



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Dos nuevos compuestos aislados de *Malbranchea circinata* Sigler & Carmichael como inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FERNANDO CEDILLO TORRES

Ciudad de México

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
SECRETARIO: Dr. Abraham Madariaga Mazón
1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2° SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 124, edificio E, Facultad de Química UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Abraham Madariaga Mazón

SUSTENTANTE:

Fernando Cedillo Torres

FIGURAS	II
TABLAS	III
ESQUEMA	III
ANEXO	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	1
2.1 DIABETES	1
2.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD	1
2.1.2 PANORAMA MUNDIAL Y NACIONAL DE LA DM	4
2.1.3 TRATAMIENTO DE LA DM	6
2.2 GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS	10
2.2.1 INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS EN EL TRATAMIENTO DE LA DM	11
2.3 METABOLITOS AISLADOS DEL GÉNERO <i>MALBRANCHEA</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL	24
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	24
6. PARTE EXPERIMENTAL	25
6.1 MATERIAL FÚNGICO	25
6.2 REGISTRO DE CONSTANTES FÍSICAS	25
6.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	26
6.4 ESTUDIO QUÍMICO DE <i>M. CIRCINATA</i>	26
6.4.1 FERMENTACIÓN	26
6.4.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR	27
6.5 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN <i>M. CIRCINATA</i>	28
6.5.1 AISLAMIENTO DE LA 1,4,8-TRIHIDROXI-3-METIL-5-(3-METILBUT-2-EN-1-IL)-9H-XANTEN-9-ONA	28
6.5.2 AISLAMIENTO DE LA 2-((4,5-DIHIDROXI-7-METIL-9,10-DIOXO-9,10-DIHIROANTRACEN-2-IL)OXI)-5-(HIDROXIMETIL)TETRAHIDROFURAN-3,4-DIIL DIACETATO	29
6.6 EVALUACIONES BIOLÓGICAS	30
6.6.1 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POTENCIAL INHIBITORIO DEL EO Y COMPUESTOS PUROS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS DE INTESTINO DELGADO DE RATA	30

6.6.2 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POTENCIAL INHIBITORIO DEL EO Y COMPUESTOS PUROS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1 ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPECIE <i>MALBRANCHEA CIRCINATA</i>	35
7.1.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA XANTONA PRENILADA (59)	37
7.1.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ANTRAQUINONA GLICOSILADA (60)	46
7.2 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS	57
7.2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS COMPUESTOS 59 Y 60 AISLADOS, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS DE INTESTINO DELGADO DE RATA	58
7.2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS COMPUESTOS 59 Y 60 AISLADOS, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .	59
8. CONCLUSIONES	63
9. PERSPECTIVAS	64
10. BIBLIOGRAFÍA	65
11. ANEXO	70

Figuras

FIGURA 1. PRODUCCIÓN Y ACCIÓN DE LA INSULINA. (ATLAS DE LA DIABETES, IDF,2013).	2
FIGURA 2. COMPLICACIONES MÁS COMUNES EN PACIENTES CON DM2.	3
FIGURA 3. DIABETES EN EL MUNDO (FID, 2015).	4
FIGURA 4. MORTALIDAD PROPORCIONAL EN MÉXICO (% DEL TOTAL DE MUERTES, TODAS LAS EDADES) MODIFICADO. (DIABETES: PERFILES POR PAÍSES, OMS 2016).	5
FIGURA 5. <i>MALBRANCHEA CIRCINATA</i> CULTIVADA EN AGAR PAPA – DEXTROSA (30 DÍAS).	25
FIGURA 6. ESPECTRO RMN- ¹ H DEL COMPUESTO 59.	39
FIGURA 7. ESPECTRO RMN- ¹³ C DEL COMPUESTO 59.	40
FIGURA 8. CORRELACIONES EN HMBC Y COSY OBSERVADAS PARA EL GRUPO ISOPRENILO DE 59.	41
FIGURA 9. ESPECTRO HMBC DEL COMPUESTO 59.	43
FIGURA 10. ESPECTRO COSY DEL COMPUESTO 59.	44
FIGURA 11. CORRELACIONES HMBC Y COSY SELECTAS DEL ANILLO B Y C DEL COMPUESTO 59.	45
FIGURA 12. CORRELACIONES HMBC SELECTAS DEL ANILLO A Y B DEL COMPUESTO 59.	46
FIGURA 13. ESPECTRO RMN- 1H DEL COMPUESTO 60.	48
FIGURA 14. ESPECTRO RMN-13C DEL COMPUESTO 60.	49
FIGURA 15. ESTRUCTURA DEL RESIDUO DE AZÚCAR DE 60.	51
FIGURA 16. ESPECTRO HMBC DEL COMPUESTO 60.	52
FIGURA 17. ESPECTRO COSY DEL COMPUESTO 60.	53
FIGURA 18. ESPECTRO COSY, CORRELACIONES DEL RESIDUO DE AZÚCAR.	54
FIGURA 19. ESPECTRO NOESY DEL COMPUESTO 60.	55
FIGURA 20. CORRELACIONES ANILLO A-C-1' DEL COMPUESTO 60.	56
FIGURA 21. CORRELACIONES HMBC DEL ANILLO C Y B DEL COMPUESTO 60.	57
FIGURA 22. REACCIÓN ENZIMÁTICA LLEVADA A CABO EN EL EXPERIMENTO DE INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS.	57
FIGURA 23. CURVA DE INHIBICIÓN DE 59 SOBRE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS DE INTESTINO DELGADO DE RATA.	58

FIGURA 24. CURVA DE INHIBICIÓN DE 60 SOBRE ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS DE INTESTINO DELGADO DE RATA.	59
FIGURA 25. CURVA DE INHIBICIÓN DE (59) SOBRE ENZIMA A-GLUCOSIDASA DE LEVADURA.	60
FIGURA 26. CURVA DE INHIBICIÓN DE (60) SOBRE ENZIMA A-GLUCOSIDASA DE LEVADURA.	61

Tablas

TABLA 1. PREVALENCIA DE DM ¹ Y FACTORES DE RIESGO ² EN POBLACIÓN MEXICANA (OMS 2016).	6
TABLA 2. FÁRMACOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA DM.	8
TABLA 3. INHIBIDORES SELECTOS DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS AISLADOS A PARTIR DE MICROORGANISMOS.	12
TABLA 4. MEDIOS DE CULTIVO.	27
TABLA 5. ENSAYO INHIBICIÓN ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS (INTESTINO DELGADO RATA) DE 59	31
TABLA 6. ENSAYO INHIBICIÓN ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS (INTESTINO DELGADO DE RATA) DE 60	31
TABLA 7. ENSAYO INHIBICIÓN ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS (LEVADURA) DE 59	32
TABLA 8. ENSAYO INHIBICIÓN ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS (LEVADURA) DE 60	33
TABLA 9. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ORGÁNICO OBTENIDO CON DOS MEDIOS DE CULTIVO.	35
TABLA 10. SISTEMA DE ELUCIÓN DEL FRACCIONAMIENTO POR CCA PARA EL EO DE <i>M. CIRCINATA</i>	36
TABLA 11. RENDIMIENTO DE FRACCIONES PRIMARIAS.	36
TABLA 12. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN- ¹ H Y RMN- ¹³ C PARA 59 (CDCl ₃ , ¹ H A 400 MHz Y ¹³ C A 100 MHz).	38
TABLA 13. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN- ¹ H Y RMN- ¹³ C PARA 60 (CDCl ₃ , ¹ H A 400 MHz Y ¹³ C A 100 MHz).	47
TABLA 14. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS (RATA).	58
TABLA 15. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LAS ENZIMAS A-GLUCOSIDASAS (LEVADURA).	59

Esquema

ESQUEMA 1. PREPARACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL EO DE <i>M. CIRCINATA</i>	28
--	----

Anexo

FIGURA A 1. ESPECTRO IR DEL COMPUESTO 59	69
FIGURA A 2. ESPECTRO IR DEL COMPUESTO 60	70

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
A	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Reflectancia Total Atenuada
CaM	Calmodulina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CI50	Concentración inhibitoria 50
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlación homonuclear
d	doblete
DART	Ionización por análisis directo en tiempo real
dd	doble de dobles
dddt	
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EO	Extracto orgánico
FID	Federación Internacional de Diabetes
FTIR	Infrarrojo de transformada de Fourier
Fx	Fracción
g	gramos
GH	Glicosidasas hidrolasas
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HR-ESI-MS	Espectrometría de masas de alta resolución modalidad de ionización electrospray
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
IR	Espectroscopia de infrarrojo
J	Constante de coplamiento
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
nm	Nanómetro
NOESY	Correlación homonuclear a múltiples enlaces

