Inhibidor de α -glucosidasas	Acarbosa	Disminuye la absorción de carbohidratos ingeridos
Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4	Linagliptina, Saxagliptina, Sitagliptina, Alogliptina	Intensifica el efecto de las hormonas intestinales (incretinas) involucradas en el control del azúcar en sangre
Agonista del péptido GLP-1	Exenatida, Liraglutida, Dulaglutida	Imita el efecto de las incretinas
Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2	Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina	Ayuda a eliminar glucosa en la orina

2.4 Insulina y su señalización

La insulina es una hormona polipeptídica producida principalmente por estímulo de la glucosa ingerida en la dieta, esta hormona se sintetiza inicialmente en las células β del páncreas como un precursor de cadena única llamada proinsulina (**Figura 5**) formada por una cadena A, una cadena B y un péptido C conector de estas.

Posteriormente, en el aparato de Golgi

se transforma en insulina, perdiendo y liberándolo el péptido C al torrente sanguíneo en cantidades equimolares con la insulina. Los residuos no variables Gly^{A1}, Glu^{A4}, Gln^{A5}, Tyr^{A19}, Asn^{A21}, Val^{B12}, Tyr^{B16}, Gly^{B23}, Phe^{B24}, Phe^{B25} y Tyr^{B26} de las cadenas A y B de la insulina son los que interactúan con su receptor (Brunton *et al.*, 2007).

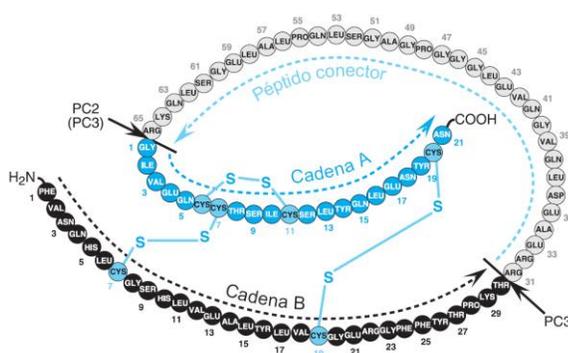


Figura 5. Proinsulina humana, mostrando sus cadenas A y B, así como el péptido conector C (Brunton *et al.*, 2007).

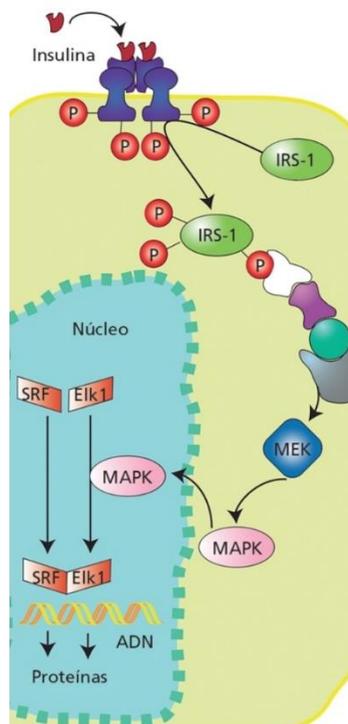


Figura 6. Mecanismo de acción del receptor de insulina (IR) sobre las enzimas IRS (García Sáinz, 2016).

La secreción de insulina es un proceso regulado de manera estrecha, diseñado para proporcionar concentraciones estables de glucosa en la sangre, tanto en ayuno como en la alimentación (Brunton *et al.*, 2007). Al unirse con la insulina los receptores de insulina (IR) tienen la capacidad de autofosforilarse para estar en su forma “activa”, además fosforilan a su vez a una familia de moléculas denominada IRS (insulin receptor substrate). Fosforiladas estas moléculas, adquieren afinidad para adherirse a una serie de proteínas y así llevar a cabo diversas funciones dentro de la señalización de la insulina, como es el de estimular la expresión de ciertos genes (**Figura 6**) (García Sáinz, 2016).

Fosforilada la proteína IRS-1, activa a la fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K), como consecuencia se cataliza la formación de un tipo de fosfolípidos llamados fosfoinosítidos con fosfato en posición 3 (PIP₃), los cuales actúan atrayendo a la membrana a la proteína cinasa PKB (o Akt), responsable de estimular que los transportadores de glucosa GLUT4 pasen de encontrarse en membranas intracelulares a fusionarse a la membrana plasmática permitiendo la entrada de la glucosa a la célula (**Figura 7**) (García Sáinz, 2016).

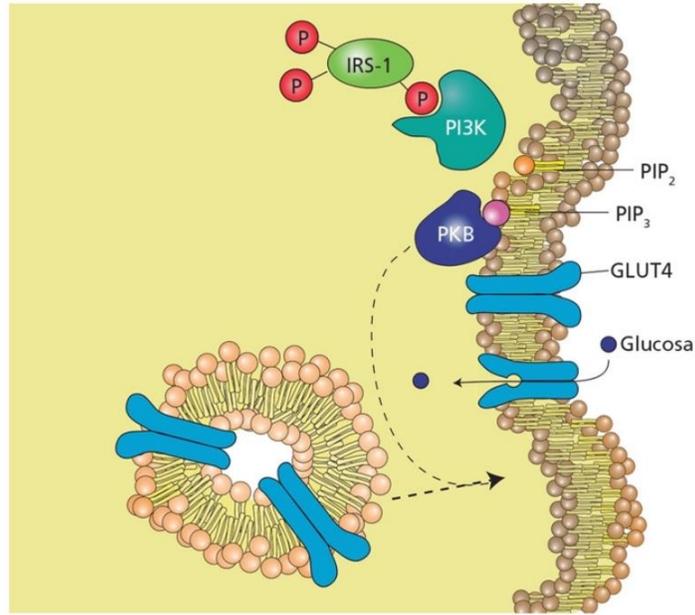


Figura 7. Modelo de activación del transporte de glucosa por la insulina (García Sáinz, 2016).

2.5 Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

Las PTPs catalizan reacciones de desfosforilación a sustratos de naturaleza proteica con residuo de tirosina fosforilada. La PTP1B es miembro de esta superfamilia enzimática. Fue descubierta, identificada y purificada de placenta humana por Tonks y colaboradores en 1988. (Zhao *et al.*, 2018).

La PTP1B es clave en la regulación de la señalización de las hormonas insulina y leptina, actuando como modulador negativo y provocando una reducción de la sensibilidad de estas o bloqueándola por completo, ya que desfosforila el IR y al sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1 o IRS), así como al receptor de leptina (LepR) y la cinasa jano 2 (JAK2), por lo que está relacionada estrechamente con padecimientos como DM2 y obesidad; pero también con cáncer, diversas inflamaciones y la enfermedad de Alzheimer (Zhao *et al.*, 2018). En la **Figura 8** se muestra el rol de esta enzima en algunos de los sustratos más importantes.

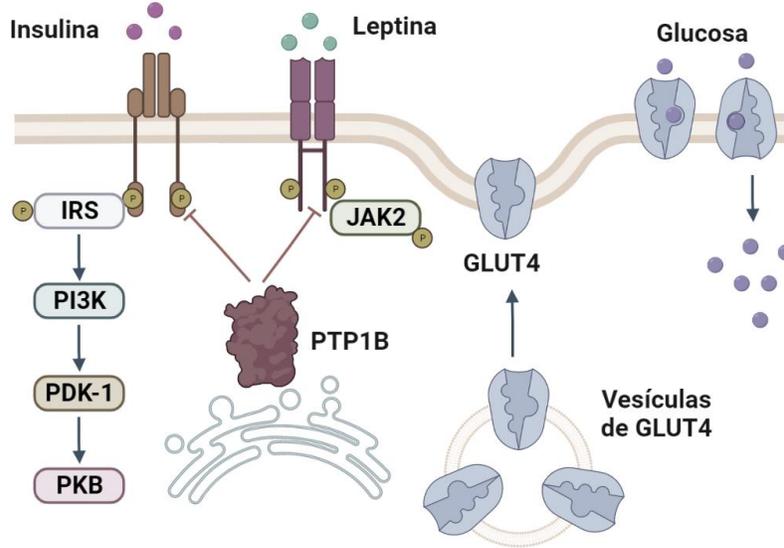
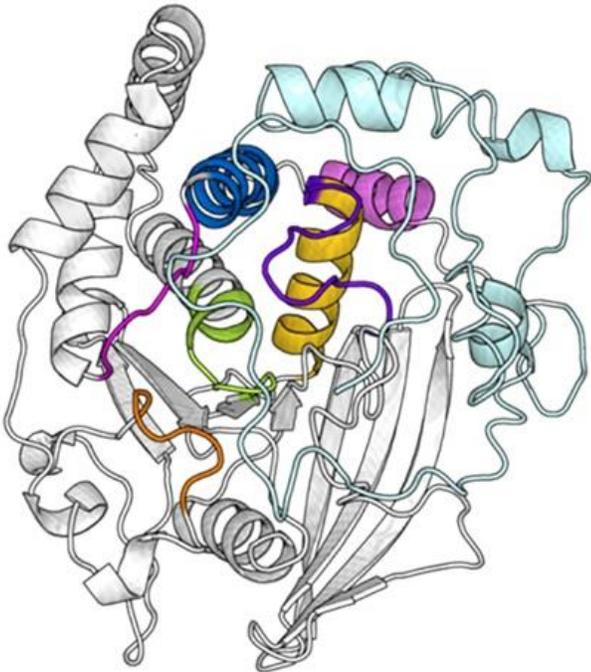


Figura 8. Rol de la PTP1B en la señalización de la insulina y leptina (Quezada Suaste *et al.*, 2023).

La PTP1B es la proteína prototipo de la familia de las PTPs y su estructura comprende 435 aminoácidos y 50 kDa (Bourdeau *et al.*, 2005). Como en todas las proteínas pertenecientes a esta familia, en la PTP1B existe un “loop-P” formado por la secuencia HCXXGXXRRS(T) (X representa cualquier residuo de aminoácido), el cual es un motivo presente en el sitio catalítico, igualmente, todas las PTPs comparten el mismo mecanismo catalítico; que consiste en una desfosforilación en dos pasos conocida como *ping-pong* donde el grupo tiol de la cisteína conservada (C₂₁₅) actúa nucleofílicamente sobre el átomo de fósforo formando un enlace covalente, obteniéndose en este paso un intermediario enzimático tiofosfatado de forma concertada, en este paso ocurre una reacción ácido-base entre el ácido aspártico conservado (D₁₈₁) del “loop-WPD” protonando el grupo saliente y liberando así el sustrato desfosforilado. Posteriormente, con una molécula de agua se lleva a cabo la hidrólisis del intermediario tiofosfatado y la protonación del ácido aspártico, recuperando en este paso la enzima. La molécula de agua en el segundo paso se coordina con el residuo de glutamina (Q₂₆₂) del “loop-Q” manteniendo así la posición óptima para el ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo y realizar la hidrólisis correctamente (Crean *et al.*, 2021). En la **Figura 9** se muestran los dominios estructurales y el mecanismo catalítico.

A



B

Dominio	Residuos	Secuencia
Asa		
WPD	T177 to P188	TTWPDFGVPESP
PTP	H214 to G223	HCSAGIGRSG
Q	R257 to T263	RMGLIQT
SBL	N44 to V49	NRYRDV
Hélice		
$\alpha 3$	A189 to S201	ASFLNFLFKVRES
$\alpha 6$	D265 to I281	DQLRFSYLAVIEGAKFI
$\alpha 7$	S286 to S295	SVQDQWKELS
Dominio C-terminal		
-	P301 to D400	

C

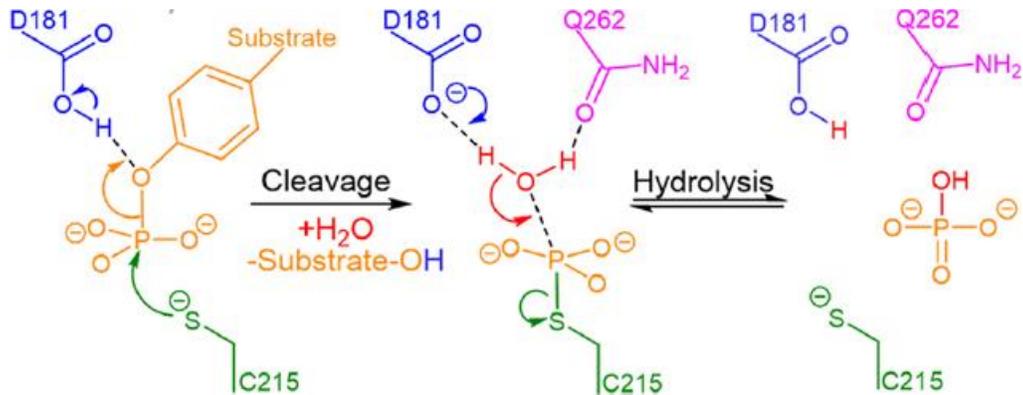


Figura 9. Generalidades de la PTP1B A) Modelo tridimensional de la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ B) Dominios estructurales y C) mecanismo catalítico de la enzima PTP1B, tomada y editada de (Quezada Suaste *et al.*, 2023)

En la mayoría de estudios de inhibición y/o comportamiento de esta enzima se han empleado modelos más cortos (modelos truncos) de 282, 298 o 321 aminoácidos (Quezada Suaste *et al.*, 2023), si bien esto ha conducido al aislamiento de una gran cantidad de inhibidores de origen natural, metabolitos como fumosorinona, preaustinoide A6, barkeleyona C, fructigenina A y

cyclopheno (Jiménez-Arreola *et al.*, 2020); también ha originado la pérdida de información valiosa referente a la interacción enzima-ligando, ya que a pesar de que los modelos truncos de PTP1B albergan los motivos de mayor importancia para la catálisis, también existen interacciones con residuos importantes fuera del sitio catalítico (Choy *et al.*, 2017); se sabe que estos modelos tienen un comportamiento bioquímico diferente cuando son evaluados *in vitro* en comparación con la cadena completa de 435 aminoácidos (PTP1B₁₋₄₀₀), por ejemplo, el ácido ursólico se comporta como un inhibidor competitivo frente a la *h*PTP1B trunca, pero como inhibidor no competitivo frente a la proteína completa (Martínez Aldino *et al.*, 2023). Debido a esto, en este grupo de trabajo se expresó la proteína humana PTP1B₁₋₄₀₀ en *Escherichia coli* (Rosetta, (DE3) pLysS™) para llevar a cabo los ensayos de actividad de los extractos orgánicos, así como de los compuestos puros de origen microbiano.

2.6 Inhibidores de la PTP1B

La mayoría de los inhibidores diseñados para la enzima PTP1B se han enfocado en modelos truncados, abarcando ligandos que se unen al dominio catalítico de manera similar o diferente al sustrato, además de moléculas que interactúan con el sitio alostérico (Hjortness *et al.*, 2018).

Los inhibidores alostéricos tienen la capacidad de bloquear la PTP1B en su conformación abierta, evitando su cambio a la forma cerrada, esencial para la hidrólisis del sustrato (Wiesmann *et al.*, 2004). El cierre del bucle WPD se origina, en parte, por una serie compleja de interacciones de enlaces de hidrógeno entre las hélices α -7, α -3 y α -6. Los inhibidores alostéricos interrumpen estas interacciones al ubicarse entre estas hélices (Qian *et al.*, 2016). Estudios de dinámica molecular han demostrado que la hélice α -7 limita el movimiento de la hélice α -3 y facilita la dinámica del bucle WPD (Choy *et al.*, 2017).

Hasta la fecha, se han descubierto y desarrollado más de 300 inhibidores dirigidos a modelos truncos de PTP1B (PTP1B₁₋₂₉₇, PTP1B₁₋₃₀₀, PTP1B₁₋₃₂₁) (Sharma *et al.*, 2020), que incluyen productos naturales, derivados semisintéticos y compuestos de síntesis total.

Existen dos grandes grupos de compuestos inhibidores de la PTP1B, los sintéticos y los de origen natural, dentro de los primeros se han reportado la síntesis de moléculas de tipo tiazolidinonas,

tiazoles, oxazoles, pirazoles, imidazolidinonas, amidas, sulfoamidas, chalconas, furanos, pirimidinas, esteroides, pirrolidinas, quinoxalidas, morfolinas, entre otras (Agrawal et al., 2023). En cuanto a los compuestos de origen natural, algunos ejemplos de metabolitos secundarios más importantes que se han descubierto se encuentran las albuteínas (Díaz-Rojas et al., 2021), ácido ursólico, compuestos fenólicos, bromofenoles, ácidos grasos, benzofuranos, flavonoides, taninos, esteroides, entre otros (Zhao et al., 2018). Algunos ejemplos de los inhibidores mencionados se muestran en la **Figura 10**. También se ha encontrado que pequeños aniones inorgánicos como el sulfato han mostrado inhibición por la similitud y competencia con el grupo fosfato (Agrawal *et al.*, 2023).