$^{\circ}\text{C}$	<i>Grados Celsius</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<i>OPS</i>	<i>Organización Panamericana de la Salud</i>
<i>p-NPG</i>	<i>p-nitrofenil α-D-glucopiranosido</i>
<i>p.f</i>	<i>Punto de fusión</i>
<i>PDA</i>	<i>Caldo papa – dextrosa</i>
<i>PDE</i>	<i>Fosfodiesterasa 1</i>
<i>ppm</i>	<i>Partes por millón</i>
<i>psi</i>	<i>Libra por pulgada cuadrada</i>
<i>q</i>	<i>cuarteto</i>
<i>qd</i>	<i>cuarteto dobleteado</i>
<i>RMN</i>	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>
<i>s</i>	<i>Singulete</i>
<i>U/mL</i>	<i>Unidad sobre mililitro</i>
<i>UV</i>	<i>Ultravioleta</i>
<i>αGHY</i>	<i>Alfa glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>
δC	<i>Desplazamiento químico de carbono</i>
δH	<i>Desplazamiento químico de protón</i>
λ_{max}	<i>Longitud de onda máxima</i>
μg	<i>Microgramos</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μM	<i>Concentración Micromolar</i>

1. Introducción

Los productos naturales, y en especial aquellos obtenidos de microorganismos, han jugado un papel muy importante en el desarrollo de fármacos y moléculas líderes debido a que producen una gran diversidad de metabolitos secundarios biodinámicos. Dentro de estos metabolitos, se destacan aquellos derivados de especies fúngicas, los cuáles han despertado un considerable interés por su amplia diversidad estructural y la enorme variedad de actividades biológicas. Así, tomando en cuenta que hoy en día han sido reportadas más de 100,000 especies diferentes de ascomicetos, éstos representan una fuente invaluable a partir de la cual se puede generar conocimiento y/o herramientas de investigación útiles en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra enfermedades que sean un problema grave de salud.

En este contexto, la diabetes mellitus (DM) representa uno de los principales problemas de salud pública en México y el mundo. La DM es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o el organismo no utiliza eficazmente la que produce, lo que ocasiona severos daños en órganos y sistemas, lo cual disminuye considerablemente la calidad de vida.

A pesar de que actualmente se cuenta con diversos tratamientos farmacológicos como sulfonilureas, tiazolidinedionas e inhibidores de α -glucosidasas, la creciente expansión de la enfermedad exige el descubrimiento de nuevas moléculas más eficientes y con menos efectos adversos; siendo los productos naturales la fuente principal de búsqueda para el cumplimiento de este objetivo.

Por lo anterior, el presente proyecto describe el estudio químico de una especie fúngica con el objetivo de contribuir a la investigación y descubrimiento de nuevos agentes inhibidores de las enzimas alfa glucosidasas de origen natural.

2. Antecedentes

2.1 Diabetes

2.1.1 Aspectos generales de la enfermedad

La DM ha afectado la vida de las personas desde hace más de mil años. Los egipcios fueron los primeros en reconocer esta enfermedad plasmándola en escritos que datan de 1550 a. C. De acuerdo a *The National Medical Journal of India*, los antiguos indios (alrededor de 600 a. C.) también conocían dicha condición, ya que ellos hacían pruebas para la llamada “enfermedad de la orina dulce” determinando si las hormigas eran atraídas hacia la orina del paciente. Los antiguos médicos griegos denominaron la enfermedad como diabetes, que quiere decir “pasar a través de”, debido al desorden fisiológico principal que ellos observaron: el paso excesivo de orina a través del sistema urinario del paciente (Zuñiga-Guajardo et al 2003).

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico complejo, caracterizado por la presencia de concentraciones anormalmente elevadas de glucosa en sangre, que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce (Organización Mundial de la Salud, OMS). Adicionalmente, se asocia con la deficiencia de las incretinas en el intestino, aumento de la reabsorción de glucosa en el riñón, aumento de la secreción de glucagón de las células α -pancreáticas, y una acelerada lipólisis en los adipocitos (**Figura 1**; El-Kaissi & Sherbeeni 2011).

La falta o ineficacia de la insulina provoca que la glucosa permanezca en el torrente sanguíneo, lo que trae como consecuencia la hiperglucemia alterando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. De esta manera, con el paso del tiempo se ve disminuida considerablemente tanto la expectativa como la calidad de vida.

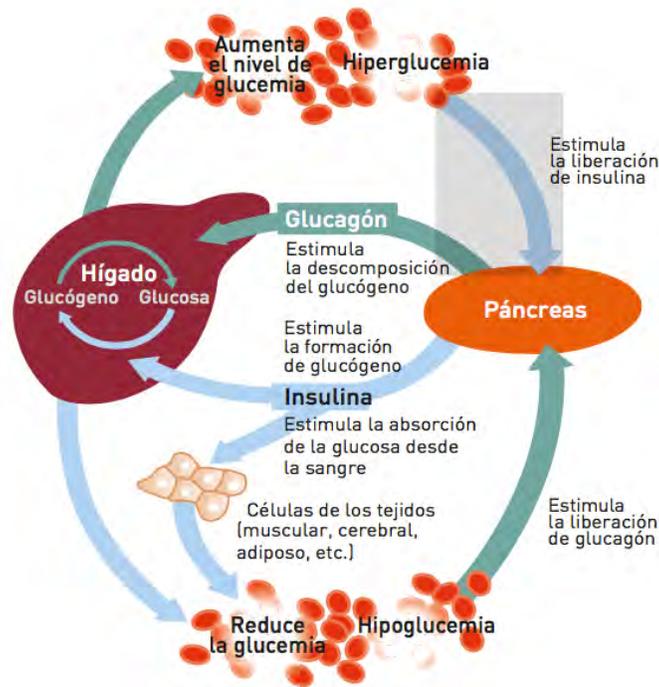


Figura 1. Producción y acción de la insulina. (Atlas de la diabetes, IDF,2013).

Existen diversos tipos de diabetes, y dependiendo de su etiología clínica se pueden clasificar como:

- *Diabetes mellitus Tipo 1 (DM1)*. Conocida anteriormente como diabetes juvenil o insulino-dependiente; se caracteriza por una reacción autoinmune donde el cuerpo destruye las células beta pancreáticas; responsables de producir dicha hormona. La DM1 puede afectar a personas de cualquier edad, pero ocurre generalmente en niños o adultos jóvenes. Su tratamiento se basa en la administración de insulina. Dentro de los síntomas se encuentran: poliuria, polifagia, polidipsia, cansancio extremo, pérdida de peso, visión borrosa.

- *Diabetes mellitus Tipo 2 (DM2)*. Conocida como no-insulino-dependiente, es la más frecuente, el cuerpo puede producir insulina, pero no es suficiente o bien el cuerpo no puede responder a sus efectos, dando lugar a una acumulación de glucosa en sangre. Dentro de los factores de riesgo se encuentran: la obesidad, mala alimentación, inactividad física, edad avanza, antecedentes familiares. Los síntomas pueden ser similares a los de la DM1, pero menos intensos, lo que provoca que el diagnóstico de personas con DM2, no se realice a tiempo, por lo

tanto, las personas no son conscientes de su condición durante mucho tiempo hasta presentar complicaciones características de la enfermedad. En contraste con la DM1, no se requiere la administración de insulina, ya que se cuenta con medicamentos orales que, en conjunto con una dieta saludable, el aumento de la actividad física y mantenimiento de un peso corporal normal, ayudan a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Otros tipos de diabetes menos comunes son la *diabetes monogénica*, resultado de la mutación de un gen, causando defectos genéticos en la función de las células beta pancreáticas o en la acción de la insulina, por ejemplo la tipo MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young); y la *diabetes secundaria*, causada por la complicación de trastornos hormonales (e.g. enfermedad de Cushing) o enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística) o inducidas farmacológica o químicamente, como ocurre en el tratamiento del VIH/sida, o bien tras trasplante de órganos (IDF, 2015).

Las personas que padecen DM2 tienen mayor riesgo de desarrollar complicaciones que disminuyen la calidad de vida, entre las más comunes se encuentran la enfermedad cerebrovascular, retinopatía, enfermedad coronaria cardíaca, nefropatía, neuropatía, enfermedad vascular periférica y pie diabético (Figura 2).