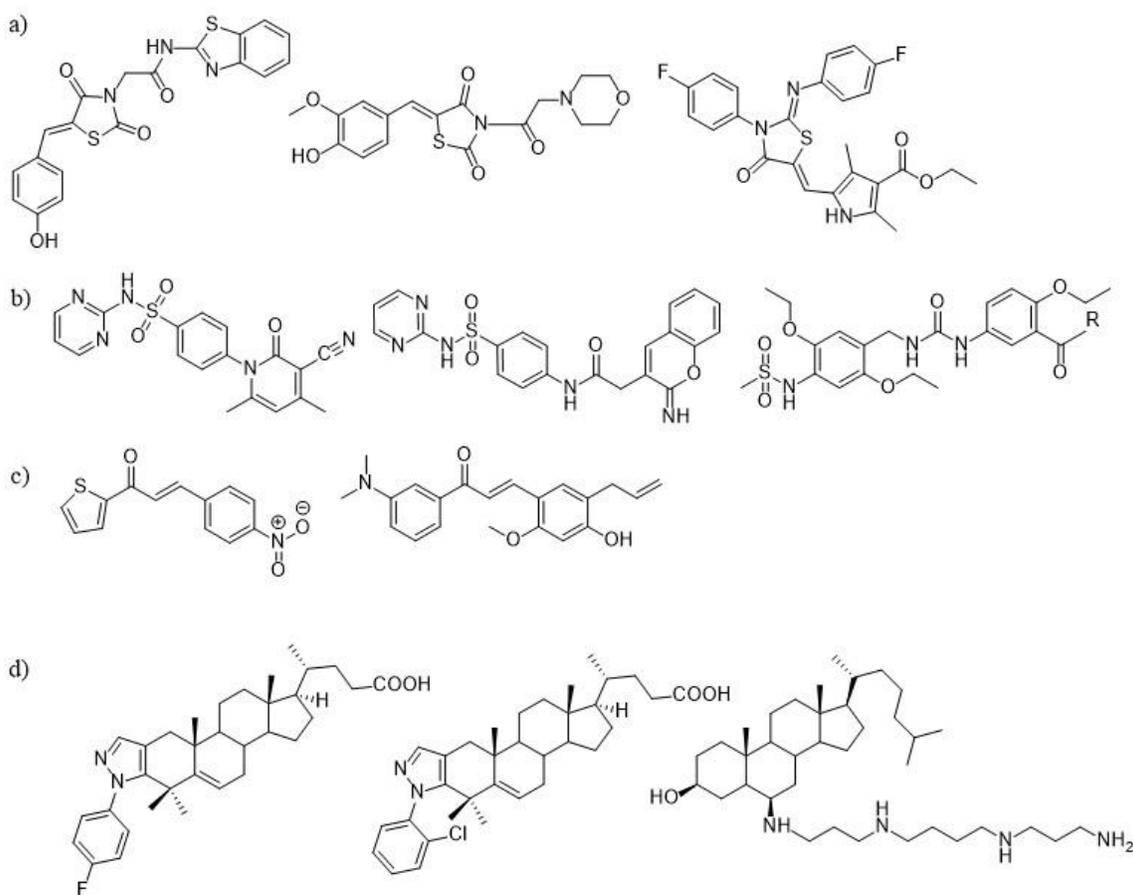


Figura 10. Algunos inhibidores de la PTP1B a) tiazolidinonas, b) sulfonamidas, c) chalconas, d) esteroides (Agrawal et al., 2023).

Sin embargo, ninguno de los inhibidores encontrados ha podido utilizarse hasta ahora como tratamiento para la DMT2, esto en gran parte por la falta de selectividad que estos compuestos muestran tener frente a otras PTPs y otras enzimas en general. Únicamente tres compuestos han

alcanzado la fase de ensayos clínicos, ertiprotafib ($CI_{50}=1.4\mu M$), JTT 551 y trodusquemina ($CI_{50}=1.0\mu M$) (**Figura 11**) (Agrawal *et al.*, 2023), desafortunadamente los ensayos en estas moléculas fueron descontinuados debido a que presentaron poca eficacia, falta de especificidad y notables efectos secundarios (Martínez Aldino *et al.*, 2023).

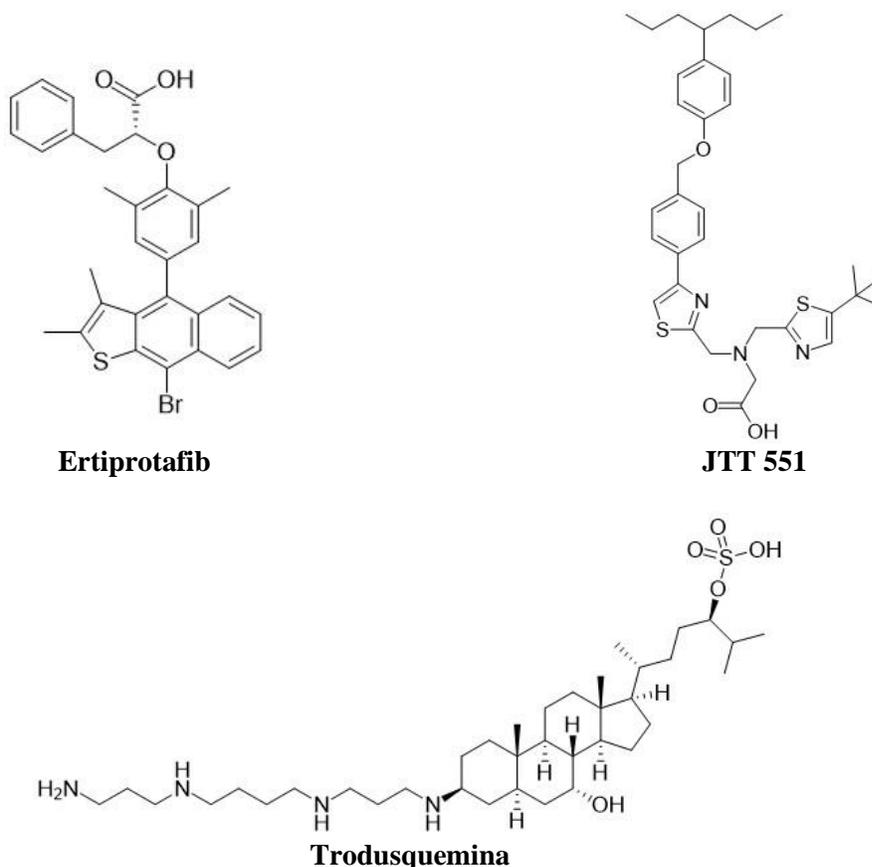


Figura 11. Inhibidores de PTP1B descontinuados en fases clínicas.

En los últimos años, el Laboratorio de productos Naturales de Origen microbiano del Instituto de Química de la UNAM, ha realizado aportaciones muy importantes en la obtención de metabolitos de origen natural con actividad inhibitoria sobre esta enzima, los cuales fueron aislados de los hongos *Aspergillus terreus* IQ-046 y *Talaromyces* sp. IQ-313. Entre los que se han descrito están la butirolactona I (CI_{50} 59.9 μM), duclauxina (CI_{50} 12.7 μM), talaromycesona B (CI_{50} 82.7 μM), xenoclauxina (CI_{50} 21.8 μM), bacillisporina F (CI_{50} 13.4 μM) y xantoeopocina (CI_{50} 8.8 μM) (**Figura 12**).

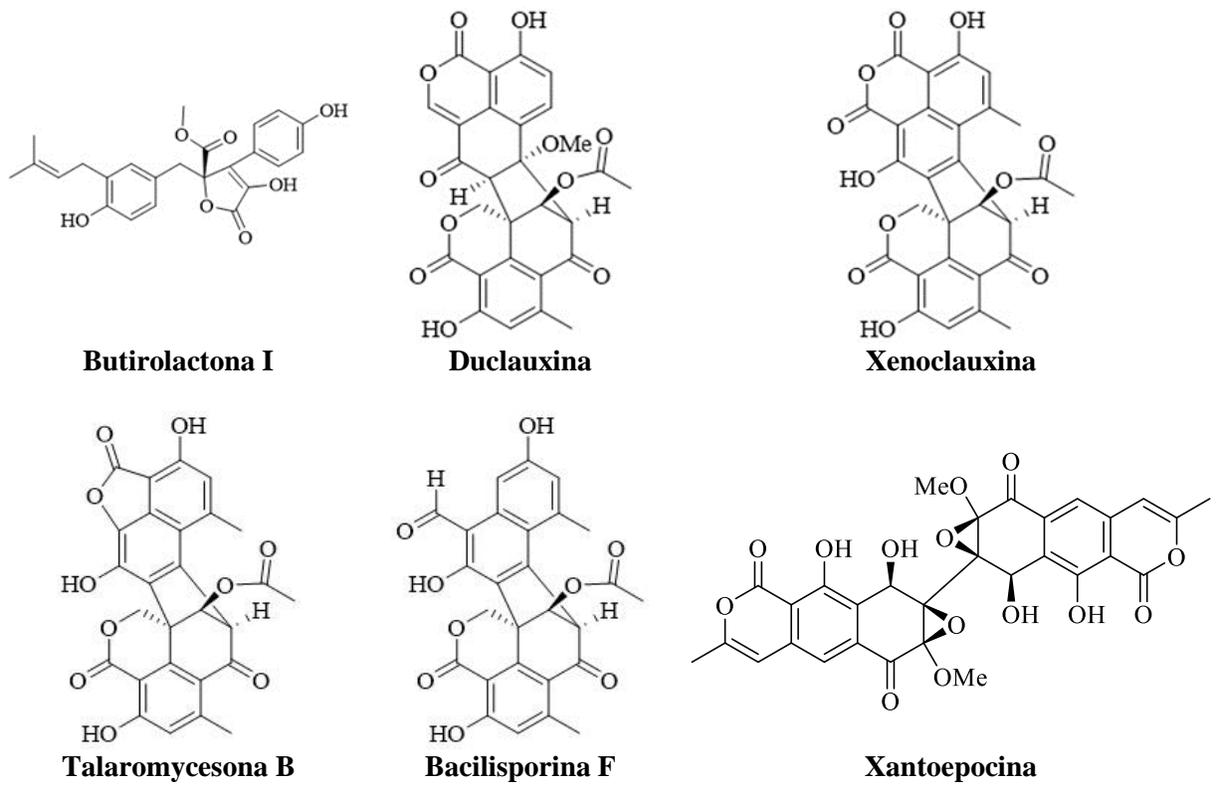


Figura 12. Inhibidores de la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ descritos por este grupo de trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La diabetes es una afección de preocupación a nivel mundial debido al alto número de fallecimientos que provoca cada año, una cifra que sigue en aumento constante. Por ello, resulta crucial buscar estrategias alternativas que permitan mitigar o disminuir las complicaciones asociadas con la enfermedad, particularmente a través de la inhibición de procesos fisiológicos clave que dan lugar al aumento de las concentraciones elevadas de glucosa en plasma. Una estrategia prometedora para cumplir con esta tarea se centra en la inhibición de proteínas blanco, entre las que destaca la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).

La PTP1B, en especial la de cadena completa (*hPTP1B*₁₋₄₀₀), es un blanco farmacológico ampliamente validado que ha sido poco explotado en programas encaminados al descubrimiento de inhibidores, tanto de origen natural como sintético, útiles como prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la DMT2. De hecho, los metabolitos secundarios de origen fúngico aislados de hongos microscópicos constituyen la principal fuente de inhibidores de este blanco molecular.

En este sentido, el **objetivo general** de este trabajo consiste en aislar e identificar los metabolitos secundarios con actividad inhibitoria sobre la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ a partir de hongos endófitos asociados a macroalgas provenientes de la playa Aragón en Santa María Tonameca, Oaxaca y realizar el análisis de aislamiento y actividad enzimática. Este proyecto marca un hito al ser el primer estudio que explora este nicho ecológico y no solo enriquece el conocimiento sobre la diversidad químico-biológica de México, sino que también abre la posibilidad de descubrir nuevas estructuras químicas útiles como prototipos estructurales para el desarrollo de potenciales fármacos para tratar la diabetes.

Para cumplir con este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 3.2.1. Cribar los extractos orgánicos pertenecientes a organismos fúngicos endófitos de macroalgas de la colección del laboratorio 2-5 del Instituto de Química, UNAM, según su capacidad para inhibir la actividad la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ y seleccionar el taxon más apropiado para su estudio químico.
- 3.2.2. Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto orgánico seleccionado mediante procedimientos cromatográficos convencionales.

- 3.2.3. Determinar la estructura química de los compuestos aislados mediante el análisis de sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos.
- 3.2.4. Evaluar los compuestos puros en los ensayos de actividad biológica.
- 3.2.5. Realizar ensayos *in silico* de acoplamiento molecular enzima-ligando con los metabolitos aislados y un modelo generado por homología para la enzima *hPTP1B*₁.

400.

4. HIPÓTESIS

El estudio químico-biológico de hongos endófitos asociados a macroalgas de mares mexicanos conducirá al descubrimiento de especies capaces de biosintetizar metabolitos secundarios novedosos con posible actividad inhibitoria sobre la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

Las muestras biológicas obtenidas para el aislamiento de microorganismos fúngicos endófitos se recolectaron en la playa Aragón en Santa María Tonameca, Oaxaca (15.663147771865845, -96.53259841800926) (**Figura 13**).



Figura 13. Mapa de la zona de estudio. Playa Aragón, Oaxaca.

5.2 Reactivos

Todos los reactivos se adquirieron de alguno de los siguientes distribuidores: Wöhler, MCD Lab, Conda S.A, Sigma-Aldrich, Bio Basic y Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Los disolventes AcOEt, MeOH, Hexano y $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ empleado para la extracción y procesos de fraccionamiento fueron destilados previo a su uso. El MeCN grado HPLC se adquirió en la comercializadora Merck y se empleó sin purificación posterior. El agua desionizada se obtuvo en un desionizador ELGA-Veolia.

5.3 Cultivo en pequeña escala de los microorganismos fúngicos

A partir de las macroalgas recolectadas se aislaron 52 hongos diferentes, para cada uno de ellos se preparó un cultivo con 10 mL de medio líquido PDB incubado a temperatura ambiente en agitación constante por un periodo de 5 a 7 días. Posteriormente, se inoculó el organismo sobre 10 g de medio sólido (Cheerios[®]) dentro de un matraz Erlenmeyer por 21 días en condiciones estáticas con periodos normales de luz y oscuridad. Un matraz por cada organismo.

5.4 Obtención de extractos orgánicos

Transcurrido el tiempo de fermentación, los organismos se trituraron y maceraron con agitación constante con una mezcla de 1:1:1:1 MeOH:DCM:(CH₃)₂CO:AcOEt durante 24 horas, se filtró y el extracto resultante se sometió a un proceso de reparto líquido-líquido entre 1:1 MeCN/MeOH:Hexano, se deshechó la fase hexánica.

5.5 Ensayo de inhibición de sobre la enzima utilizando los extractos orgánicos

El ensayo de inhibición se realizó *in vitro* en una placa de 96 pozos, la concentración de enzima se determina antes de iniciar el ensayo a partir de una curva de actividad enzimática, se utilizó como sustrato fosfato de 4-nitrofenilo disódico hexahidratado a una concentración de 30 mM, en una solución buffer de pH 6.8 con HEPES 50 mM, NaCl 100 μM, 1.5 mM DTT. Los extractos orgánicos se disolvieron en DMSO y se evaluaron a una concentración final de 100 ppm. Se utilizó DMSO como control negativo o blanco. La actividad de la enzima y su inhibición se determinó por espectrofotometría a 405 nm utilizando un lector de placas y el software Gen 5. La lectura de la placa se hace a tiempo inicial y después de 20 minutos de incubación a 37 °C.

El porcentaje de inhibición de los extractos se determinó utilizando la **Ecuación 1**.

$$\%inh = \left(1 - \frac{A_{extracto\ a\ 405\ nm}}{A_{blanco\ a\ 405\ nm}}\right) * 100 ; \text{Ecuación 1.}$$

Cada valor de absorbancia en la fórmula corresponde a la absorbancia corregida (diferencia de la absorbancia entre tiempo inicial y tiempo final).

5.6 Escalamiento del hongo seleccionado

Con base en los datos de actividad biológica y considerando el perfil cromatográfico del extracto orgánico de los organismos con mayor actividad, se eligió el aislamiento del IQ-1687 para su escalamiento, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3 pero realizándose en 15 matraces Erlenmeyer con 10 g de medio sólido cada uno.

El perfil cromatográfico de cada organismo se obtuvo por HPLC en fase reversa utilizando una columna C₁₈ con un sistema de elución establecido como **método general** el cual se basa en un gradiente iniciado con 20% MeCN y 80% agua (miliQ al 0.1% de ácido fórmico) hasta llegar a 100% acetonitrilo en 30 minutos.

5.7 Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

A partir del extracto orgánico escalado se eliminó el disolvente de extracción y el material resultante se resuspendió en 250 mL de una mezcla 8:2 DCM:MeOH. Posteriormente, la suspensión resultante se sometió a un proceso de reparto líquido-líquido con 250 mL de agua. Ambas fases se llevaron a sequedad. El mayor rendimiento se encontró en la fase acuosa. Subsecuentemente, esta fase se disolvió en MeOH y se sometió a un proceso de reparto con hexano. Se desechó la fase hexánica y se evaporó el metanol de la fase orgánica obteniendo 1.25 g del extracto final.

Posteriormente, 450 mg de extracto se disolvieron en 4.5 mL de una mezcla dioxano:metanol, esta suspensión se centrifugó para separar los metabolitos secundarios de los posibles carbohidratos insolubles, se tomó el sobrenadante y se evaporó. Este procedimiento generó una masa final de 272 mg, la cual se disolvió en 2.5 mL de una mezcla dioxano:metanol:DMSO. La resolución de esta mezcla por HPLC en fase inversa en una columna preparativa C₁₈ con un flujo de 15 mL/min y un sistema de elución de gradiente iniciando con 20% acetonitrilo y 80% agua (miliQ al 0.01% de ácido fórmico) hasta obtener 70% de acetonitrilo en 30 minutos, condujo al aislamiento de cuatro metabolitos: **1**, **2**, **3a** y **3b**.

5.8 Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando compuestos puros

El ensayo de los compuestos puros aislados se realizó también *in vitro* sobre una placa de 96 pozos, bajo las mismas condiciones establecidas para los ensayos utilizando los extractos orgánicos, en esta ocasión los metabolitos se emplearon a una concentración de 100 µM.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos

A partir de muestras de macroalgas colectadas en la costa oaxaqueña, se aislaron un total de 52 hongos microscópicos con diferentes características morfológicas. Como se puede observar en la **Tabla 3**, la división de algas de la cual se aislaron mayor número de especies fúngicas fue Phaeophyceae con 17 organismos; sin embargo, *Bryopsis* (*Chlorophyta*) y *Amphiroa* (*Rhodophyta*), fueron los géneros que presentaron mayor abundancia de especies aisladas, obteniendo 10 microorganismos por cada género. La identificación taxonómica de las algas se realizó en colaboración con el Dr. Julio Acosta Calderón, de la UMAR, Huatulco.

Tabla 3. Microorganismos fúngicos aislados junto con el género y división del alga de procedencia.

División de alga de procedencia	Género de alga de procedencia	Código de organismo aislado
Rhodophyta	<i>Ahnfeltiopsis</i>	IQ-1672, IQ-1687
	<i>Amphiroa</i>	IQ-1676, IQ-1678, IQ-1679, IQ-1680, IQ-1681, IQ-1682, IQ-1683, IQ-1686, IQ-1694
	<i>Dermonema</i>	IQ-1644, IQ-1645, IQ-1646, IQ-1648, IQ-1656, IQ-1684, IQ-1692
	<i>Hypnea</i>	IQ-1647, IQ-1668, IQ-1669, IQ-1670, IQ-1671
Chlorophyta	<i>Bryopsis</i>	IQ-1643, IQ-1649, IQ-1650, IQ-1651, IQ-652, IQ-1654, IQ-1655, IQ-1657, IQ-1658, IQ-1693, IQ-1695, IQ-1696
Phaeophyceae	<i>Padina</i>	IQ-1653, IQ-1664, IQ-1665, IQ-1666, IQ-1667, IQ-1688, IQ-1689
	<i>Sargassum</i>	IQ-1662, IQ-1663, IQ-1673, IQ-1674, IQ-1675, IQ-1690
	<i>Chnoospora</i>	IQ-1659, IQ-1660, IQ-1661, IQ-1691

6.2 Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando los extractos orgánicos

Para cada uno de los microorganismos listados en la **Tabla 3** se preparó su extracto orgánico de acuerdo con la metodología descrita en la sección **5.4**. Posteriormente, se determinó el potencial inhibitorio de cada uno de ellos sobre la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀. En la **Figura 14** se representa el porcentaje de inhibición asociado a cada extracto orgánico evaluado a 100 ppm, la línea roja marca los extractos que tuvieron una inhibición mayor al 50%.

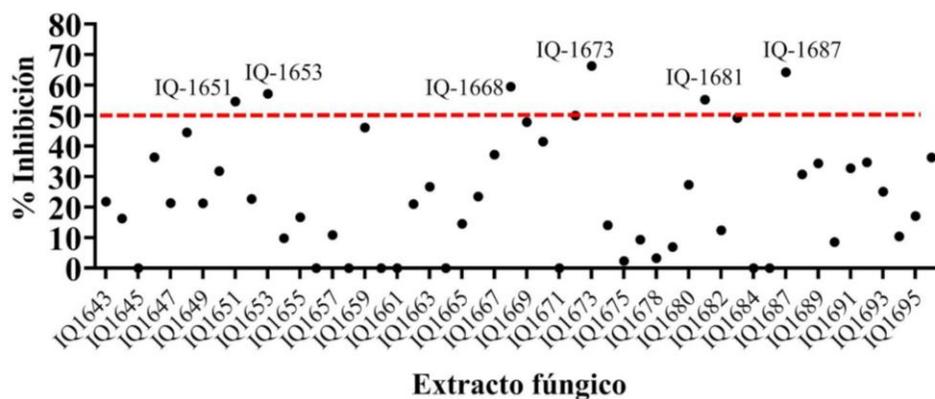


Figura 14. Actividad inhibitoria sobre la enzima $hPTP1B_{1-400}$ de los 52 extractos fúngicos, evaluados a 10 ppm.

Los resultados de esta evaluación identificaron seis extractos con un porcentaje de inhibición mayor al 50%; IQ-1651 con 54.7%, IQ-1653 con 57.2%, IQ-1668 con 59.5%, IQ-1673 con 66.3%, IQ-1681 con 55.2% e IQ-1687 con 64.2%.

Con base en estos resultados y la complejidad cromatográfica de cada extracto, se eligió al ascomiceto identificado con el código IQ-1687, con un rendimiento de 55 mg/g de cultivo, para realizar su estudio químico conducente a la obtención de los metabolitos secundarios bioactivos; este hongo se aisló a partir de una macroalga perteneciente a la división Rhodophyta y al género *Ahnfeltiopsis*.

6.3 Perfil cromatográfico del extracto.

El perfil cromatográfico del extracto orgánico del ascomiceto IQ-1687 (**Figura 15**) reveló la presencia de por lo menos cuatro compuestos. El compuesto asociado al pico con tiempo de retención de 13 minutos mostro un rendimiento demasiado bajo, por lo que el aislamiento estuvo dirigido a los compuestos asociados a los picos con tiempo de retención de 10.8 (**1**), 11.6 (**3a/3b**) y 20.9 (**2**) min. Cabe aclarar que los compuestos **1** y **2** ya se encuentran reportados en la literatura con una nomenclatura definida como A para **1**, y B para **2**, para mantener esa nomenclatura se decidió nombrar a los compuestos con tiempo de retención de 11.6 min como **3a** y **3b**, ya que corresponde a una mezcla epimérica de dos compuestos.

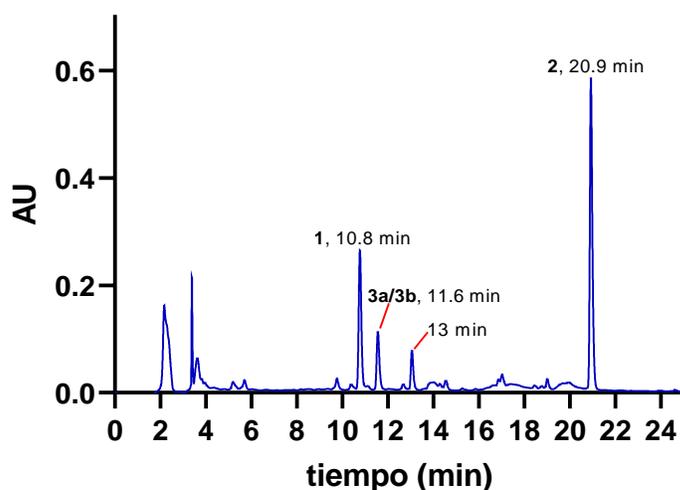


Figura 15. Cromatograma de HPLC fase reversa, columna analítica C₁₈ elución por método general 30 minutos, λ 254nm.

6.4 Identificación taxonómica del hongo seleccionado

El organismo fúngico IQ-1687 (**Figura 16**) pertenece al filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina; clase Eurotiomycetes; subclase Eurotiomycetidae; orden Eurotiales; familia Aspergillaceae. Su identificación taxonómica a nivel de género se realizó empleando métodos moleculares de secuenciación, identificando al hongo con el género *Aspergillus*; subgénero *Aspergillus* *Nidulantes* y posiblemente con la especie *Aspergillus sydowii*, sin embargo, se requiere de más información para confirmarlo.



Figura 16. IQ 1687 en cereal Cheerios ®

6.5 Rendimientos obtenidos

La resolución del extracto metanólico (270 mg) por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en modo preparativo (HPLC-preparativo) empleando el sistema de elución descrito en el apartado 5.6 llevó al aislamiento de los compuestos **1**, **3a/3b** y **2** con los rendimientos indicados en la **Tabla 4**.

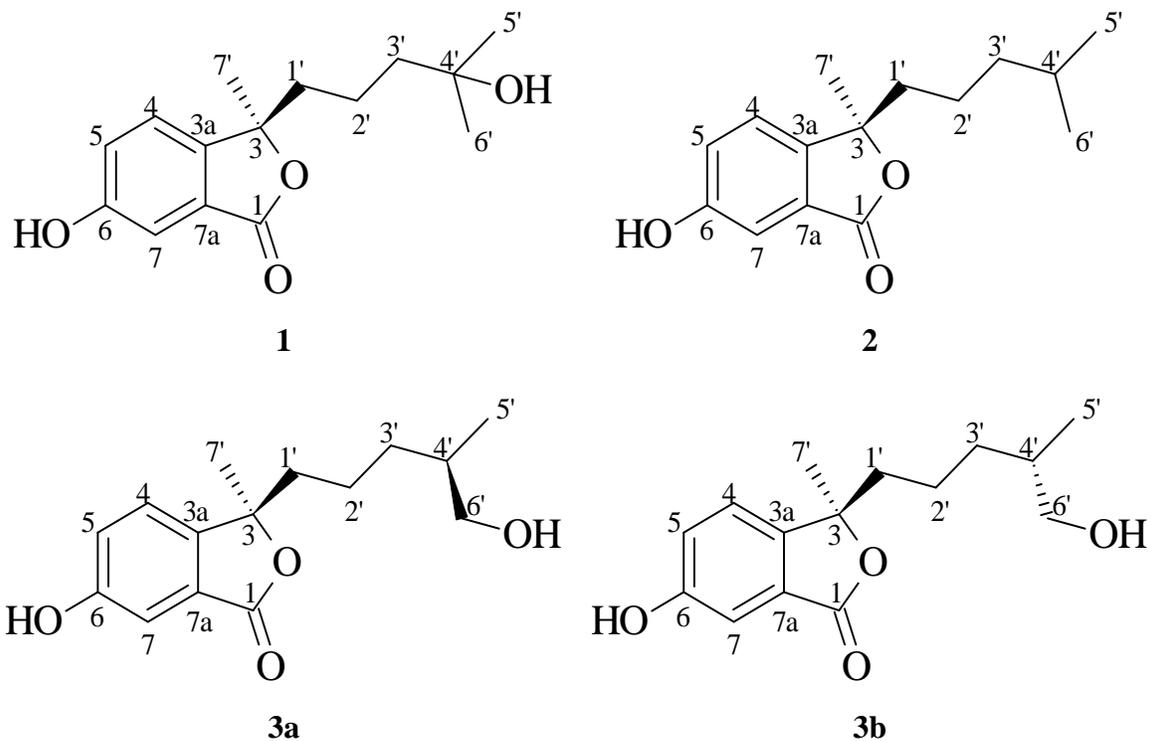
Tabla 4. Rendimiento de los metabolitos aislados.

Compuesto	Rendimiento/mg
1	2.6
3a/3b	0.5
2	5

El rendimiento de los metabolitos aislados coincide con el perfil cromatográfico mostrado en la **Figura 15**, ya que a partir de la absorbancia máxima de cada pico el tamaño de estos guarda una evidente proporción, siendo el pico del compuesto **2** (20.9 min) el doble del tamaño del pico del compuesto **1** (10.8 min), así como este último tiene mayor tamaño que el pico de los compuestos **3a/3b** (11.6 min).

6.6 Caracterización estructural de los productos 1, 2 y 3a/3b.

La elucidación estructural en dos dimensiones de las moléculas **1-3** se realizó empleando un conjunto de métodos espectroscópicos UV y RMN (RMN-¹H (700 MHz), RMN-¹³C (175 MHz), RMN-bidimensionales) utilizando el equipo Bruker AVANCE III HD a 700 y 175 MHz respectivamente y espectrométricos EM-AR (espectro de masas de alta resolución) por análisis directo en tiempo real (DART, por sus siglas en inglés) con un potencial de ionización de 19.8 eV utilizando un espectrómetro de masas Jeol JMS-T100LC. Mientras que para establecer su configuración absoluta se empleó difracción circular electrónico (DCE). Con base a esto se estableció la estructura de los productos **1-3** como se muestra en el **Esquema 1**.



Esquema 1. Estructura de los metabolitos aislados **1-3**

La caracterización molecular de los compuestos **1-3** inició con la adquisición de sus espectros de masas (Figura **17-A-17-C**, respectivamente). Para todas las moléculas se observó el ion molecular protonado $[M+H]^+$ en las relaciones masa/carga (m/z) de 265.1456 Da ($\Delta = -5.1$ ppm), 249.14707 Da ($\Delta = -5.8$ ppm) y 265.1373 ($\Delta = -5.5$ ppm) Da para **1-3**, correspondientemente. Con base en estos resultados, las fórmulas moleculares se establecieron como $C_{15}H_{20}O_4$ para **1**, $C_{15}H_{20}O_3$ para **2** y $C_{15}H_{20}O_4$ para **3a/3b**. En todos los casos las fórmulas permiten un índice de deficiencia de hidrógenos (Ω) de 6.

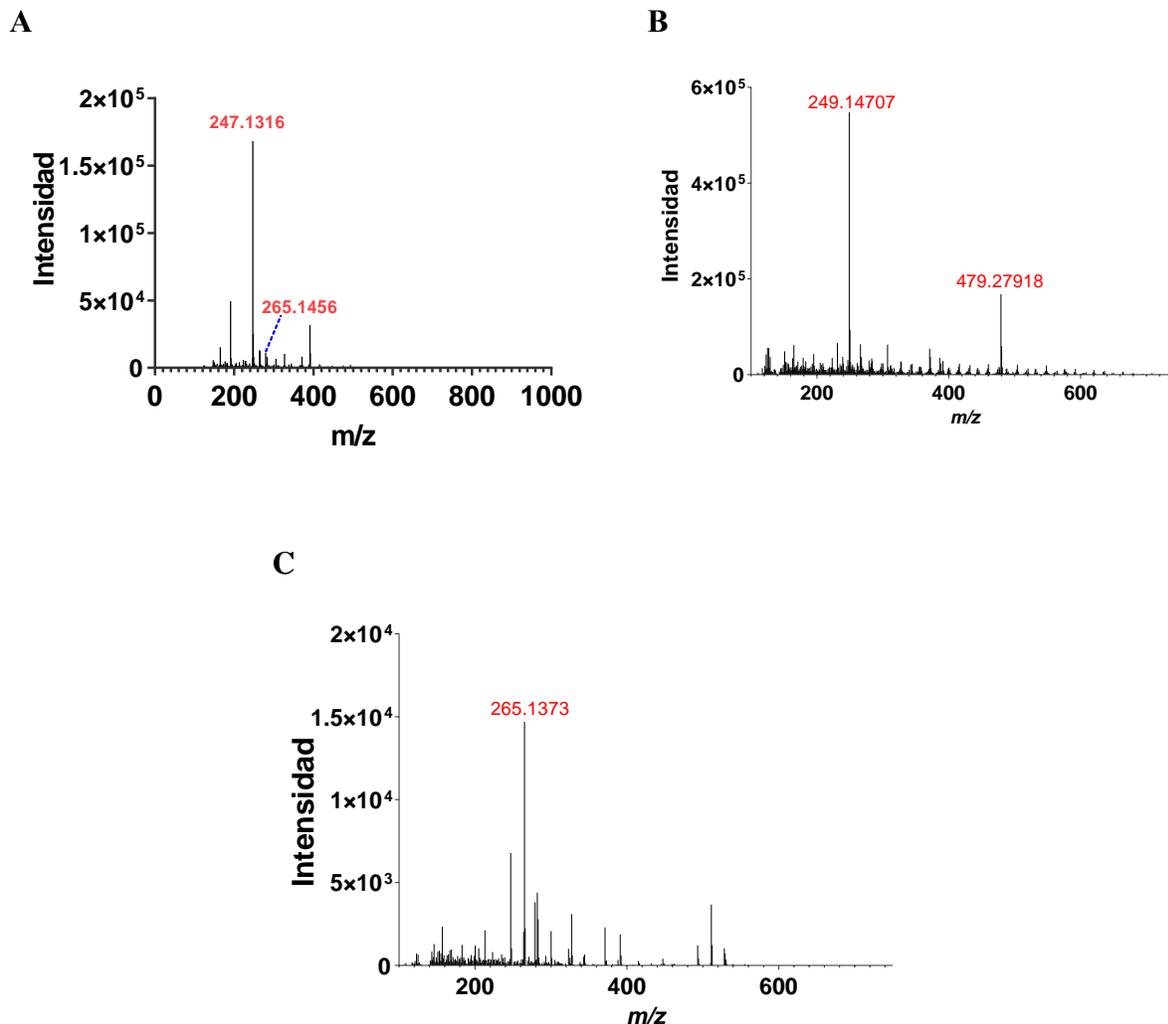
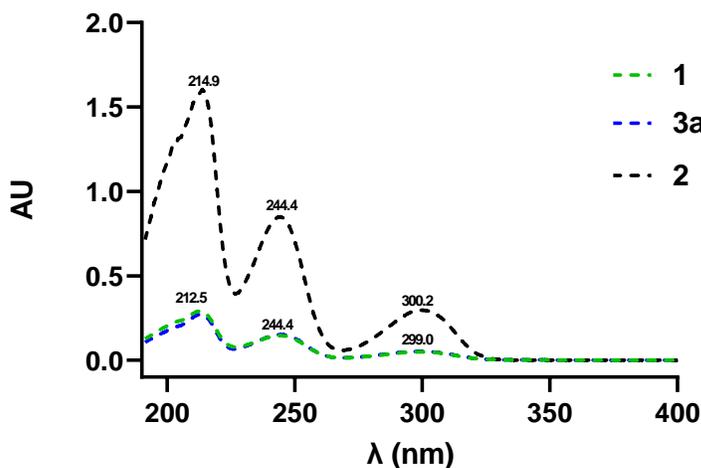


Figura 17. Espectros de masas (19.8 eV) de los compuestos **1-3**

Los espectros de UV para los tres productos (**1-3**; **Figura 18-A**), muestran máximos de absorción en $\lambda = \sim 212, 244$ y 300 nm, asignables a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ respectivamente (Wen-Jian Lan et al., 2014).