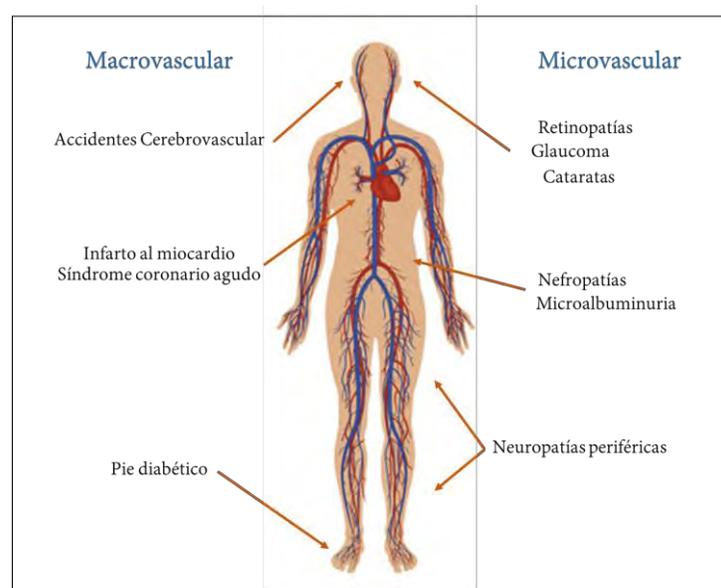


Figura 2. Complicaciones más comunes en pacientes con DM2.

2.1.2 Panorama mundial y nacional de la DM

La diabetes mellitus es un grave problema de salud a nivel mundial, tal es el caso que es considerada actualmente como epidemia. Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980.

La prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7% al 8,5% en la población adulta. La misma OMS prevé que la DM se convierta en el año 2030 en la séptima causa mundial de muerte.

La Federación Internacional de Diabetes (FID,2015), estimó el número de personas con diabetes en todo el mundo por cada región en 2015, y realizó una proyección hacia el año 2040; como se representa en la **Figura 3**.

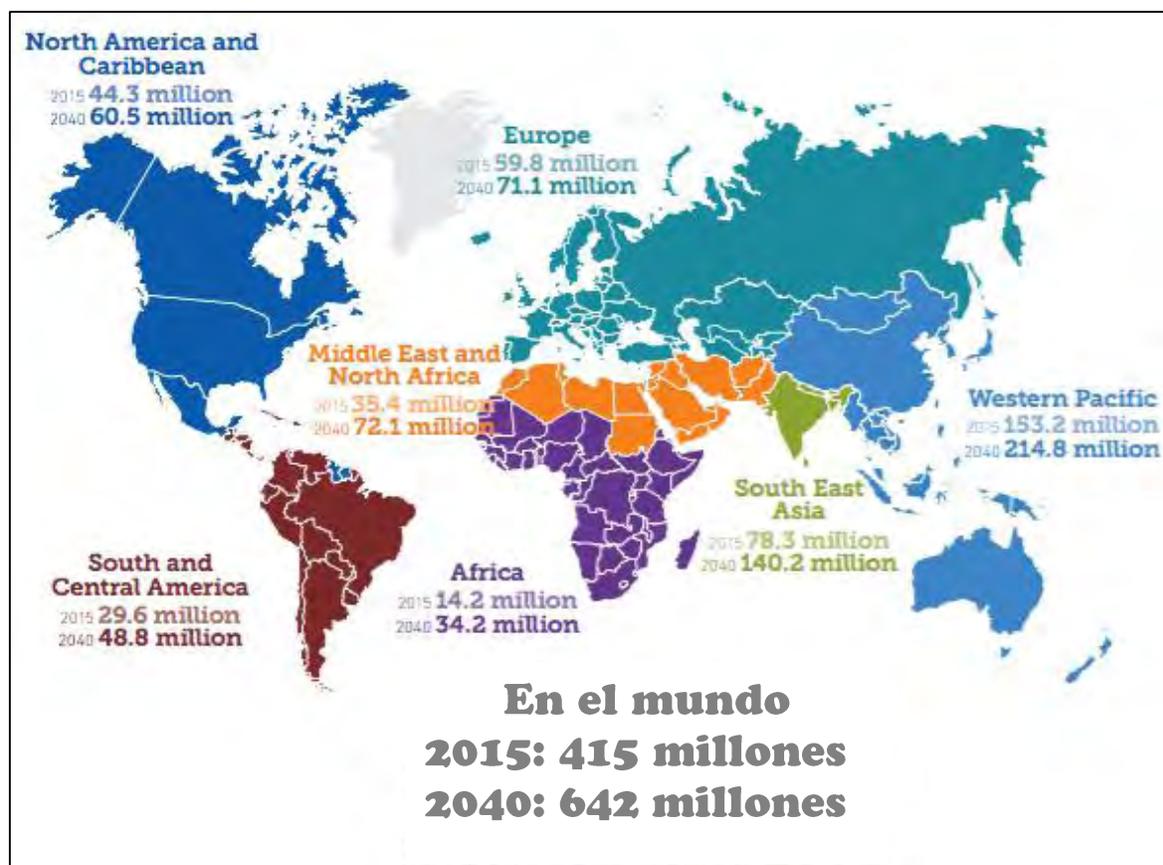


Figura 3. Diabetes en el mundo (FID, 2015).

La situación en México no es más favorable, pues la DM se encuentra entre las primeras tres causas de muerte a nivel nacional (**Figura 4**). Así, según datos del reporte *Diabetes: Perfiles por países* (OMS, 2016), el número de muertes por diabetes para mujeres y hombres entre 30-69 años de edad es de 20,000 y 23,100 respectivamente, mientras que para 70 años o más es de 24,300 para mujeres y 17,600 para hombres. Por otro lado, el número de muertes atribuibles a la hiperglucemia es de 25,400 mujeres y 28,100 hombres entre 30-69 años.

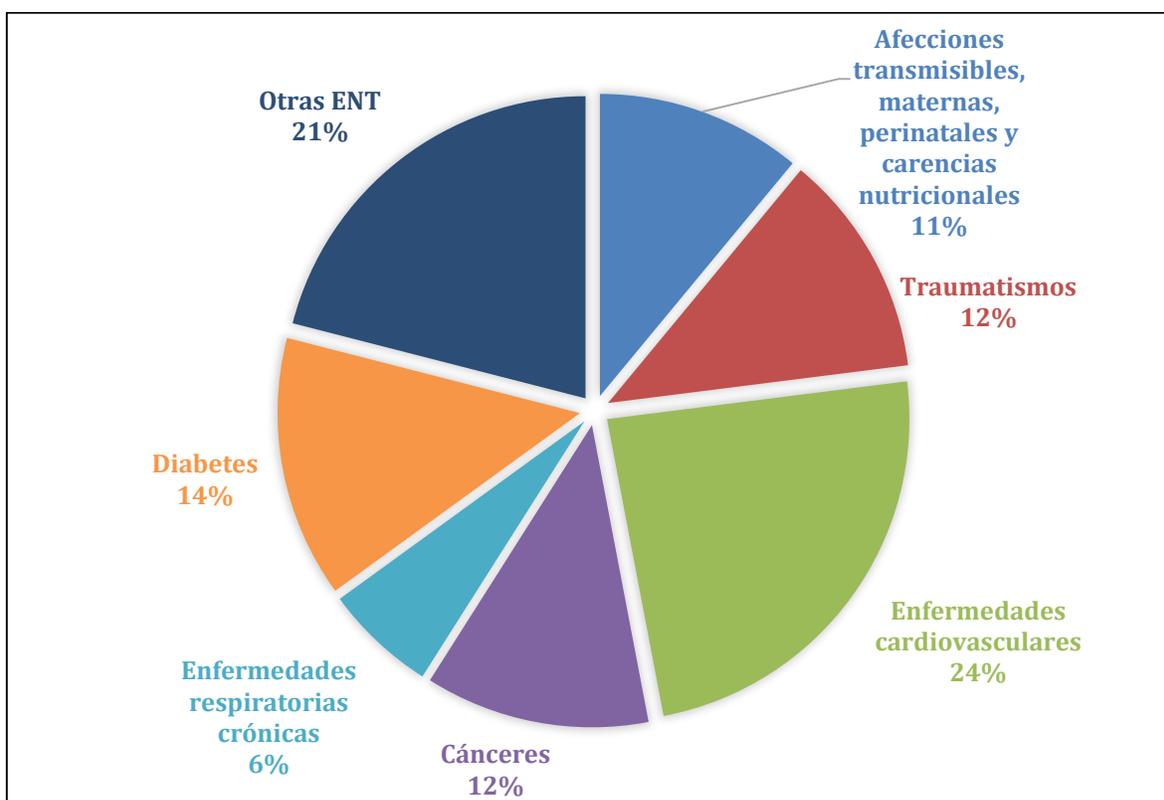


Figura 4. Mortalidad proporcional en México (% del total de muertes, todas las edades) modificado. (Diabetes: Perfiles por países, OMS 2016).

Uno de los principales factores de riesgo para que la enfermedad se desarrolle es el sobrepeso y la obesidad, afecciones que van en aumento en todo el mundo; según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año fallecen al menos 2.8 millones de personas adultas por alguna de estas causas, y representan 44% de la carga de diabetes, 23% de las cardiopatías isquémicas, y

entre 7% y 41% de algún cáncer atribuible a la misma (OMS, 2012). Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS estiman que en Belice, México y Estados Unidos, aproximadamente 30% de su población tiene obesidad (OMS, 2012).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, la población masculina de 20 años y más presenta mayor población con sobrepeso que obesidad, afecciones que pueden ser detonantes de diabetes lo que se confirma aun en 2016 con el reporte *Diabetes: Perfiles por países en 2016* (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de DM¹ y factores de riesgo² en población mexicana (OMS 2016).

Población total	Hombres	Mujeres	Total
127 000 000			
Diabetes¹	9.7%	11.0%	10.4%
Sobrepeso²	61.6%	65.0%	63.4%
Obesidad²	22.1%	32.7%	27.6%
Inactividad física²	18.9%	31.2%	25.4%

En México, las principales complicaciones en la población de 20 años y más hospitalizada con diabetes tipo II, son de tipo renal (24.2%), circulatorias periféricas (17.3%) y múltiples (7.0%). Es comprensible que las complicaciones renales sean las más frecuentes, debido a que los daños renales graves requieren de constante hemodiálisis que ante cualquier descuido o mal manejo, las agravan y hace necesario que el paciente sea atendido con tratamientos más agresivos (Federación Mexicana de Diabetes, FMD, 2013).

2.1.3 Tratamiento de la DM

Además de las recomendaciones por la OMS y FMD para prevenir la DM, que se enfocan en cambiar el estilo de vida basándose en una buena alimentación y actividad física, existen diversos tratamientos farmacológicos para tratar esta enfermedad. La estrategia general de dichos fármacos se basa principalmente en

reducir la hiperglucemia, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas y mejorar la calidad de vida, todo esto con fines de reducir la mortalidad o complicaciones que se pueden derivar de este padecimiento.

En individuos normoglucémicos, la homeostasis de glucosa se mantiene dentro de un estrecho rango gracias a la acción de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagón; por hormonas reguladoras, como la amilina y las denominadas incretinas (secreción intestinal de insulina); el péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) (Israili 2011). El tratamiento de la DM y en específico la tipo 2, se ha centrado en el aumento de los niveles de insulina ya sea por la administración constante de la hormona, por medio de agentes orales que promuevan la secreción de insulina o que aumenten su sensibilidad en los tejidos (músculo esquelético, tejido adiposo) reduciendo la tasa de absorción de carbohidratos desde el tracto gastrointestinal (Israili 2011).

Entre los hipoglucemiantes orales se encuentran a los inhibidores de las α -glucosidasas, las incretinas, las biguanidas, los secretagogos de insulina, los sensibilizadores y los inhibidores de las lipasas intestinales. En la **Tabla 2** se ejemplifican algunos fármacos selectos empleados en la terapia de la DM.

De manera general, el tratamiento para las personas que padecen DM se enfoca principalmente en: i) aumentar los niveles de insulina, ya sea por administración directa o a través de la ingesta de fármacos que promuevan su secreción; ii) aumentar la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina, y iii) reducir la tasa de absorción de glucosa del intestino a torrente sanguíneo (Israili 2011). Dentro del grupo de fármacos que reducen la absorción intestinal de glucosa se encuentran los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

Tabla 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la DM.

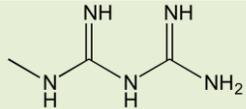
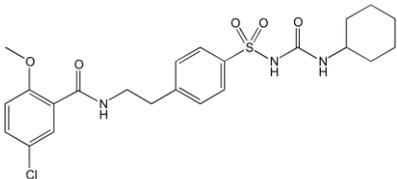
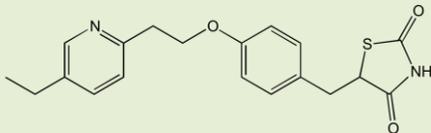
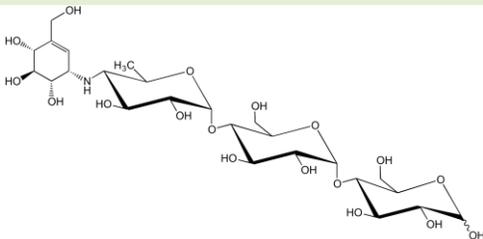
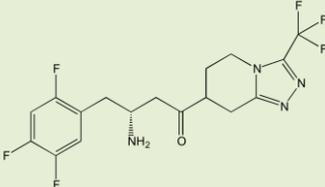
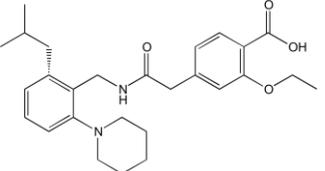
Medicamento	Tipo	Mecanismo de acción
 Metformina (1)	Biguanida	Aumenta la sensibilidad a la insulina e inhibe la gluconeogénesis además de mejora la sensibilidad a GLP-1.
 Glibenclamida (2)	Sulfonilurea	Aumenta secreción de insulina endógena.
 Pioglitazona (3)	Tiazolidinedionas	Incrementan la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético, tejido adiposo y en menor medida en el hígado, lo hacen aumentando la captación de glucosa.
 Acarbosa (4)	Inhibidores enzimas α -glucosidasas	Evitan o disminuye la absorción de glucosa en el intestino delgado.

Tabla 2. (continuación). Fármacos empleados en el tratamiento de la DM.

Medicamento	Tipo	Mecanismo de acción
<p>Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln- Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser- Asn-Asn-Phe-Gly-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Thr- Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂</p> <p>Priamlintida (5)</p>	Análogo de amilina	Promueve la absorción de glucosa por el retraso del vaciamiento gástrico, provoca saciedad e inhibe la secreción inapropiada de glucagón.
<p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr- Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met- Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu- Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn- Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala- Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p> <p>Exenatida (6)</p>	Análogo de incretina	Agonista de GLP-1, controla la liberación de insulina y glucagón por el páncreas en respuesta a los alimentos.
 <p>Sitagliptina (7)</p>	Inhibidor del DPP4	Al bloquear la enzima DPP-4 se incrementa la cantidad de GLP-1 en sangre lo que provoca menos acumulación de glucosa.
 <p>Repaglidina (8)</p>	Meglitidina	Estimulan la fase de secreción tard.a de la insulina, aumentando su secreción y aportan mejor control de la glucemia.

2.2 Generalidades de las enzimas α -glucosidasas

Las α -glucosidasas pertenecen al grupo de enzimas glicosidasas hidrolasas (GH, *Enzyme Classification* EC 3.2.1.20), un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos de polisacáridos, oligosacáridos o glicoconjugados para producir glucosa y monosacáridos relacionados (Nakai et al. 2005).

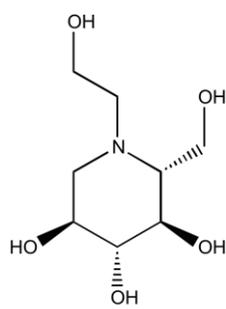
De acuerdo a su origen (animal, vegetal o microbiano), las α -glucosidasas muestran diferentes tipos de reconocimiento por sustratos, por lo que se dividen en tres tipos: I, II, y III. Las de Tipo I, pertenecen a la familia GH-13 y se obtienen de bacterias, *Saccharomyces cerevisiae* e insectos, hidrolizan sustratos heterogéneos como la sacarosa y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (sustrato sintético), en donde reconocen la estructura α -glucosil de la molécula del sustrato. Las de tipo II y III pertenecen a la familia GH 31; las de tipo II se encuentran en especies fúngicas e hidrolizan sustratos homogéneos (e.g. maltosa) lo que significa que muestran reconocimiento por la unidad maltósido del sustrato. Por último, las de tipo III se obtienen a partir de plantas y animales; mostrando una alta actividad contra sustratos homogéneos y poliméricos (Nakai et al. 2005).