Como se observa en la **Figura 18**, la longitud de onda máxima absorbida en cada compuesto es muy similar, lo que indica que tienen un grupo cromóforo en común, posiblemente un grupo fenólico. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\sim 212, 244$ nm) evidencia la presencia de una γ -lactona- α, β -insaturada (**Figura 18-B**) ya que este tipo de compuestos usualmente es asociado a estos valores de longitud de onda (Uchida y Kuriyama, 1974).

A



B



Figura 18. A) Espectro de absorción UV de los compuestos **1-3**. B) Estructura general de una γ -lactona α,β -insaturada

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (**Figuras 19 y 20 y Tablas 5-7**) se registraron a 700 y 175 MHz, respectivamente en $\text{MeOH-}d_4$ y mostraron las siguientes señales en común:

- Para los cuatro compuestos se observa un sistema ABX (tres señales) en campo bajo asociado a un anillo aromático trisustituido, δ_{H} 7.2 ($J = 8.0$ Hz, H-4), 7.4 ($J = 8.0$ Hz, H-5) y 7.36-7.37 (H-7). Las constantes de acoplamiento de 8.0 Hz son indicativas de un acoplamiento *orto*. Estos hidrógenos correlacionan con los carbonos en δ_{C} 126-127 (C-4), 120-121 (C-5) y 117-118 (C-7) en el espectro bidimensional HSQC. La señal asignable a C-6 aparece en δ_{C} 155-156, desplazamiento característico de un carbono sp^2 base oxígeno.
- En δ_{H} 1.59-1.60 se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos, asignada al metilo de la posición $-\text{CH}_3-7'$ que correlaciona con el carbono en δ_{C} 27.4-28.8 en el espectro HSQC. La correlación a dos enlaces de distancia en el espectro HMBC de los hidrógenos de $-\text{CH}_3-7'$ con el carbono sp^3 base de oxígeno C-3 en δ_{C} 76.5-77.9, permitió posicionar el grupo metilo.
- En δ_{H} 1.78-1.80 y 1.93-1.95 (δ_{C} 42.4-43.7) se observan dos señales ddd que integran para uno y se asignaron a los hidrógenos de H-1'. La multiplicidad de las señales y su vecindad con un centro asimétrico les confieren carácter diastereotópico, de la misma manera que los hidrógenos vecinos de la posición H-2'. En conjunto, esta información sumada con aquella

obtenida a partir del espectro homonuclear bidimensional COSY permitieron ensamblar el sistema de espín H-1'-H-3'.

- Los carbonos sp^2 C-3a, C-7a y el carbono de C-1 se muestran como señales muy atenuadas o inexistentes en los espectros unidimensionales RMN- ^{13}C por lo que sus asignaciones se hicieron con base en las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC. Los δ_C para las posiciones C-3a (135-136) y C-7a (129-134) muestran diferencias significativas, esto debido a que el C-7a está ligeramente más protegido que C-3a, por encontrarse dentro del campo de protección del oxígeno del carbonilo de la lactona fusionada al anillo aromático. El C-1 es el carbono más desprotegido por ser carbonílico, y su asignación fue posible considerando las correlaciones observadas en los espectros HMBC de los protones H-5 y H-7 con sus respectivas resonancias en δ_C 171-172.

Las diferencias principales observadas en los tres espectros para los cuatro compuestos son las siguientes

Para el compuesto 1:

- Se observa una señal en el espectro de RMN- ^{13}C en δ_C 70.0 ppm asignable a un carbono tetrasustituido con hibridación sp^3 , este desplazamiento es característico de carbonos base oxígeno y se asignó a C-4'. Su asignación se realizó considerando las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC con los hidrógenos de las posiciones H-5' y H-6' (δ_H 1.10 y δ_H 1.11).
- Las señales asignadas a los hidrógenos H-5' (δ_H/δ_C 1.10/27.7) y H-6' (δ_H/δ_C 1.11/27.5) ambas integran para tres hidrógenos y son señales simples, por lo que cada una es atribuible a un metilo.

Para el compuesto 2:

- Se muestra una señal δ_H 1.48 ppm que integra para uno, con multiplicidad triple de cuartetos ($J = 13.3, 7.2, 6.6$ Hz) que correlaciona con el carbono en δ_C 27.7 ppm en el espectro HSQC. Este conjunto de señales se asignó al metino de la posición H-4'. La multiplicidad triple se asocia al acoplamiento con el metileno H-3' y cuarteto por acoplamiento con los metilos H-5'/6' equivalentes.

- Los hidrógenos H-5'/6' se asignaron a dos señales dobles (pero traslapadas entre ellas) ($J = 6.6$ Hz) δ_H 0.82 y δ_C 23.0 con integración de seis hidrógenos por corresponder a dos metilos.

Para los compuestos **3a** y **3b**:

- Se muestran señales de carbono dobles, ya que es una mezcla epimérica de dos compuestos.
- Se observa una señal también en δ_H 0.83 ppm doble (δ_C 15.5 y 15.61), sin embargo, integra únicamente para tres hidrógenos, por lo que se asocia a solamente un metilo H-5'.
- En el caso de estos compuestos los hidrógenos de H-6' (metilos en **1** y **2**) se desdoblaron en dos señales múltiples que se encuentran desplazadas a δ_H 3.34 y 3.26 y son asignables a un metileno, ambas señales integran para un hidrógeno, ya que están vecinas a un carbono asimétrico y son hidrógenos diastereotópicos (carbono epimérico). Estas resonancias mostraron una correlación con los carbonos en δ_C 66.9 y 67.0 ppm (carbono base oxígeno).
- La señal en δ_H/δ_C 1.51/35.37 y 35.38 ppm se asignó al metino H-4'.

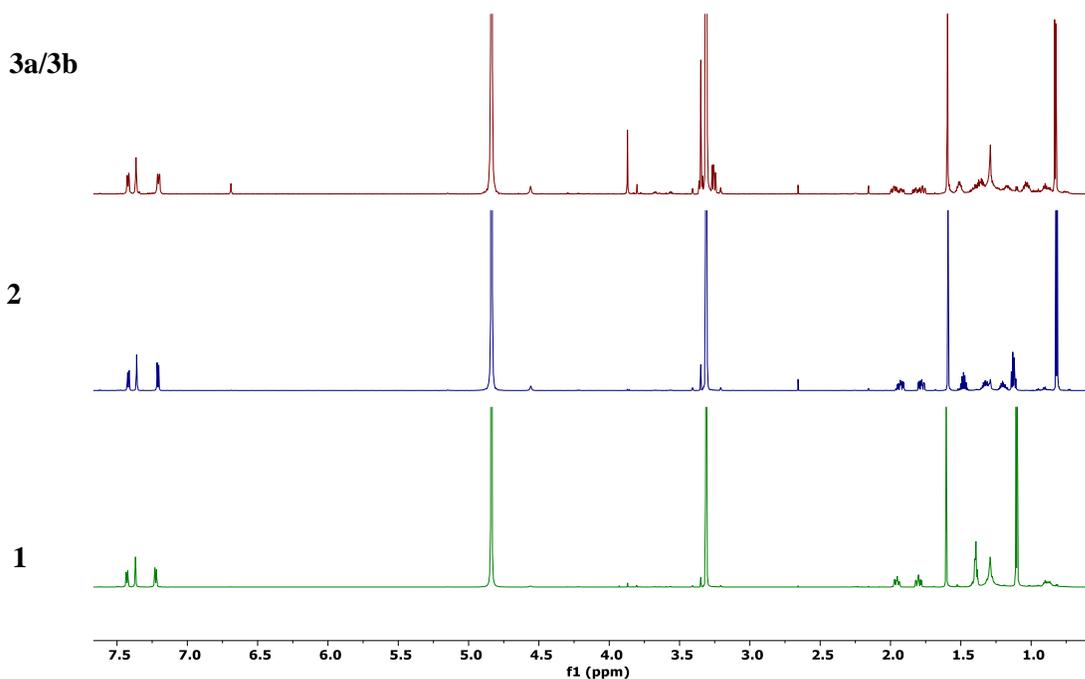


Figura 19. Espectros de RMN- ^1H (700 MHz, CD_3OD) de **1-3**.

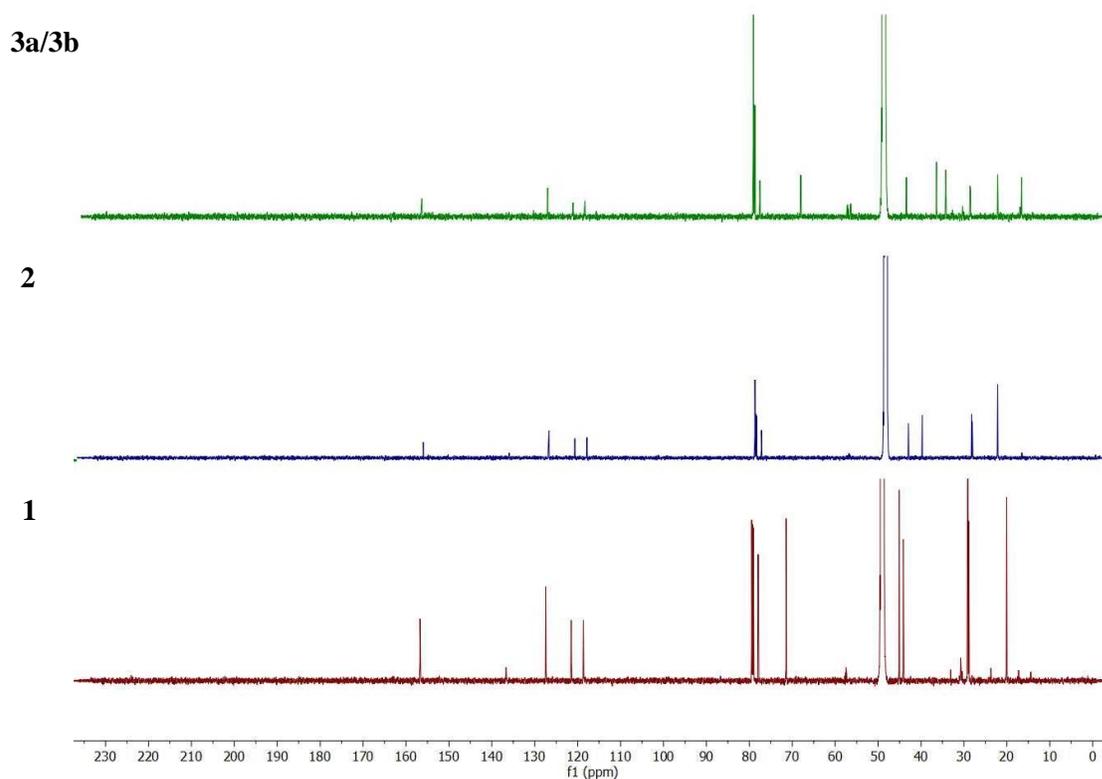


Figura 20. Espectros de RMN- ^{13}C (175 MHz, CD_3OD) de **1-3**

Los cuatro metabolitos aislados tienen un núcleo de ftálica (isobenzofuranona). Los compuestos **1** y **2** (pseudaboydina A y pseudaboydina B, respectivamente) han sido previamente reportados en la literatura como metabolitos secundarios del hongo *Pseudallescheria boydii* asociado a la estrella de mar *Acanthaster planci* (Wen-Jian Lan *et al.*, 2014). Siguiendo este orden, a los compuestos **3a** y **3b** se les asignaron los nombres triviales pseudaboydina C (4'-*R*) y 4'-*epi*-pseudaboydina C (4'-*S*) por su semejanza estructural. La asignación de las señales de RMN de **1** y **2** reportada por Wen-Jian Lan y colaboradores se encuentran en la **Tabla 5**. La asignación de las señales de RMN de **1** y **2** obtenidas en este trabajo se reportan en la **Tabla 6**, y las asignaciones de **3a/3b** en la **Tabla 7**.

Tabla 5. Datos de RMN-¹H y ¹³C de **1** y **2** reportados en literatura por Wen-Jian Lan y colaboradores obtenidos a 400 y 100 MHz, CD₃OD.

Posición	1			2		
	δ _c	Tipo de C	δ _H , m, (J/Hz)	δ _c	Tipo de C	δ _H , m, (J/Hz)
1	171.8	C		171.6	C	
3	77.7	C		79.1	C	
3a	137.1	C		135.5	C	
4	124.7	CH	7.13, d (8.0)	126.5	CH	7.08, d (8.0)
5	121.5	CH	7.56, d (8.0)	121.3	CH	7.54, d (8.0)
6	157.1	C		156.1	C	
7	119.0	CH	7.55, s	119.3	CH	7.57, s
7a	129.7	C		129.8	C	
1'	33.9	CH ₂	2.45, brd (13.6)	42.9	CH ₂	1.92, dt (14.4, 8.0)
			1.65, m			1.80, dt (14.4, 8.0)
2'	16.7	CH ₂	1.71, m	21.7	CH ₂	1.29, m
3'	36.8	CH ₂	1.52, m	39.1	CH ₂	1.16, m
4'	75.4	C		27.8	CH	1.49, nine (6.4)
5'	32.0	CH ₃	1.28, s	22.6	CH ₃	0.82, d (6.4)
6'	24.8	CH ₃	0.95, s	22.4	CH ₃	0.82, d (6.4)
7'	31.4	CH ₃	1.50, s	29.0	CH ₃	1.68, s

Cabe destacar que Wen-Jian Lan y colaboradores reportaron los desplazamientos para los compuestos **1** y **2** en CDCl₃, sin embargo, de acuerdo con la evidencia experimental obtenida en este trabajo, es posible que el registro de sus espectros se haya hecho en CD₃OD, ya que sus valores son más cercanos a los registrados en este disolvente.

Tabla 6. Asignación de señales de RMN a 700 (¹H) y 175 (¹³C) MHz, registrados en CD₃OD, respectivamente para los compuestos **1** y **2**.

Posición	1			2		
	δ_C /ppm	Tipo de carbono	δ_H /ppm, J/Hz	δ_C /ppm	Tipo de carbono	δ_H /ppm, J/Hz
1	170.9 ^a	C		172.0 ^a	C	
3	76.6	C		77.9	C	
3a	135.3	C		136.7	C	
4	126.1	CH	7.23, d (8.02)	127.4	CH	7.21 d (8.0)
5	120.1	CH	7.43, da (8.02)	121.4	CH	7.42 d (8.0)
6	155.3	C		156.7	C	
7	117.3	CH	7.37, sa	118.6	CH	7.36 s
7a	133.3 ^a	C		134.4 ^a	C	
1'	42.7	CH ₂	1.80, ddd (14.1, 12.8, 3.8)	43.7	CH ₂	1.78 ddd (13.7, 12.1, 4.5)
		CH ₂	1.95, ddd (13.6, 12.8, 3.8)		CH ₂	1.93 ddd (13.8, 7.8, 4.6)
2'	18.7	CH ₂	1.29, m	22.9	CH ₂	1.20 m
		CH ₂	1.39, m		CH ₂	1.33 m
3'	43.7	CH ₂	1.38 traslapada	40.5	CH ₂	1.12, dt (8.5, 7.1)
		CH ₂	1.40 traslapada			
4'	70.0	C		29.0	CH	1.48, tq (13.3, 7.2 6.7)
5'	27.7	CH ₃	1.10 s	23.0	CH ₃	0.82, d (6.6)
6'	27.8	CH ₃	1.11 s	23.0	CH ₃	0.82, d (6.6)
7'	27.5	CH ₃	1.60 s	28.8	CH ₃	1.59 s

^aEl valor de desplazamiento se obtuvo del espectro de HMBC.

Tabla 7. Asignación de señales de resonancia magnética nuclear de los compuestos **3a** y **3b**.