Las α -glucosidasas se ubican en el intestino delgado y son responsables de catalizar selectivamente la hidrólisis de carbohidratos complejos (oligosacáridos, disacáridos, polisacáridos) para la liberación de monómeros de azúcares en forma de hemiacetal (Borges de Melo et al. 2006). La liberación de α -D-glucosa en el intestino es de suma importancia para el metabolismo de carbohidratos, además que la actividad de las enzimas juega un papel muy importante en diversos procesos bioquímicos como el metabolismo lisosomal de glicoconjugados, el procesamiento de glicoproteínas y la biosíntesis de glicolípidos y glicoproteínas (Moorthy et al. 2012).

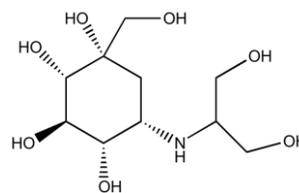
En el tratamiento de la DM2, los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas son empleados para impedir el paso final en el proceso digestivo de los carbohidratos, ya que retrasan la absorción de glucosa postprandial disminuyendo su cantidad en sangre (Israili 2011).

2.2.1 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas en el tratamiento de la DM

Dentro de los fármacos que actualmente se emplean en la terapéutica como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas se encuentran la acarbosa (**Tabla 2, 4**) aislada de la especie *Actinoplanes*; el miglitol (**9**), un análogo del producto natural 1-deoxinojirimicina aislada de *Morus alba L.* y la voglibosa (**10**), derivado de un compuesto de origen natural conocido como valiolumina. Desafortunadamente estos fármacos producen efectos secundarios no deseables como: flatulencias, diarrea, dolor y distensión abdominal.



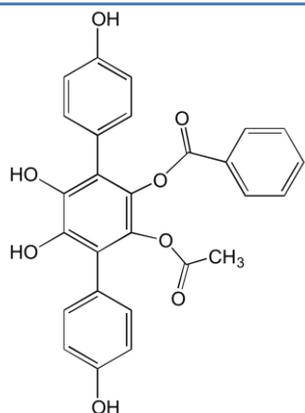
(9)



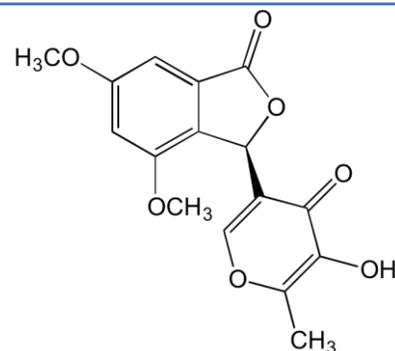
(10)

La creciente necesidad de encontrar nuevos y más potentes compuestos con menos efectos secundarios ha promovido la búsqueda para la identificación de inhibidores de α -glucosidasas a partir de fuentes naturales. En este sentido, los productos naturales, debido a su gran diversidad estructural, siguen siendo una excelente fuente para la búsqueda de tales inhibidores, lo que ha motivado la exploración biológica de compuestos activos tanto en plantas como en microorganismos (Kumar et al. 2011).

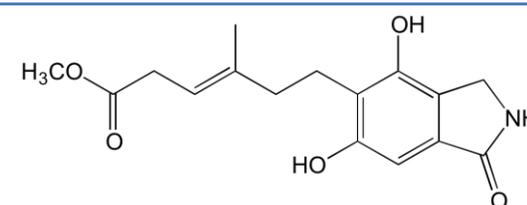
En el siguiente cuadro se muestran inhibidores de α -glucosidasas aislados a partir de microorganismos, especialmente aquellos aislados de especies fúngicas.

Tabla 3. Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas aislados a partir de microorganismos.

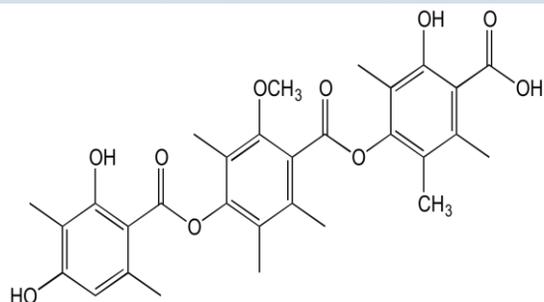
Concrescenina A (11)
Hydnellum concrescens
 $Cl_{50} = 0.99 \mu\text{M}$
 (Wang et al. 2014)



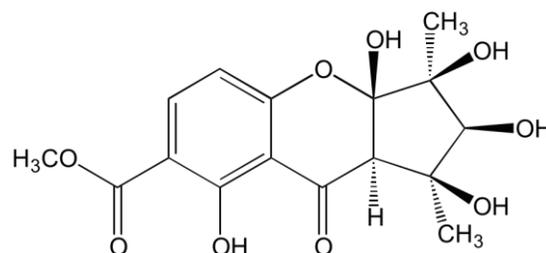
2''-epihidroxiidihydrovermistatina (12)
Penicillium sp. HN29-3B1
 $Cl_{50} = 8 \mu\text{M}$
 (Liu et al. 2014)



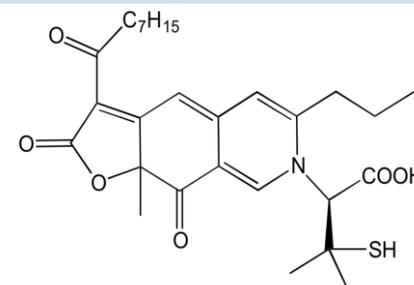
Erinacerina H (13)
Hericium erinaceus
 $Cl_{50} = 10.3 \mu\text{M}$
 (Wang et al. 2015)



Tielavina K (14)
 Hongo endófito de *Hintonia latiflora*
 $Cl_{50} = 15.8 \mu\text{M}$
 (Rivera-Chávez et al. 2013)

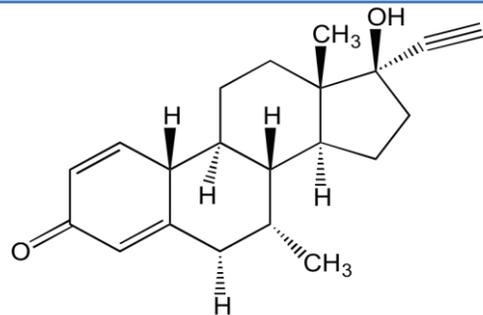


Criptosporioptido B (15)
Cryptosporiopsis sp.
 $Cl_{50} = 41.42 \mu\text{M}$
 (Tousif et al. 2014)

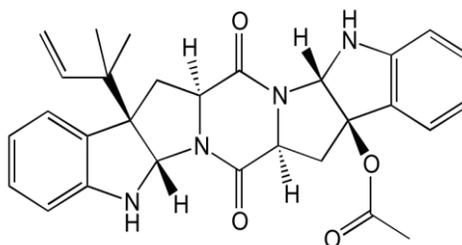


(16)
Monascus sp.
 $Cl_{50} = 50.9 \mu\text{M}$
 (Kim et al. 2007)

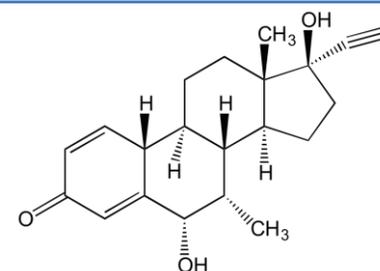
Tabla 3. (continuación). Inhibidores selectos de las enzimas α -glucosidasas aislados a partir de microorganismos.



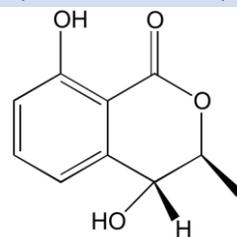
$\Delta^{1,4}$ -Tibolina (**17**)
Cunninghamella elegans
 $CI_{50} = 227 \mu\text{M}$
 (Choudhary et al. 2010)



Amauromina B(**18**)
Aspergillus terreus
 $CI_{50} = 300 \mu\text{M}$
 (WG et al. 2015)



15 α -Hidroxi- Δ^4 -Tibolina (**19**)
Gibberella fujikuroi
 $CI_{50} = 340$
 (Choudhary et al. 2010)

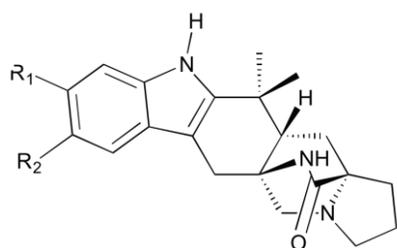


(**20**)
Xylaria feejeensis
 $CI_{50} = 549 \mu\text{M}$
 (Rivera-Chávez et al. 2015)

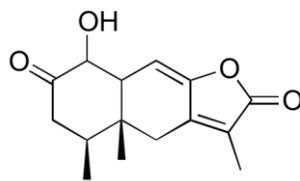
2.3 Metabolitos aislados del género *Malbranchea*

El género *Malbranchea* ha sido objeto de múltiples estudios químicos, de los cuales se han obtenido una serie de metabolitos secundarios con actividad biológica diversa. Entre los núcleos estructurales más comunes obtenidos en estudios químicos, destacan los alcaloides, benzoquinonas, hidroquinonas, benzofuranos y sesquiterpenos, entre otros. Estudios conducentes a determinar su actividad biológica han demostrado su potencial como agentes citotóxicos, inhibidores de la proteína calmodulina (CaM), agentes vasorrelajantes, antibióticos y antioxidantes. A continuación, se describen algunos ejemplos de gran relevancia.