Posición	3a y 3b		
	δ_C /ppm	Tipo de carbono	δ_H /ppm, J/Hz
1	171.7 ^a	C	
3	76.5	C	
3a	135.0 ^a	C	
4	126.0	CH	7.21, d (7.9)
5	120.11 y 120.07 ^b	CH	7.42, d (7.9)
6	155.3	C	
7	117.3	CH	7.36 s
7a	129.3	C	
1'	42.4	CH ₂	1.79 m
		CH ₂	1.95 m
2'	33.23 y 33.21 ^b	CH ₂	1.03 m
		CH ₂	1.35 m
3'	21.13 y 21.15 ^b	CH ₂	1.38 m
		CH ₂	1.17 m
4'	35.37 y 35.38 ^b	CH	1.51m
5'	15.55 y 15.61 ^b	CH ₃	0.83 d
6'	66.94 y 67.01 ^b	CH ₂	3.34 m traslapada
		CH ₂	3.26 m
7'	27.4 y 27.6 ^b	CH ₃	1.59 s

^aEl valor de desplazamiento se obtuvo del espectro de HMBC

^bSe asigna más de un carbono a las mismas señales de RMN-¹³C ya que es el espectro de una mezcla epimérica de dos estereoisómeros.

Habiendo determinado la estructura química de los metabolitos aislados se estableció su configuración absoluta en C-3, para lo cual se utilizó la técnica espectroscópica de dicroísmo circular electrónico (DCE). Esta técnica se puede utilizar gracias a que los compuestos aislados tienen en su estructura un grupo cromóforo cerca del centro asimétrico.

A continuación, se presentan los espectros de DCE registrados para los productos **1-3** (Figura 22). Como se puede observar los espectros de los compuestos **1**, **3a** y **3b** muestran una zona de ruido por debajo de 250 nm, por lo que la discusión de resultados se centrará en el espectro del compuesto **2**, no obstante, los tres muestran una similitud bastante notoria, con un efecto Cotton positivo en 300 nm.

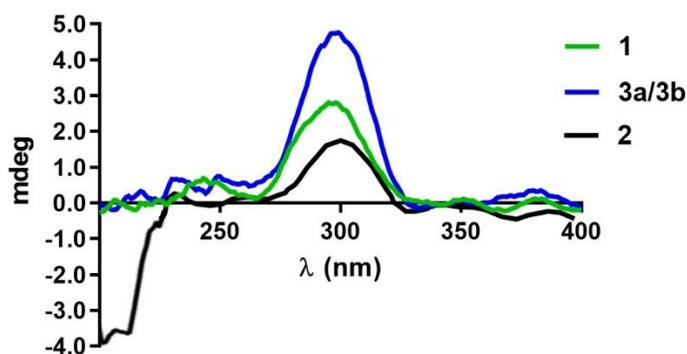


Figura 21. Espectros de DCE de los metabolitos aislados 1-3

Si bien, para determinar la configuración absoluta utilizando DCE debe hacerse mediante softwares especializados como Gaussian, para realizar los cálculos teóricos de las funciones de onda moleculares y obtener las conformaciones de menor energía para así compararlas con los resultados experimentales, en este trabajo nos limitaremos a hacer una comparación del espectro reportado por Wen-Jian Lan y colaboradores para la Pseudaboydina B con el espectro obtenido experimentalmente de ese mismo compuesto (**Figuras 23 y 24**, respectivamente).

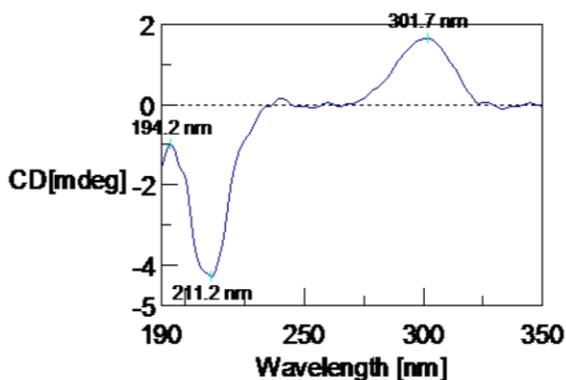


Figura 22. Espectro de DCE de la Pseudaboydina B reportado por Wen-Jian Lan y colaboradores.

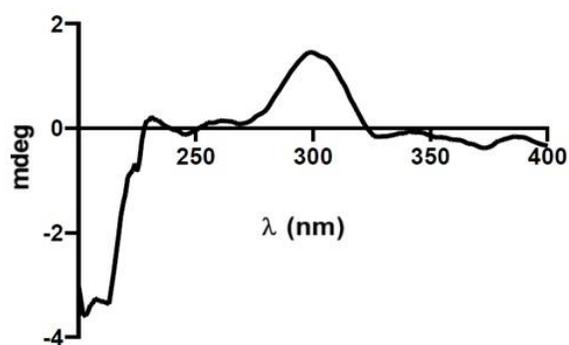


Figura 23. Espectro de DCE de la Pseudaboydina B experimental, 2.

Como se puede observar en las **Figuras 23 y 24**, ambos espectros presentan prácticamente la misma información, mostrando en ambos un efecto Cotton positivo alrededor de 300 nm, así como un negativo alrededor de 212 nm, debido a la coincidencia de estos espectros es posible asignar la misma configuración absoluta (3*R*) al centro asimétrico encontrado en el núcleo de ftálica para los compuestos 1-3. Es relevante destacar que la longitud de onda del efecto Cotton negativo coincide

con la longitud de onda máxima absorbida por los compuestos. En relación con la configuración absoluta del centro asimétrico adicional en los compuestos **3a** y **3b** no se puede determinar por esta técnica debido a que se encuentra separado del grupo cromóforo, por lo que esa determinación escapa a los objetivos del presente trabajo.

6.7 Ensayo de inhibición sobre la enzima utilizando compuestos puros

Una vez establecida la estructura de las moléculas, se evaluó su potencial inhibitorio sobre la actividad fosfatasa de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀. En la **Tabla 8** se muestran los porcentajes de inhibición a una concentración final en pozo de 100 μ M para los productos **1-3**.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición sobre la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ de los metabolitos aislados

Clave del compuesto	% de inhibición
1	43.3
3a/3b	28.2
2	12.6

Ninguno de los resultados anteriores se mostró de manera individual para los compuestos **3a** y **3b**, ya que la separación de esta mezcla escapa a los objetivos del trabajo.

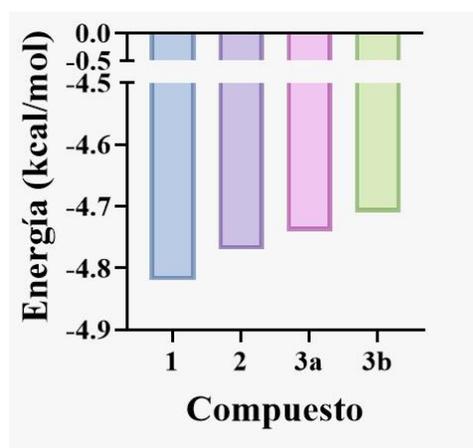
Cabe destacar que los porcentajes de inhibición de estos productos sobre la actividad enzimática de *hPTP1B*₁₋₄₀₀ podrían considerarse bajos, sin embargo, este es el primer reporte de isobenzofuranonas como inhibidores de esta enzima. Esta información amplía el conocimiento de los prototipos estructurales que se pueden explotar para el desarrollo de inhibidores potenciales.

6.8 Acoplamiento molecular

Para estudiar las interacciones que se establecen entre la *hPTP1B*₁₋₄₀₀ y los productos obtenidos del aislamiento, se realizaron estudios *in silico* de acoplamiento molecular utilizando el software Autodock, con el fin de conocer los posibles sitios de unión, así como las energías de unión correspondientes entre cada uno de los cuatro ligantes con la enzima.

Este estudio evidenció que, si bien, no todos los metabolitos tuvieron el mismo porcentaje de inhibición, si interactúan todos ellos en el mismo *pocket*. El cual es un espacio alostérico ubicado a 20 Å del sitio catalítico.

Tomando en cuenta que el porcentaje de inhibición obtenido por el extracto completo del microorganismo seleccionado (64.2%) es mayor que el de los metabolitos evaluados individualmente (43.3, 28.2 y 12.6%), es posible que éste sea resultado de inhibición de más de un metabolito en conjunto interaccionando con un sitio alostérico o sobre varios, de igual forma es posible que no se haya logrado aislar aquel compuesto responsable de la mayor inhibición. Sin embargo, es importante resaltar que en el estudio *in silico* el compuesto **1** obtuvo la mayor afinidad con la enzima, a su vez fue justamente este compuesto el de mayor inhibición, esto se puede observar en la **Figura 25**. También es importante destacar que gracias a este estudio preliminar se puede concluir que las interacciones establecidas entre los productos **3a** y **3b** son distintas, evidenciando la importancia de la configuración en C-4'.



Compuesto	ΔG (kcal/mol)
1	-4.82
2	-4.77
3a/3b	-4.74/-4.71

Figura 24. Energía de unión predicha para los compuestos **1-3** con la *h*PTP1B₁₋₄₀₀

Estudios cristalográficos previos han demostrado que existe una conformación “abierta” y “cerrada” de la PTP1B. En la “abierta” el loop catalítico WPD (Trp¹⁷⁹, Pro¹⁸⁰ and Asp¹⁸¹) se encuentra abierto para posibilitar la entrada del substrato, mientras que en la conformación “cerrada” la cual se observa principalmente en presencia de un ligando activo, el loop-WPD se cierra inhabilitando la unión de la tirosina fosforilada al sitio catalítico (Wiesmann *et al.*, 2004).

Existe un sitio alostérico que se encuentra en la vecindad del loop WPD, ubicado a 20 Å de este bolsillo catalítico (Wiesmann *et al.*, 2004), en la interfaz conjunta de las hélices α -3, α -6 y α -7 (Friedman *et al.*, 2022) por lo que los ligandos con afinidad por este sitio tendrán por tanto la capacidad de cambiar la conformación de la molécula llevando a cabo una posible inhibición. En la **Figura 25** se ilustra el sitio de interacción entre la enzima y los compuestos **1-3**.

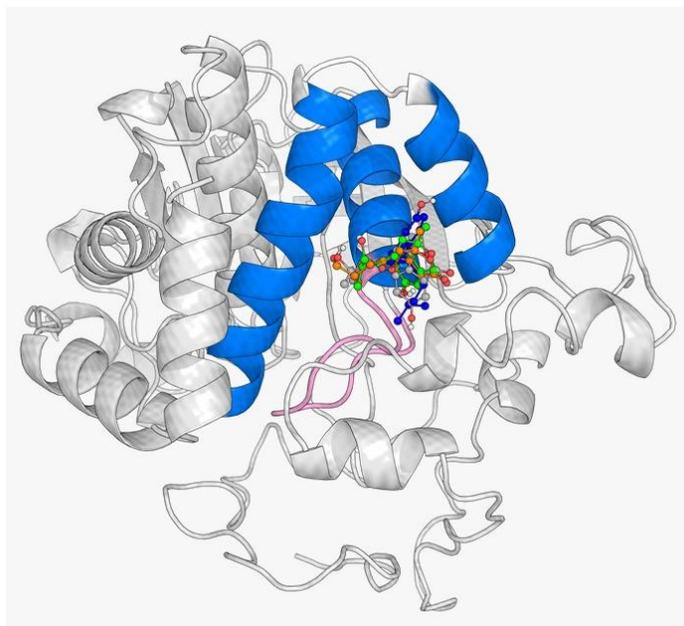


Figura 25. Modelo estructural obtenido del estudio por acoplamiento molecular, **1-3** se muestran en gris (**1**), azul (**2**), naranja (**3a**), verde (**3b**). El loop-WPD se encuentra en color rosado.

El sitio de unión de los productos **1-3**, está conformado por los aminoácidos mostrados en la **Figura 26**, en la cual se resalta el tipo de interacción entre estos residuos y diferentes zonas de los metabolitos, esto como resultado de su estructura electrónica y grupos funcionales.

De acuerdo con la información obtenida en la **Figura 26**, se evidencia la relación que existe entre la similitud estructural de los productos **1-3** y las interacciones que estos guardan con la enzima, concordando con el sitio alostérico mostrado en la **Figura 25**. Los residuos y el tipo de interacción si bien son parecidos, no son los mismos, y estas diferencias se deben principalmente a la variación estructural soportada en el C-4' en cada uno de los casos.

En la **Tabla 9** se encuentran listados los residuos de interacción en cada caso, como se puede observar las interacciones se encuentran justamente en los aminoácidos de las hélices α -3,6 y 7, interacciones responsables del cierre del loop WPD, demostrando así por estudios *in silico* que los productos obtenidos si tienen comportamiento inhibitorio sobre la *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

También es importante resaltar que en el caso de la Pseudoboydina A (**1**), existe una interacción de tipo π - π entre el anillo aromático y la fenilalanina-327 (Phe327). Esta interacción no se establece con el resto de los productos, posiblemente porque la conformación del compuesto se ve

favorecida por efecto de la nube electrónica del hidroxilo en C-4', esto podría explicar su mayor inhibición en comparación con las otras Pseudoboydinas aisladas.

En el caso de los compuestos **1**, **3a** y **3b** existe una interacción entre el hidroxilo encontrado en la cadena alifática con el glutamato-276 (Glu276), lo que podría explicar que exista un mayor porcentaje de inhibición de estos compuestos comparado con **2**.

Por su parte, los compuestos **3a** y **3b** a pesar de guardar una gran similitud estructural al ser una mezcla epimérica, no tienen el mismo comportamiento respecto la energía de unión con el sitio alostérico, esto podría deberse a las interacciones π - σ de la Phe327 con **3b** y la interacción π -azufre entre la cisteína-324 (Cys324) con el anillo aromático de la ftálica en **3a**.

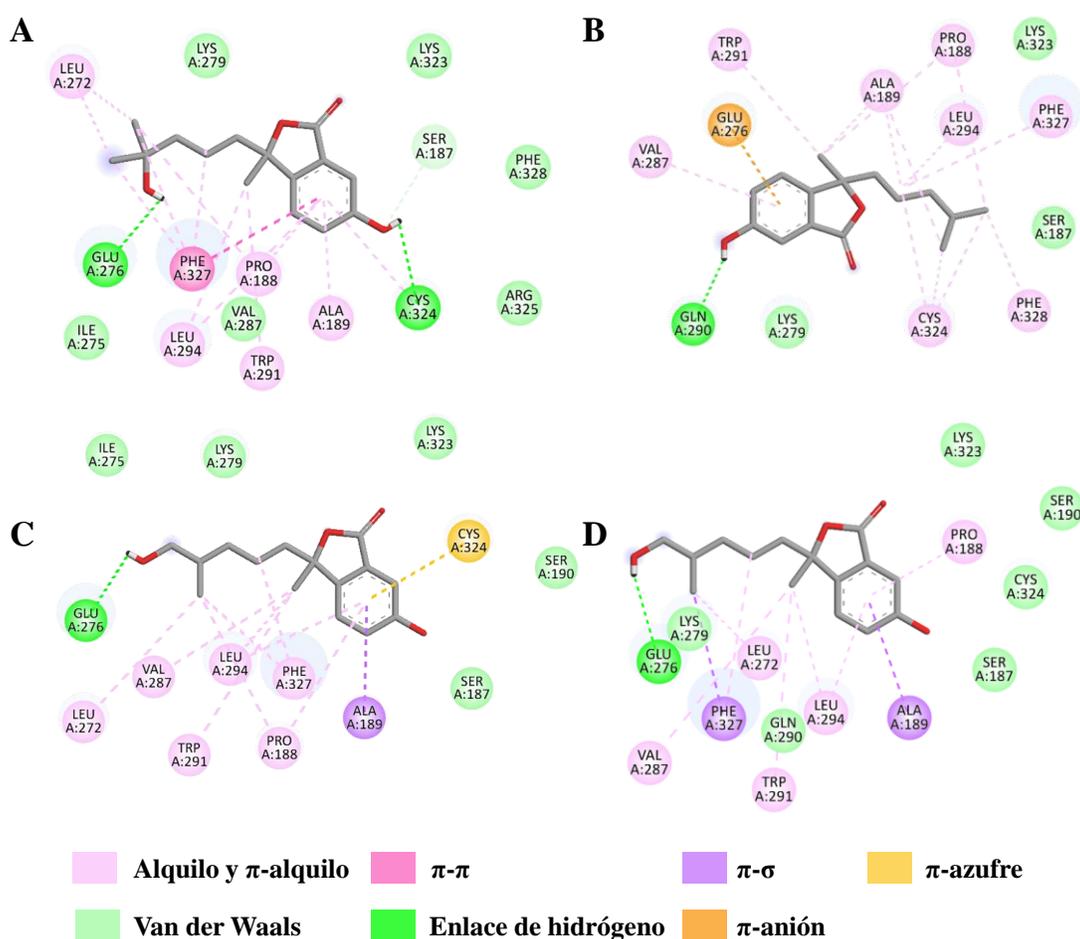


Figura 26. Modelos 2D generados por acoplamiento molecular para los complejos proteína-ligante entre: A) **1**-hPTP1B₁₋₄₀₀, B) **2**-hPTP1B₁₋₄₀₀, C) **3a**-hPTP1B₁₋₄₀₀ y D) **3b**-hPTP1B₁₋₄₀₀. Las esferas en distintos colores representan los aminoácidos involucrados en la interacción, de acuerdo con su naturaleza química.

Tabla 9. Datos obtenidos por acoplamiento molecular de interacción de los productos **1-3** con residuos de la enzima.

1		2		3a		3b	
Residuo (α)	Interacción molecular						
Pro188 (residuo previo a $\alpha 3$)	Alquilo y π -alquilo	Pro188 (residuo previo a $\alpha 3$)	Alquilo y π -alquilo	Pro188 (residuo previo a $\alpha 3$)	Alquilo y π -alquilo	Pro188 (residuo previo a $\alpha 3$)	Alquilo y π -alquilo
Ala189 ($\alpha 3$)	Alquilo y π -alquilo	Ala189 ($\alpha 3$)	Alquilo y π -alquilo	Ala189 ($\alpha 3$)	π - σ	Ala189 ($\alpha 3$)	π - σ
Leu272 ($\alpha 6$)	Alquilo y π -alquilo	Glu276 ($\alpha 6$)	π -anión	Leu272 ($\alpha 6$)	Alquilo y π -alquilo	Leu272 ($\alpha 6$)	Alquilo y π -alquilo
Glu276 ($\alpha 6$)	Puente H	Val287 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Glu276 ($\alpha 6$)	Puente H	Glu276 ($\alpha 6$)	Puente H
Trp291 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Gln290 ($\alpha 7$)	Puente H	Val287 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Val287 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo
Leu294 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Trp291 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Trp291 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Trp291 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo
Cys324	Puente H	Leu294 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Leu294 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo	Leu294 ($\alpha 7$)	Alquilo y π -alquilo
Phe327	π - π	Cys324	Alquilo y π -alquilo	Cys324	π -azufre	Phe327	π - σ
		Phe327	Alquilo y π -alquilo	Phe327	Alquilo y π -alquilo		
		Phe328	Alquilo y π -alquilo				

7. CONCLUSIONES

- Este proyecto demostró que la gran biodiversidad de organismos fúngicos que existen asociados a macroalgas marinas útiles en la obtención de compuestos bioactivos novedosos, algunos de ellos útiles para el desarrollo de fármacos.
- A partir de macroalgas de diferentes géneros recolectadas en la playa Aragón en Santa María Tonameca, Oaxaca se aislaron 52 microorganismos fúngicos.
- Se evaluaron los extractos orgánicos de los 52 microorganismos fúngicos aislados como inhibidores de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ obteniendo en seis de ellos porcentaje de inhibición arriba del 50%.
- El estudio químico de la especie fúngica IQ-1687 permitió el aislamiento de dos ftálicas previamente reportadas las pseudaboydina A (**1**) y B (**2**), también el de dos compuestos nuevos la pseudaboydina C (**3a**) y su epímero en C-4' (**3b**), todos con cierto porcentaje de inhibición sobre la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.
- Se evaluó y reportó por primera vez a las pseudaboydinas A y B contra un blanco biológico.
- Los estudios de acoplamiento molecular evidenciaron que los productos aislados interaccionan en un sitio alostérico previamente reportado de la PTP1B.

8. REFERENCIAS

- Abdel Raouf, G. F., & Mohamed, K. Y. (2018). Chapter 10—Natural Products for the Management of Diabetes. En Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 59, pp. 323-374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00010-4>
- Abdel-Lateff, A., Fisch, K. M., Wright, A. D., & König, G. M. (2003). A New Antioxidant Isobenzofuranone Derivative from the Algicolous Marine Fungus *Epicoccum* sp. *Planta Medica*, *69*, 831-834. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43209>
- Agrawal, N., Dhakrey, P., & Pathak, S. (2023). A comprehensive review on the research progress of PTP1B inhibitors as antidiabetics. *Chemical Biology & Drug Design*, *102*(4), 921-938. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14275>
- Bhattarai, K., Bhattarai, K., Kabir, M. E., Bastola, R., & Baral, B. (2021). Fungal natural products galaxy: Biochemistry and molecular genetics toward blockbuster drugs discovery. En *Advances in Genetics* (Vol. 107, pp. 193-284). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.11.006>
- Bourdeau, A., Dubé, N., & Tremblay, M. L. (2005). Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: The roles of PTP1B and TC-PTP. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(2), 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.02.001>
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2007). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, (Undécima). McGrawHill.
- Cho, H. (2013). Chapter Seventeen—Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Obesity. En G. Litwack (Ed.), *Vitamins & Hormones* (Vol. 91, pp. 405-424). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00017-1>

- Choy, M. S., Li, Y., Machado, L. E. S. F., Kunze, M. B. A., Connors, C. R., Wei, X., Lindorff-Larsen, K., Page, R., & Peti, W. (2017). Conformational Rigidity and Protein Dynamics at Distinct Timescales Regulate PTP1B Activity and Allostery. *Molecular Cell*, 65(4), 644-658.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.014>
- Crean, R. M., Biler, M., van der Kamp, M. W., Hengge, A. C., & Kamerlin, S. C. L. (2021). Loop Dynamics and Enzyme Catalysis in Protein Tyrosine Phosphatases. *Journal of the American Chemical Society*, 143(10), 3830-3845. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c11806>
- Cristina Cortinas. (2011). *Cáncer: Herencia y ambiente* (4.^a ed.). Fondo de Cultura Económica.
- Elvira Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Friedman, A. J., Liechty, E. T., Kramer, L., Sarkar, A., Fox, J. M., & Shirts, M. R. (2022). Allosteric Inhibition of PTP1B by a Nonpolar Terpenoid. *The Journal of Physical Chemistry B*, 126(42), 8427-8438. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c05423>
- García Sáinz, J. A. (2016). *Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular* (4.^a ed.). Fondo de Cultura Económica.
- Hjortness, M. K., Riccardi, L., Hongdusit, A., Ruppe, S., Zhao, M., Kim, E. Y., Zwart, P. H., Sankaran, B., Arthanari, H., Sousa, M. C., De Vivo, M., & Fox, J. M. (2018). Abietane-Type Diterpenoids Inhibit Protein Tyrosine Phosphatases by Stabilizing an Inactive Enzyme Conformation. *Biochemistry*, 57(40), 5886-5896. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00655>

- IDF. (s. f.). *Facts & figures—IDF / International Diabetes Federation*. International Diabetes Federation. Recuperado 4 de diciembre de 2023, de <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>
- INEGI. (s. f.). *INEGI: Sala de prensa, Estadísticas a propósito del Día Mundial de la Diabetes*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. Recuperado 2 de noviembre de 2023, de <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=7746>
- Jiménez-Arreola, B. S., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J. L., & Rivera-Chávez, J. (2020). Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*, *101*, 103893. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>
- Kerru, N., Singh-Pillay, A., Awolade, P., & Singh, P. (2018). Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *152*, 436-488. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.061>
- Martínez Aldino, I. Y., Rivera Chávez, J. A., Universidad, N. A. de M., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2023). *Estudio químico-biológico de ascomicetos para el descubrimiento de moduladores alostéricos de la proteína tirosina fosfatasa 1B (hPTP1B₁₋₄₀₀) e inhibidores del crecimiento bacteriano de cepas intrahospitalarias*.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, *83*(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- OPS/OMS. (s. f.-a). *Diabetes—OPS/OMS / Organización Panamericana de la Salud*. Recuperado 18 de julio de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/diabetes>

- OPS/OMS. (s. f.-b). *Enfermedades no transmisibles—OPS/OMS / Organización Panamericana de la Salud*. Recuperado 19 de julio de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-no-transmisibles>
- Padhi, L., Mohanta, K., & Panda, K. (2013). Endophytic fungi with great promises: A Review. *Journal of Advanced Pharmacy and Research*, 3(3), 152-170.
- Qian, M., Shan, Y., Guan, S., Zhang, H., Wang, S., & Han, W. (2016). Structural Basis of Fullerene Derivatives as Novel Potent Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B: Insight into the Inhibitory Mechanism through Molecular Modeling Studies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(10), 2024-2034. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00482>
- Quezada Suaste, C. D., Rivera Chávez, J. A., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2023). *Diseño y síntesis parcial de azafenalenonas basadas en duclauxina y su actividad frente hPTP1B(1-400)*.
- Sharma, B., Xie, L., Yang, F., Wang, W., Zhou, Q., Xiang, M., Zhou, S., Lv, W., Jia, Y., Pokhrel, L., Shen, J., Xiao, Q., Gao, L., & Deng, W. (2020). Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 112376. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112376>
- Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 13(1), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
- Uchida, I., & Kuriyama, K. (1974). The π - π circular dichroism of $\delta\beta$ -unsaturated γ -lactones. *Tetrahedron Letters*, 15(43), 3761-3764. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)92002-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92002-7)

- Wen-Jian Lan, Wei Liu, Wan-Ling Liang, Zeng Xu, Xiu Le, Jun Xu, Chi-Keung Lam, De-Po Yang, Hou-Jin Li, & Lai-You Wang. (2014). Pseudaboydins A and B: Novel Isobenzofuranone Derivatives from Marine Fungus *Pseudallescheria boydii* Associated with Starfish *Acanthaster planci*. *Marine Drugs*, *12*(7), 4188-4199. <https://doi.org/10.3390/md12074188>
- Wiesmann, C., Barr, K. J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D. A., Shen, W., Fahr, B. J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M., McDowell, R. S., & Hansen, S. K. (2004). Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature Structural & Molecular Biology*, *11*(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nsmb803>
- World Health Organization. (2023). *Diabetes*. World Health Organization. <https://www.who.int/health-topics/diabetes>
- Zhao, B. T., Nguyen, D. H., Le, D. D., Choi, J. S., Min, B. S., & Woo, M. H. (2018). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources. *Archives of Pharmacal Research*, *41*(2), 130-161. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0997-8>