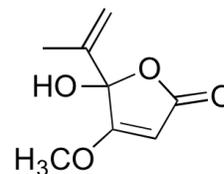
Dentro de este género, una de las especies con mayor número de estudios químicos y de actividad biológica es *Malbranchea aurantiaca*, un hongo coprófilo aislado de guano de murciélago. Derivado de diferentes investigaciones en nuestro grupo de trabajo se aislaron las malbranqueamidas, alcaloides con un núcleo inusual, el biciclo[2.2.2]diazaoctano denominados trivialmente como malbranqueamida (**21**), malbranqueamida B (**22**), isomalbranqueamida B (**23**) y premalbranqueamida (**24**), según la sustitución de halógenos en el anillo aromático. Además de las malbranqueamidas, se aisló un compuesto de tipo eremofilano (**25**) y el ácido penicílico (**26**) (Martínez-Luis et al. 2005).



Malbranqueamida (21)	R ₁ = Cl R ₂ = Cl
Malbranqueamida B (22)	R ₁ = Cl R ₂ = H
Isomalbranqueamida B (23)	R ₁ = H R ₂ = Cl
Premalbranqueamida (24)	R ₁ = H R ₂ = H



(25)



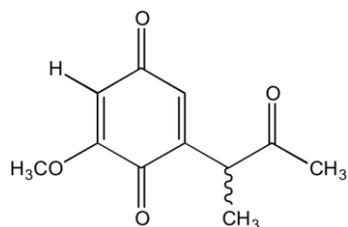
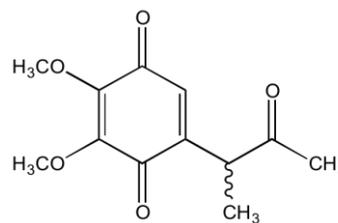
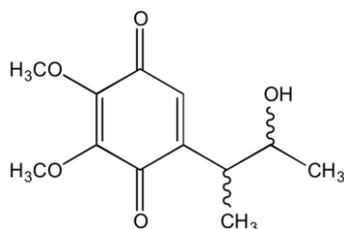
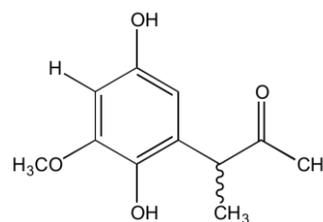
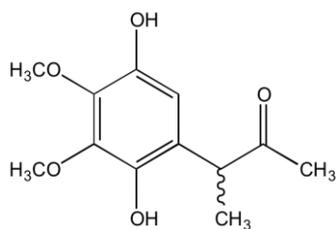
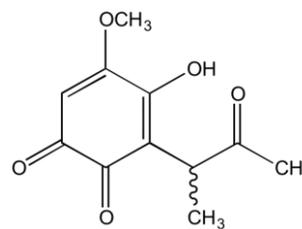
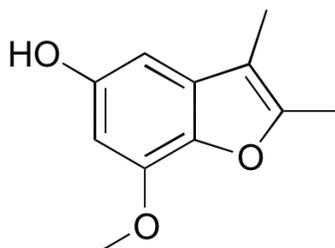
(26)

Estudios enfocados a la búsqueda de compuestos inhibidores del crecimiento vegetal revelaron la actividad fitotóxica de los metabolitos fúngicos **21** (CI_{50} 0.37 μ M), **25** (CI_{50} 6.57 μ M) y **26** (CI_{50} 3.86 μ M) contra semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), actividad comparable con la del control positivo, el ácido diclorofenoxiacético (**2,4-D**) (CI_{50} de 18 μ M) (Martínez-Luis et al. 2006; Martínez-Luis et al. 2005). En un intento para tratar de elucidar el mecanismo de acción fitotóxica de los metabolitos fúngicos, se evaluó la actividad de **21** como inhibidor de la proteína CaM mediante un ensayo enzimático, empleando la fosfodiesterasa 1 (**PDE 1**) como enzima monitora y cuantificando el fósforo inorgánico liberado. Los resultados demostraron que **21** inhibe de manera dependiente de la concentración al complejo CaM- Ca^{2+} -PDE1 con una CI_{50} de 10.2 ± 7.6 μ M, actividad comparable con el control positivo clorpromazina (CI_{50} = 18.4 ± 2.7 μ M) (Martínez-Luis et al. 2005). Desde este hallazgo, diversos estudios se enfocaron a caracterizar la interacción con la proteína CaM mediante métodos enzimáticos, de fluorescencia, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear y estudios *in silico* (González-Andrade et al. 2013; Figueroa et al. 2011). Dichos estudios demostraron que el compuesto **21** posee una gran afinidad por la proteína CaM, considerándolo como una molécula prototipo para el desarrollo de fármacos útiles en la terapéutica de procesos patológicos en los cuales está involucrada la CaM.

En este sentido, un estudio reciente indicó que los compuestos **21** – **23** inducen una vasorrelajación significativa *ex vivo* en aorta de rata en presencia y ausencia de endotelio, siendo el alcaloide **21** el compuesto más activo, induciendo un 98% de relajación en músculo liso. Mediante el uso de inhibidores selectivos en el proceso de relajación, se concluyó que los alcaloides fúngicos pueden ejercer su actividad vasorrelajante mediante vías nitrérgicas (estimulación de la producción de óxido nítrico) y vías alternas, como la inhibición del complejo Ca^{2+} -CaM (Madariaga-Mazón et al. 2015).

La especie fúngica *Malbranchea cinnamomea* es fuente productora de metabolitos secundarios de tipo quinona, tales como la malbranicina (**27**), 7-metoximalbranicina (**28**) y 7-metoximalbranicina II (**29**), así como las

hidroquinonas dihidromalbranicina (**30**), 7-metoximalbranicina IV (**31**) 7-metoximalbranicina III (**32**), y del benzofurano 7-metoxi-2,3-dimetilbenzofuran-5-ol (**33**).

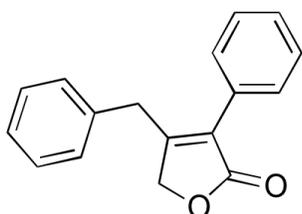
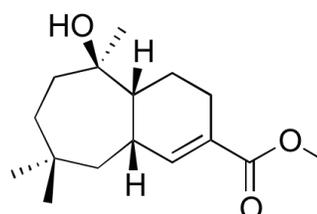
**27****28****29****30****31****32****33**

Chiung y colaboradores reportaron por primera vez los compuestos **27** y **30**, evaluando actividad antimicrobiana en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas para el compuesto **27**, sin embargo no se encontró inhibición significativa (Chiung et al. 1993). Posteriormente, Schlegel y colaboradores aislaron los compuestos **31** y **32**, junto con **27** - **30** y exploraron la inhibición de la expresión del sistema

Tax/CREB en *Saccharomyces cerevisiae* mediante la producción de β -galactosidasa, en donde sólo el compuesto **28** mostró inhibición específica de Tax/CREB, reflejado en una reducción de β -galactosidasa del 67%. Por último, el compuesto **33** representó ser un potente antioxidante al inhibir a las enzimas xantina oxidasa ($CI_{50}=9.8\mu\text{M}$) y peroxidasa de rábano ($CI_{50}=7.5\mu\text{M}$) (Schlegel et al. 2003).

Kawai y colaboradores estudiaron la especie *M. filamentosa* Sigler and Carmichael IMF41300 provista del Centro de Investigación en Micología Médica, Universidad de Chiba en Japón. De este análisis, se aislaron doce compuestos novedosos, entre los que destacan triterpenos glicosilados, sesquiterpenos y furanonas, los cuales se describen a continuación.