9. ANEXO

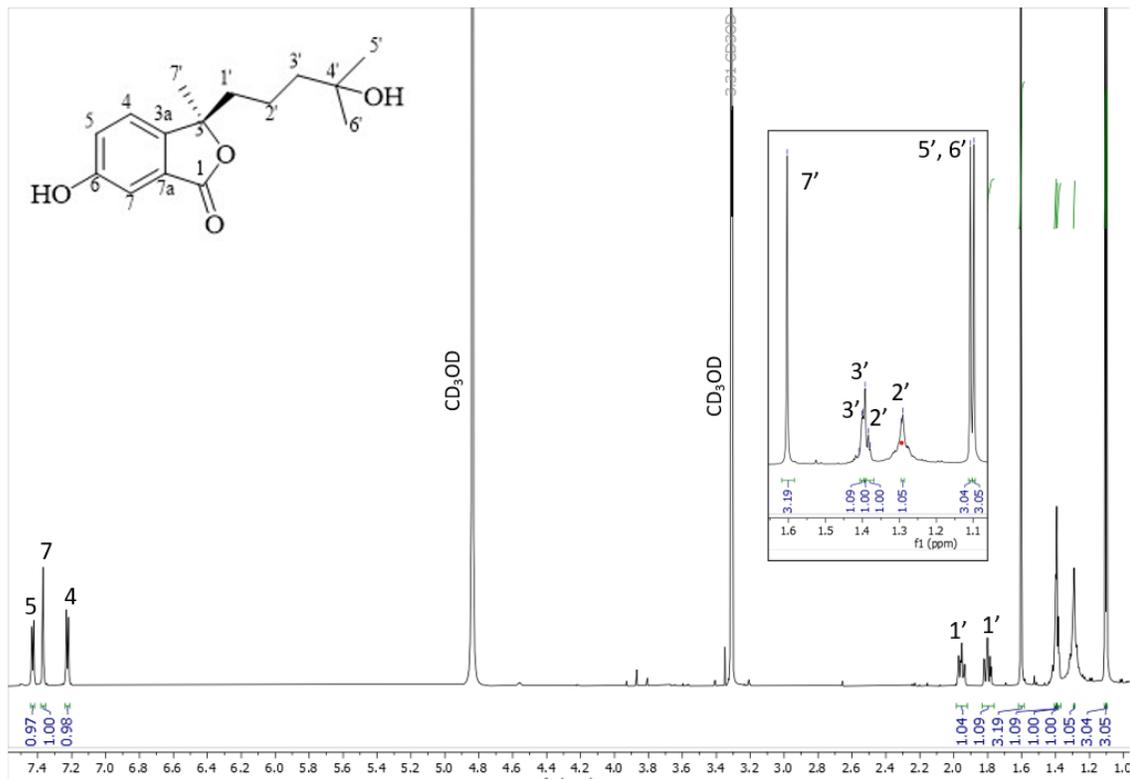


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H (700MHz, CD_3OD) de **1**

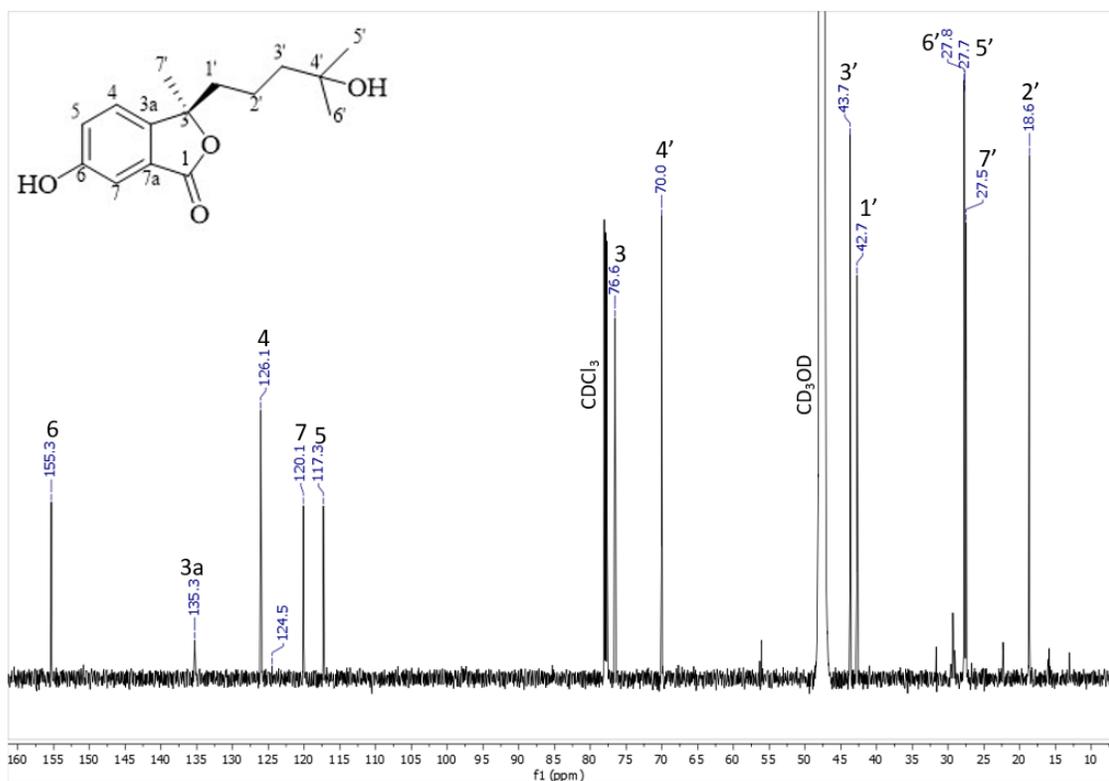


Figura 28. Espectro de RMN-¹³C (175MHz, CD₃OD, contaminado con CDCl₃) de **1**

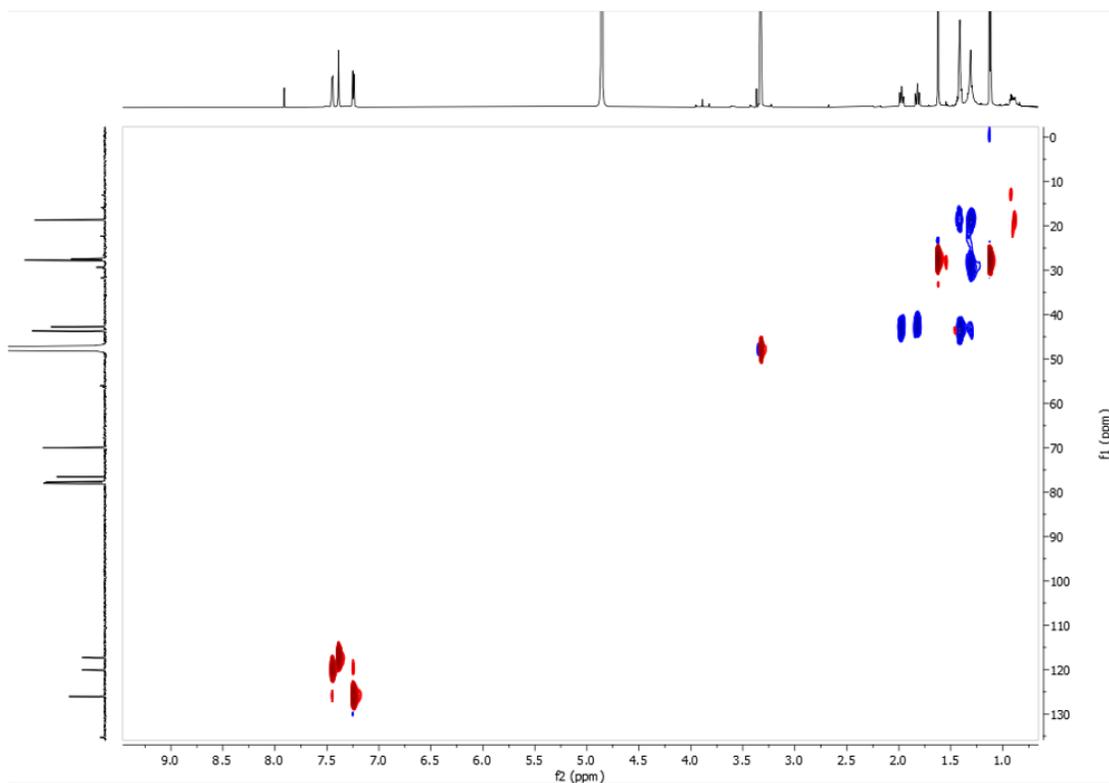


Figura 29. Espectro de RMN bidimensional HSQC de **1**

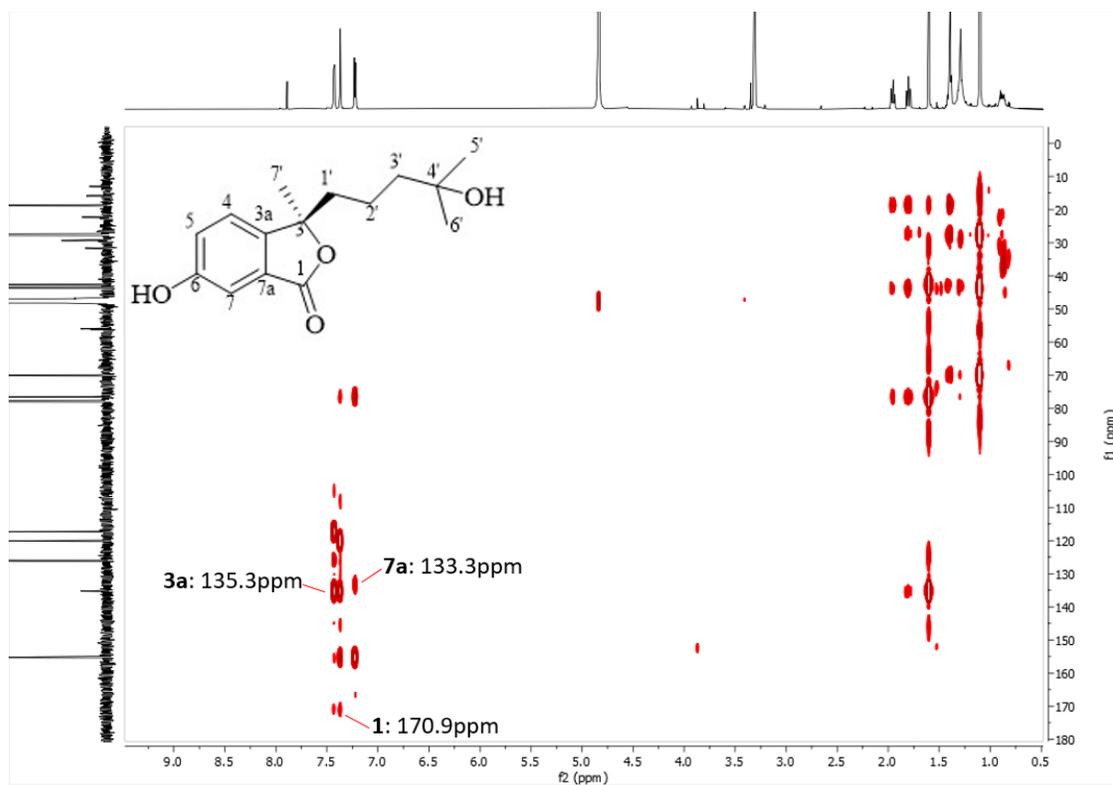


Figura 30. Espectro de RMN bidimensional HMBC de **1**

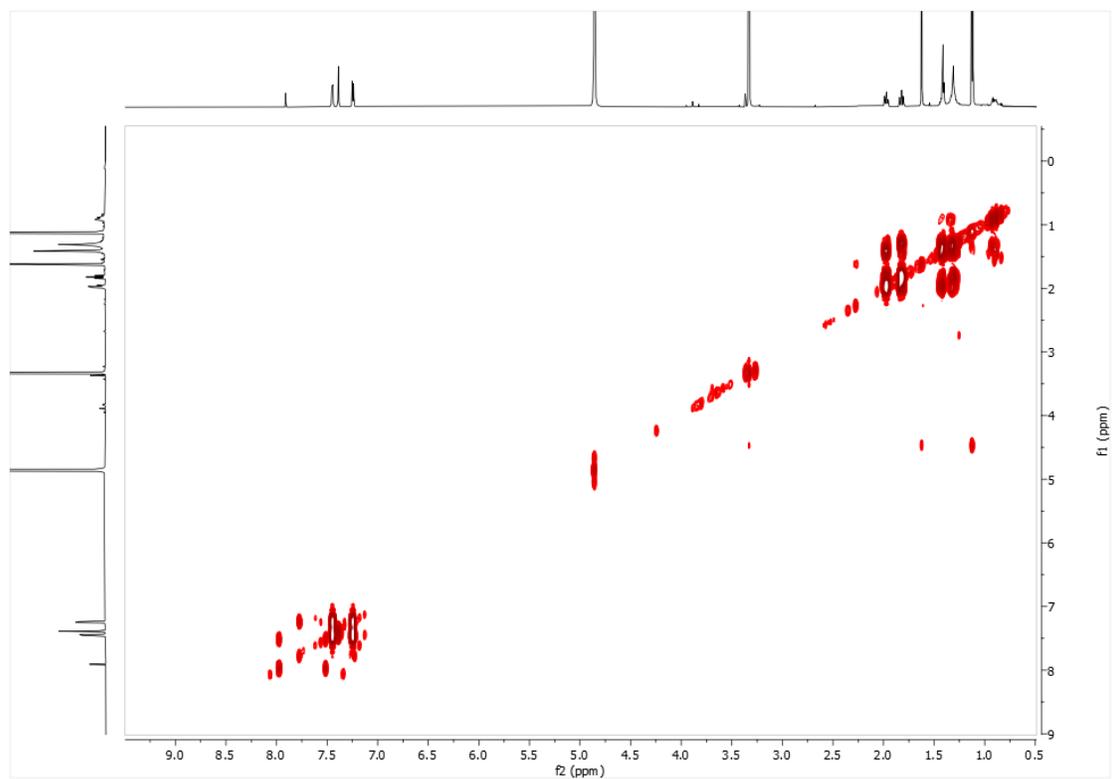


Figura 31. Espectro de RMN bidimensional COSY de **1**

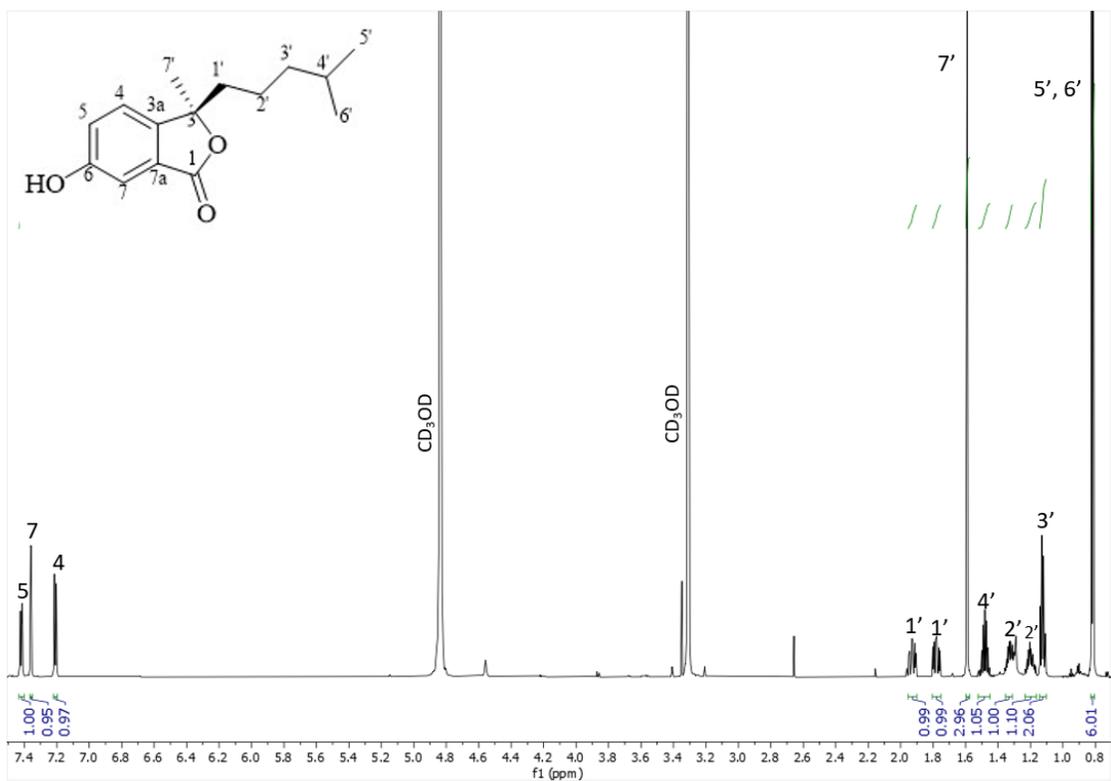


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H (700MHz, CD_3OD) de 2

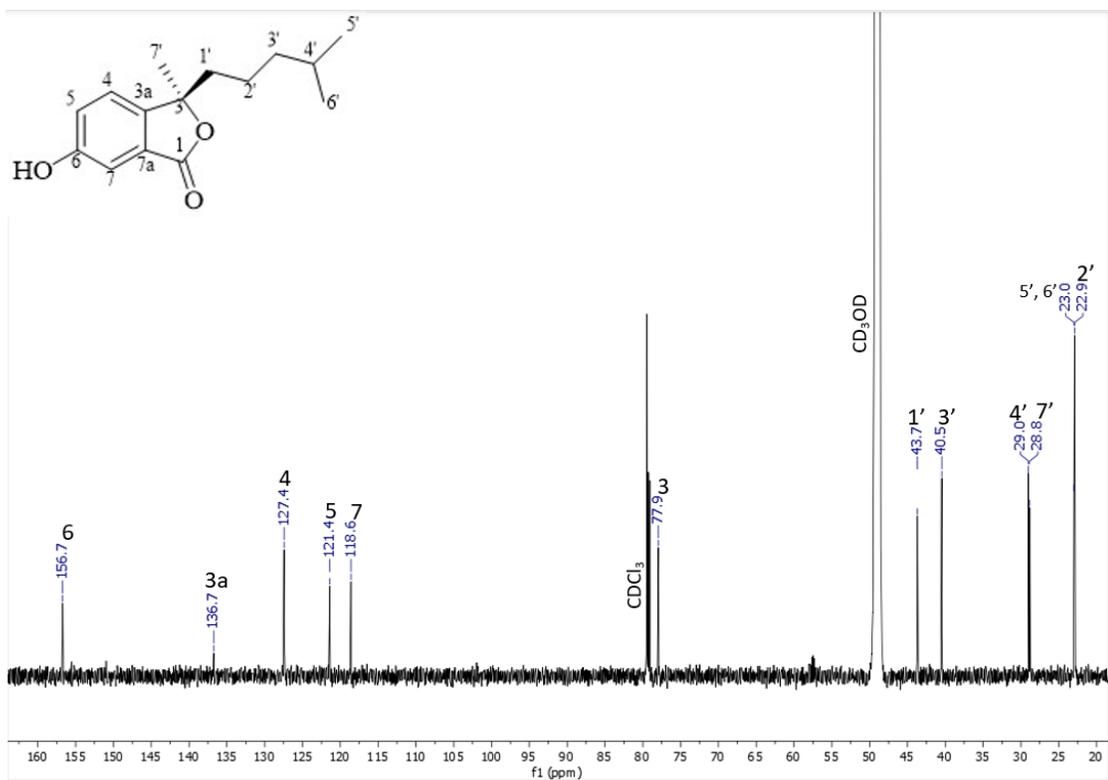


Figura 33. Espectro de RMN- ^{13}C (175MHz, CD_3OD , contaminado de CDCl_3) de 2

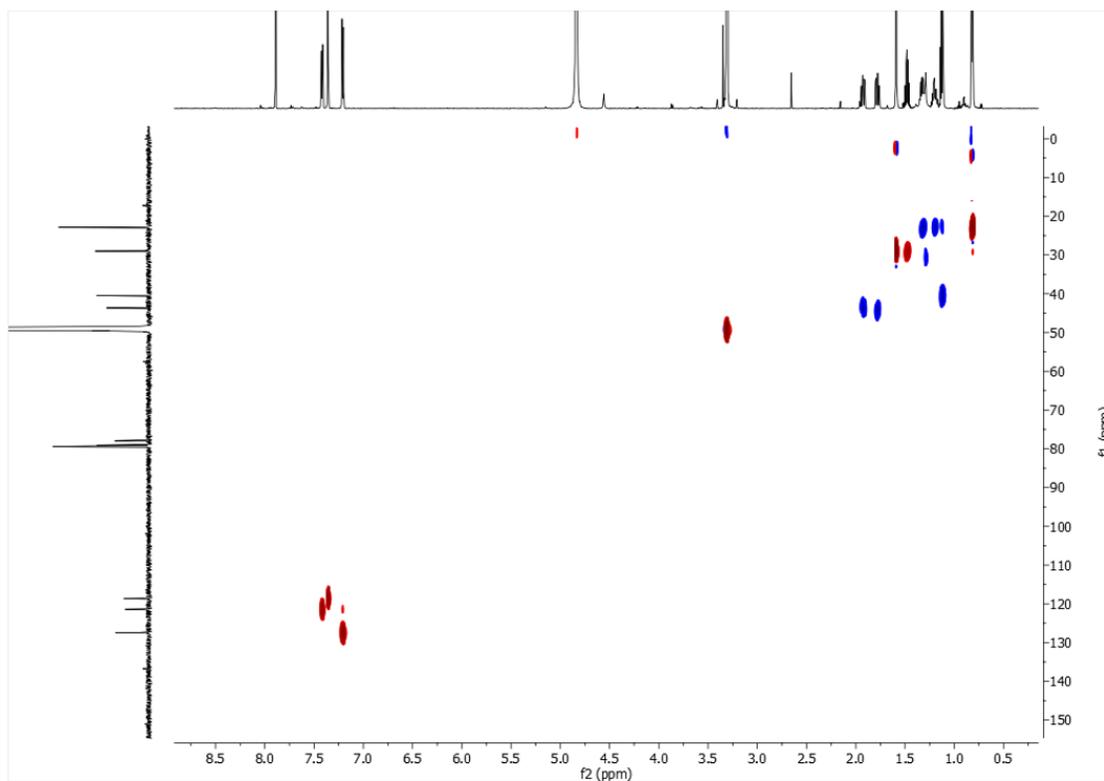