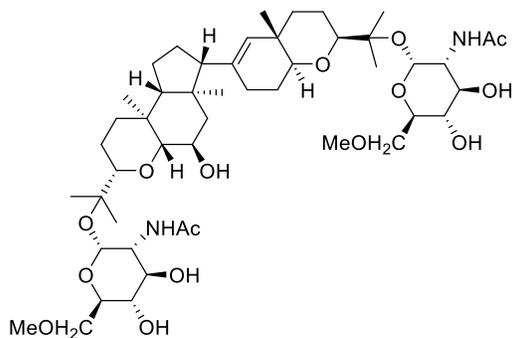
El compuesto **34**, una 4-bencil-3-fenil-5H-furan-2-ona presentó actividad vasodilatadora al ser evaluado en aorta de rata a una concentración de (10^{-5} y 10^{-6} M), posiblemente debido a la inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Hosoe et al. 2005). Los malfilanoles A (**35**) y B (**36**) mostraron actividad antifúngica cuando se evaluaron contra *Cryptococcus neoformans*. Además, los metabolitos **35** y **36** demostraron actividad citotóxica contra las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con una $CI_{50}= 14.6$ y $19.8 \mu\text{M}$, respectivamente, mientras que para células de cáncer de pulmón A549 sólo el compuesto **36** resultó activo con una $CI_{50}=7.8 \mu\text{M}$ (Wakana et al. 2009).

**34****35**

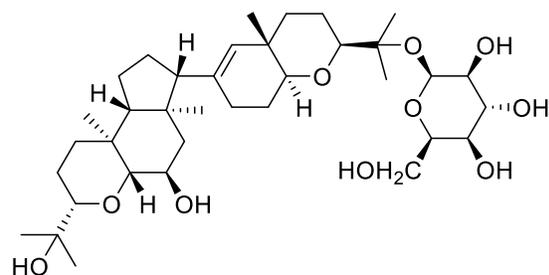
R=H

36R=CH₃

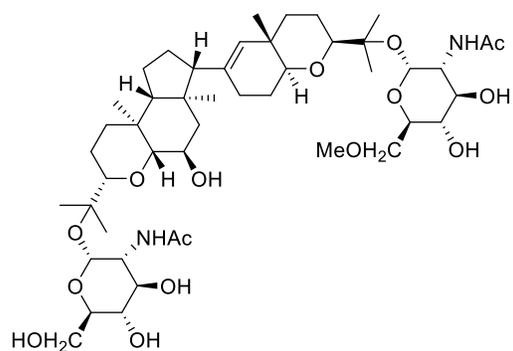
En otro estudio, se aislaron 4 triterpenos glicosilados con los residuos 6-O-metil-N-acetil-D-glucosamina y/o D-manosa, denominados trivialmente como malbraqueósidos A-D (**37-40**) (Wakana et al. 2008).



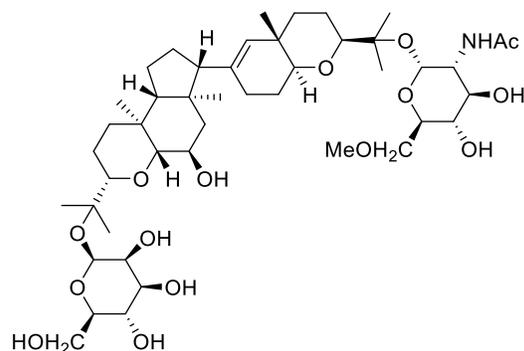
37



38

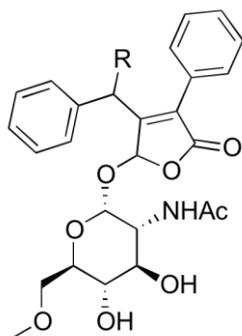


39



40

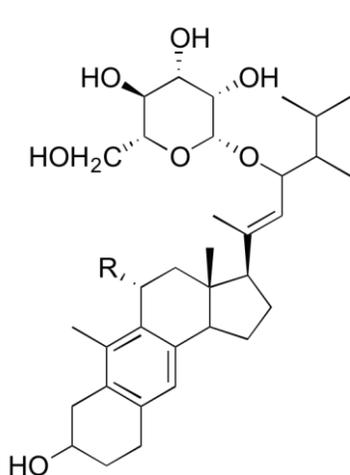
Cabe mencionar que **41** y **42** fueron los primeros compuestos con núcleo furanona glicosilado obtenidos a partir de una especie fúngica, trivialmente nombrados como malfilamentósidos A y B (Akana et al. 2008).



41 R= H

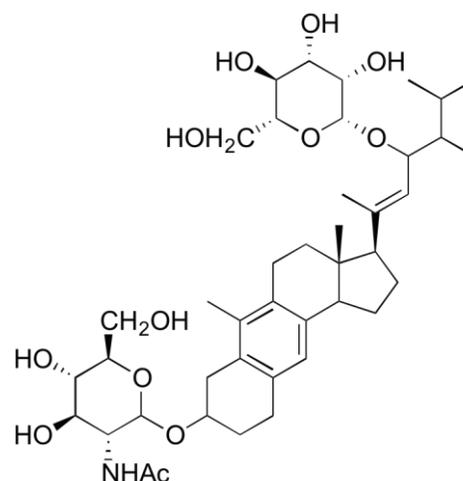
42 R= OH

Para los compuestos **43-45**, llamados malsterósidos, se evaluó su efecto citotóxico contra dos células epiteliales malignas de humano, en donde sólo los compuestos **43** y **45** mostraron actividad inhibitoria significativa con una CI_{50} de 28.1 y 76.8 μM , respectivamente; en cuanto a células de cáncer de pulmón (A549) sólo el compuesto **43** presentó inhibición de la proliferación celular con una CI_{50} = 38.6 μM . Cabe mencionar que estos compuestos presentan un núcleo antraesteroidal que es muy raro en la naturaleza, por lo que además, representan los primeros glicósidos antraesteroidales a partir de especies fúngicas (Wakana et al. 2014).



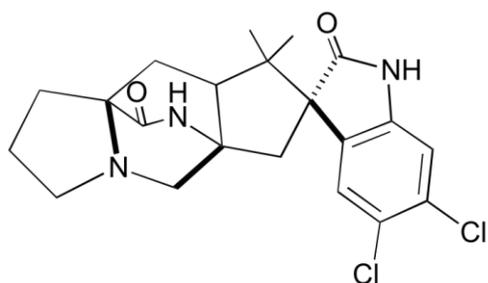
43 R= H

45 R= OH

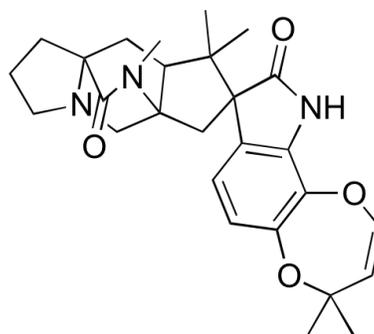


44

El estudio químico de la especie marina *M. graminícola* (número de colección 086937A) culminó en el aislamiento e identificación de compuestos similares a las malbranqueamidas obtenidas de *M. aurantiaca*, por medio de una técnica llamada DART (Ionización por análisis directo en tiempo real) acoplada a espectrometría de masas (Watts et al. 2011). En esta investigación, se aisló e identificó la (-)-espiromalbramida (**46**) como un compuesto novedoso y con gran similitud a la malbranqueamida; además se aislaron los compuestos conocidos (-)-paraherquamida B (**47**), (-)-notoamida B (**48**) y la isomalbranqueamida B (**49**).

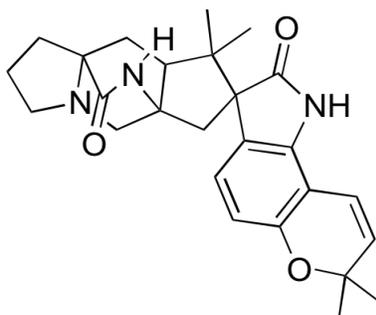


46

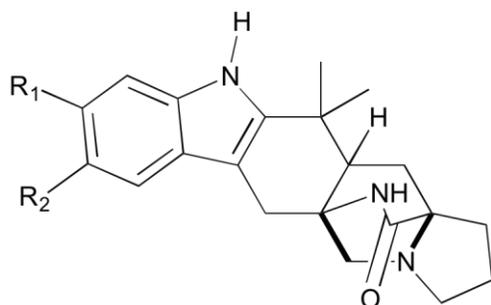


47

En este mismo estudio, los autores propusieron la hipótesis de que *M. graminicola* podía incorporar halógenos distintos al cloro, como en el caso de las malbranqueamidas, por lo que decidieron enriquecer el medio de cultivo con sales de bromo y el resultado fue la producción de la malbranqueamida C (**50**) e isomalbranqueamida C (**51**).