Figura 34. Espectro de RMN bidimensional HSQC de **2**

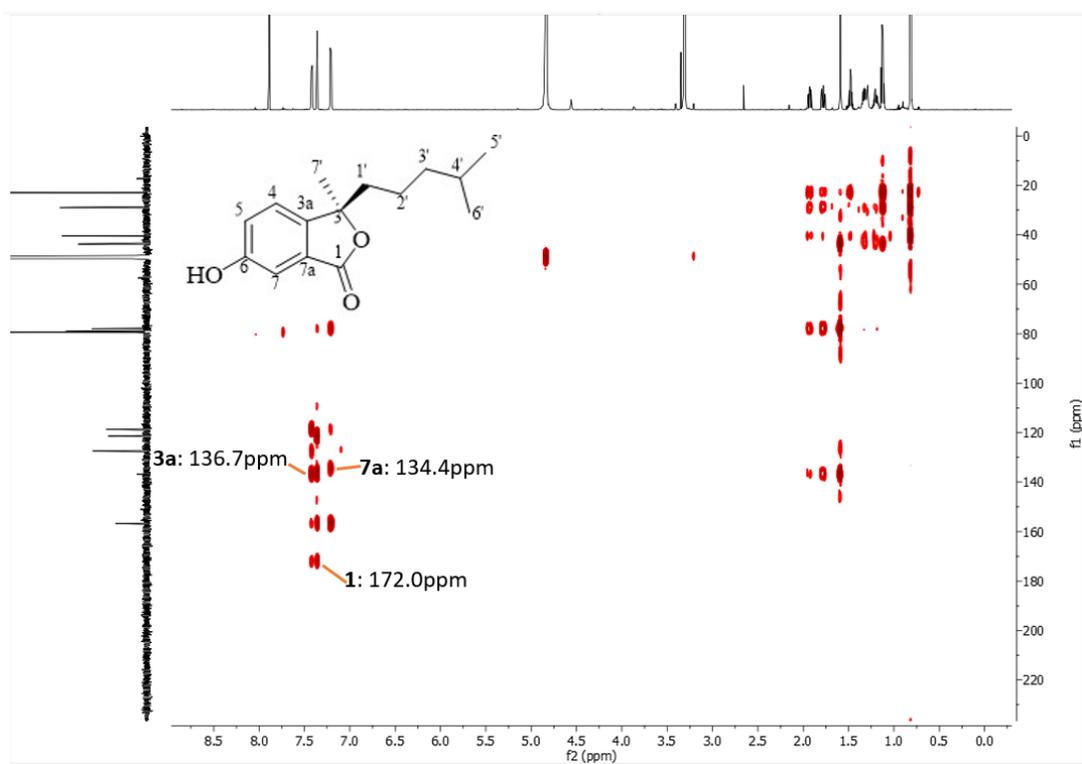


Figura 35. Espectro de RMN bidimensional HMBC de **2**

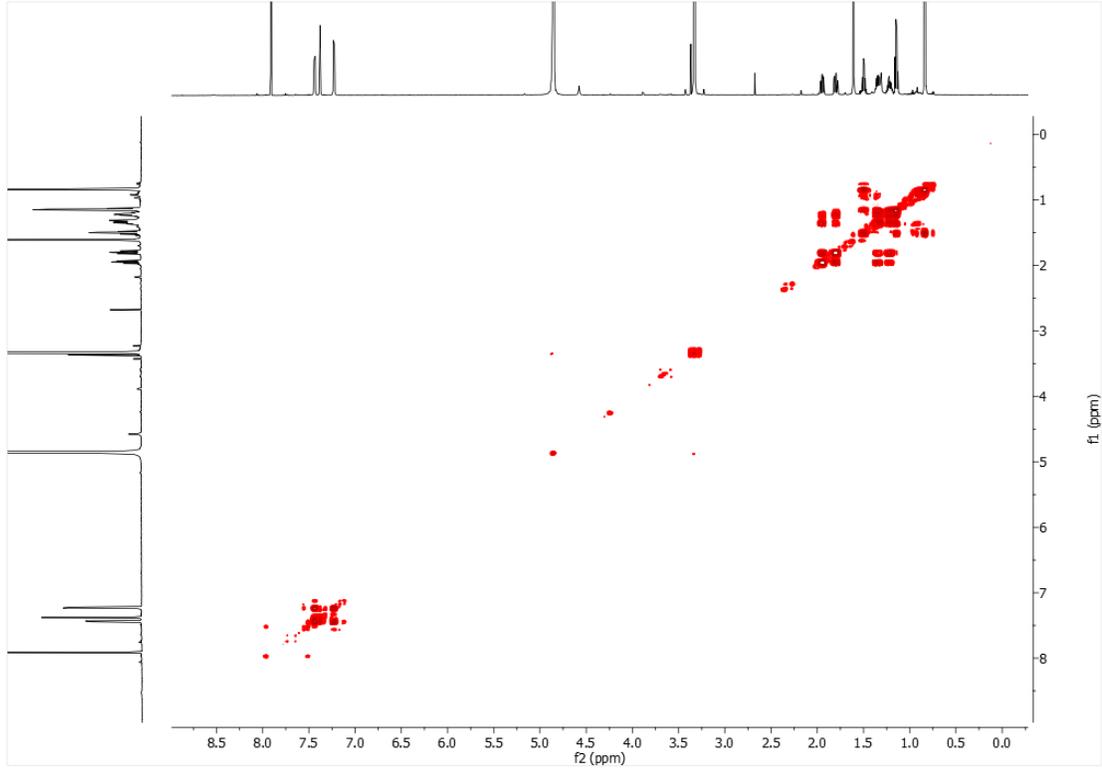


Figura 36. Espectro de RMN bidimensional COSY de 2

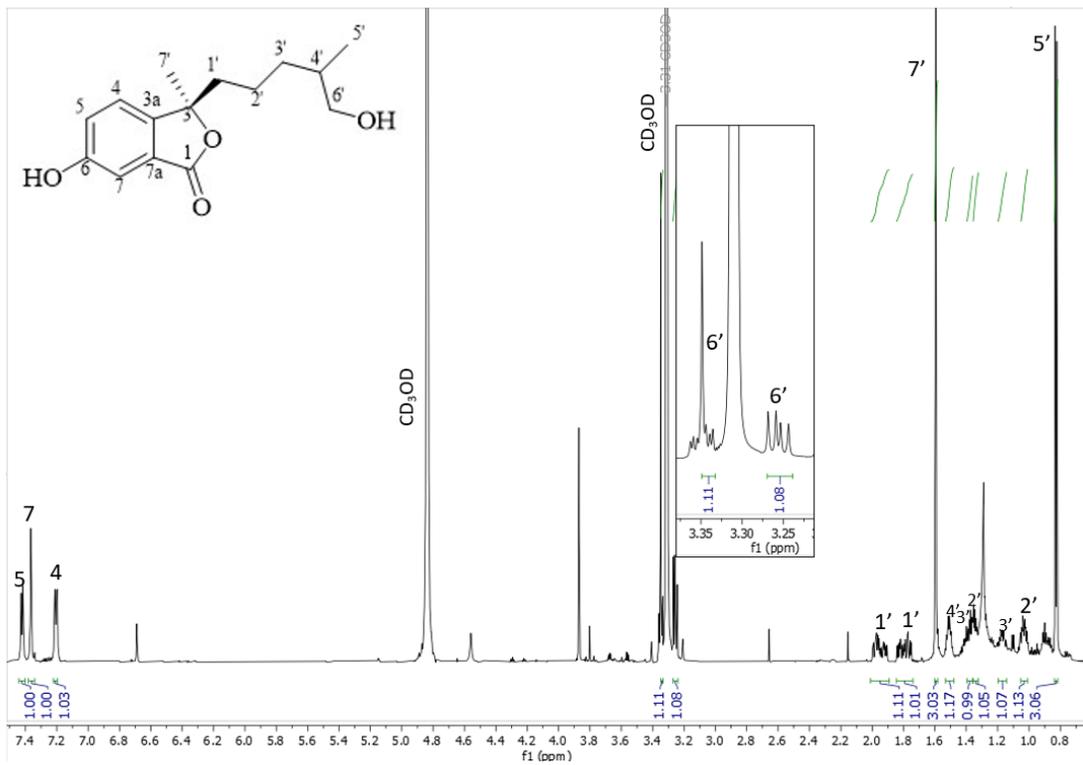


Figura 37. Espectro de RMN-¹H (700MHz, CD₃OD) de 3a/3b

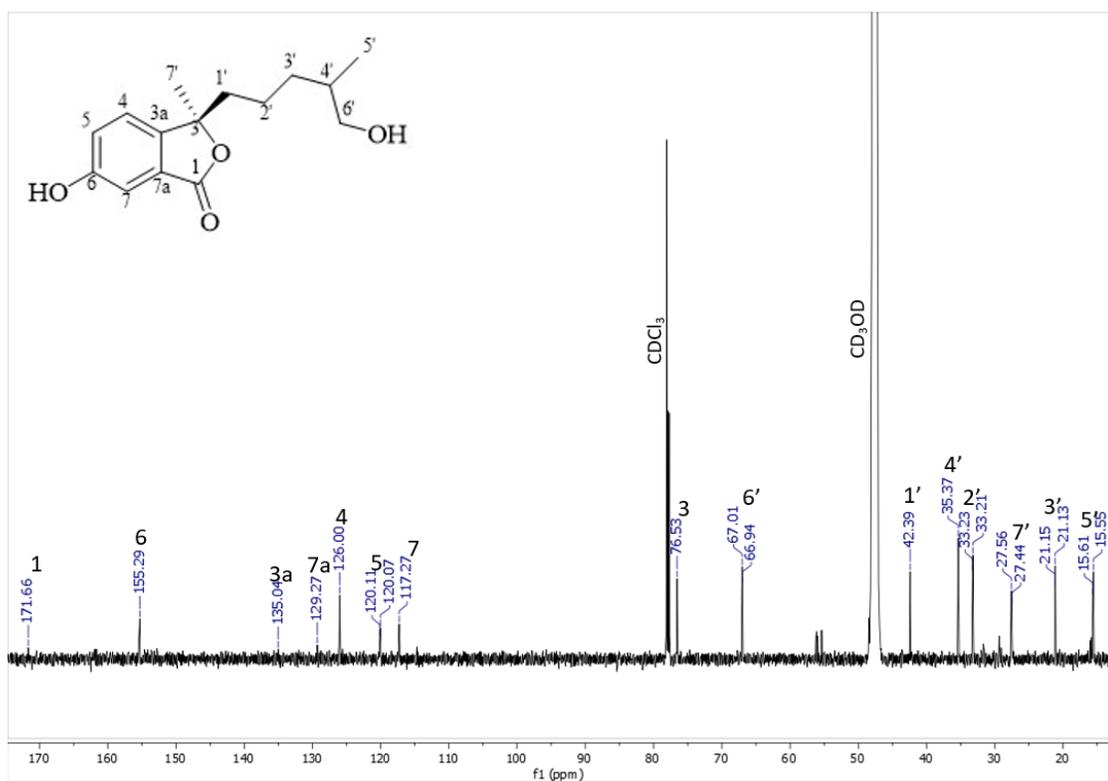


Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C (175MHz, CD_3OD , contaminado con CDCl_3) de **3a/3b**

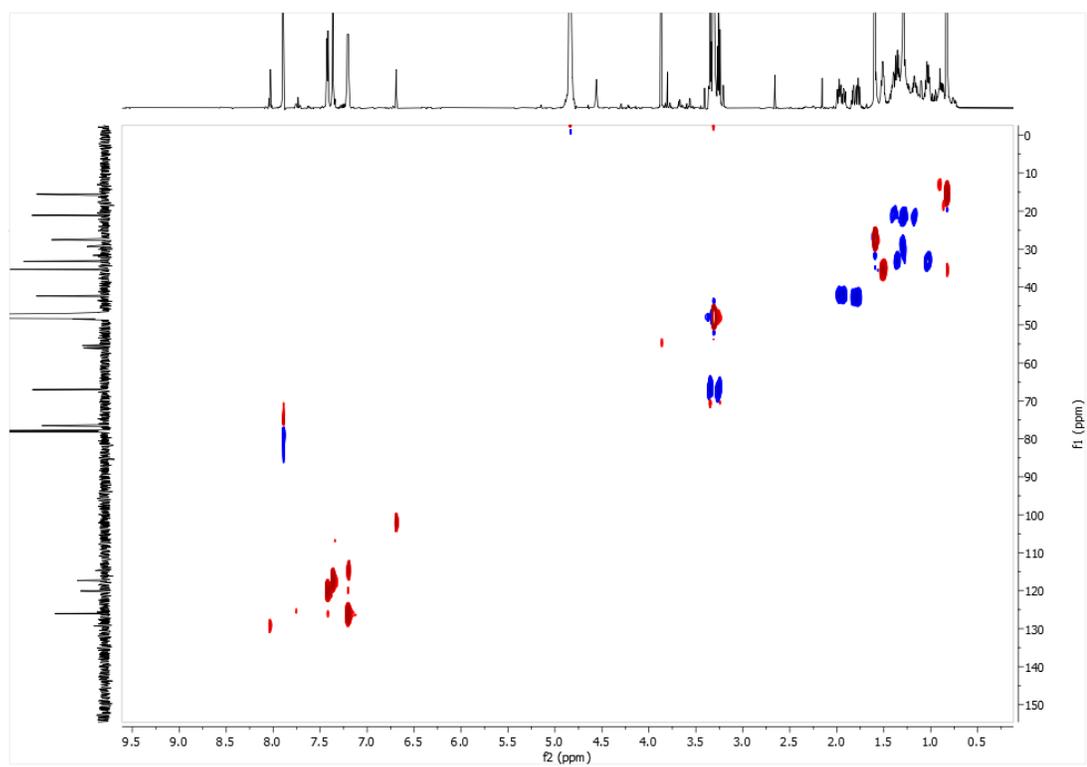


Figura 39. Espectro de RMN bidimensional HSQC de **3a/3b**

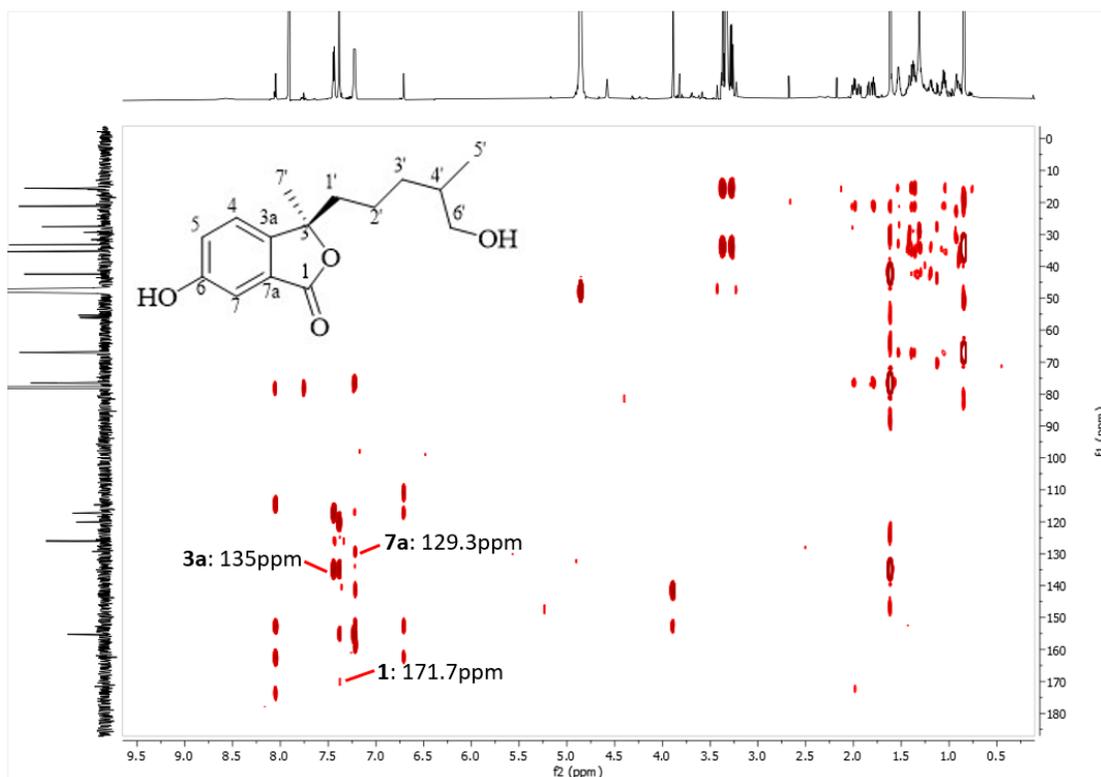


Figura 40. Espectro de RMN bidimensional HMBC de 3a/3b

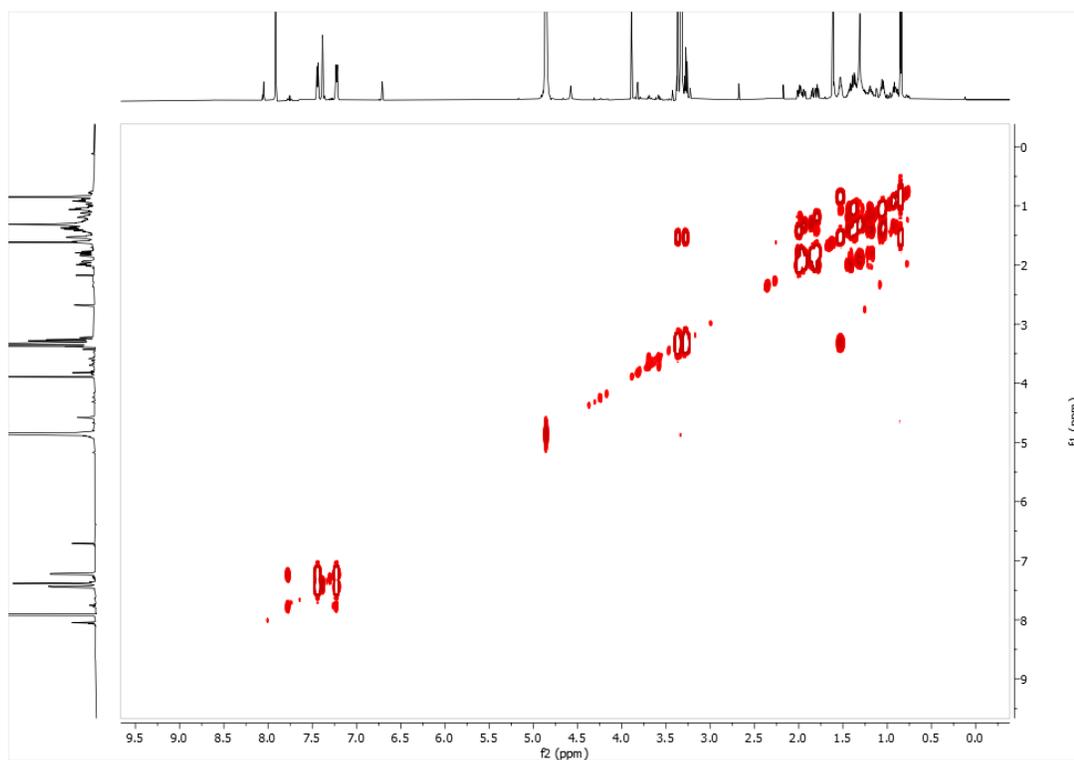


Figura 41. Espectro de RMN bidimensional COSY de 3a/3b