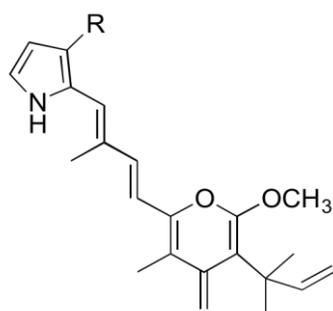


48

49 R₁= H R₂= Cl50 R₁= Br R₂= H51 R₁= H R₂= Br

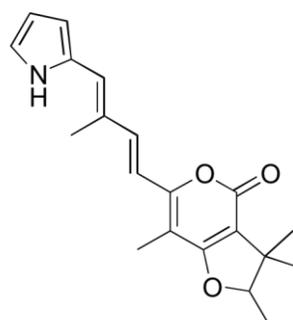
De la especie termófila *M. sulfúrea* aislada a partir de aguas termales del río Sihchong en el condado de Pingtung, Taiwán; se aislaron los policétidos

fotosensibles malbranpirroles A-F (**52-57**). Algunos compuestos similares se han aislados de la especie fúngica *Gymnoascus reessii*.

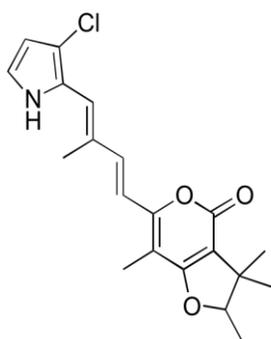


52 R= H

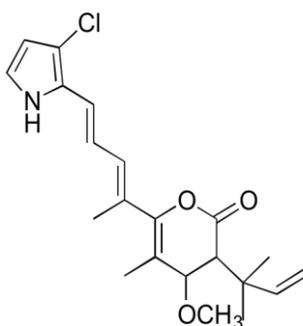
54 R= Cl



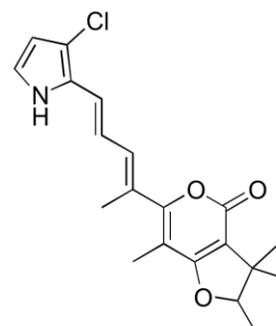
53



55



56

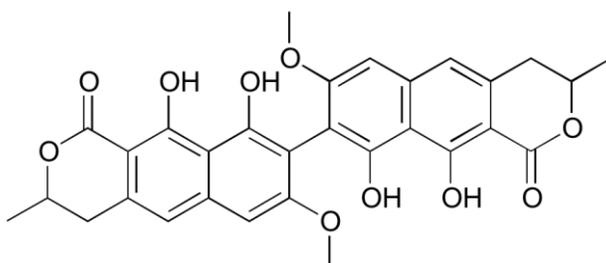


57

Se evaluó la citotoxicidad de dichos compuestos (excepto el **53** que no pudo ser purificado) contra líneas celulares PANC-1, HepG2 y MCF-7, en donde la Cl_{50} resultó alrededor de 3-11 μM para los compuestos **54-57**, mientras que el **52** no mostró inhibición de la proliferación celular en ninguna línea, lo que sugiere que el átomo de cloro en el anillo pirrol, presente en los demás compuestos, podría representar el farmacóforo (Yang et al. 2009).

De *M. pulchella* var. *sulfurea*, una especie termófila, se aisló el policétido Tf-26Vx (**58**) con actividad antibiótica. Los resultados de la evaluación antimicrobiana mostraron que el compuesto **58** tiene una alta actividad contra bacterias Gram-

positivas: *Bacillus subtilis* PCI-219 y *Staphylococcus aureus* 222 con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.045 y 0.19 µg/mL, respectivamente. En cuanto a bacterias Gram-negativas anaerobias estrictas, en *Bacteroides fragilis* V-6 y *Fusobacterium glutinosum* se determinaron CMI de <0.39 y 12.5≈25 µg/mL, por último, contra bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas (*E.coli*, *Klebsiella sp*, *Salmonella typhi*, entre otras) no se observó inhibición (Saito et al. 1979).



58

Además de esta serie de compuestos, a partir del género *Malbranchea* se han aislado diversas enzimas con una gran aplicación en estudios bioquímicos. Algunos ejemplos son las enzimas lignocelulíticas, glicosil hidrolasas, liasas de polisacáridos y esterases de carbohidratos (Mahajan et al. 2016); β-mananasa eficaz para la hidrólisis de la goma presente en la semilla de algarroba (Ahirwar et al. 2016), y las xilanasas MFX I y II que potencialmente se pueden utilizar en el tratamiento de la pulpa producida por residuos orgánicos, así como en la producción de xilooligosacáridos en alimentos funcionales prebióticos (Sharma et al. 2010).

3. Justificación

De acuerdo a la OMS la diabetes mellitus es un problema de salud grave a nivel mundial y se considerada actualmente como una epidemia. Por su parte, la Federación Internacional de Diabetes en 2015 determinó que 415 millones de la población mundial padece DM y, estimó que para 2040 este número se incrementaría a 642 millones. A pesar de que los tratamientos farmacológicos para este padecimiento parecieran suficientes, es necesario contribuir con el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos, que sean más potentes, selectivos y que a su vez, presenten menos efectos adversos. En este contexto, los productos naturales y en especial los microorganismos fúngicos han sido una fuente muy importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Es por esto que el presente proyecto tiene como objetivo primordial el contribuir a la investigación y descubrimiento de nuevos agentes inhibidores de las enzimas α -glucosidasas, particularmente de la especie fúngica *Malbranchea circinata*, la cual carece de estudios químico en la literatura.

4. Hipótesis

Considerando que el género *Malbranchea* representa una fuente productora de valiosos metabolitos con diversas actividades biológicas y, que la especie *M. circinata* no tiene precedentes de investigación química, el estudio químico de *M. circinata* conllevará al descubrimiento de compuestos bioactivos, probablemente con estructuras inéditas.

5. Objetivo general

Contribuir a la investigación y descubrimiento de nuevos agentes inhibidores de las enzimas α -glucosidasas potenciales para el tratamiento de la DM2, mediante el estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea circinata*.

5.1 Objetivos particulares

- a) Cultivar el hongo objeto de estudio en pequeña escala modificando la composición del medio de cultivo para establecer las mejores condiciones de crecimiento.
- b) Cultivar la especie fúngica en mediana escala (con el medio seleccionado) para obtener el extracto orgánico por métodos de reparto y/o maceración.
- d) Llevar a cabo el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico y establecer las fracciones con actividad inhibidora de las enzimas α -glucosidasas mediante una evaluación biológica preliminar.
- e) Aislar y purificar los compuestos presentes en las fracciones activas, y llevar a cabo su caracterización estructural mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- f) Evaluar los metabolitos puros contra las enzimas α -glucosidasas obtenidas de raspado intestinal de rata y de *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Parte experimental

6.1 Material fúngico

La especie *Malbranchea circinata* fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) bajo la clave 34526.



Figura 5. *Malbranchea circinata* cultivada en agar papa – dextrosa (30 días).

6.2 Registro de constantes físicas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron con un espectrofotómetro de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) marca PerkinElmer Spectrum 400 mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un equipo Bruker Avance III a 400 MHz (^1H) o 100 MHz (^{13}C), utilizando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna, los desplazamientos químicos fueron registrados en partes por millón (ppm, δ). Los espectros de masas se generaron mediante ionización por electrospray (EM-ESI) en un espectrómetro LECO Pegasus 4D. El registro de los espectros se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química y en el Instituto de Química, ambos de la UNAM.

6.3 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo técnicas convencionales utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla de 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones, empleando diversos sistemas de elución. Como agentes cromógenos se emplearon soluciones de sulfato cérico amoniacal y Dragendorff. Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron utilizando como fase estacionaria gel de sílice (gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck®), y empleando diferentes sistemas de elución como eluyentes (Hex, CH₂Cl₂ y MeOH).

6.4 Estudio químico de *M. circinata*

6.4.1 Fermentación

Los cultivos en pequeña escala se prepararon en medio líquido (200 mL) medio caldo papa-dextrosa (PDA) y un medio sólido de arroz (35 g), ambos por un periodo de fermentación de 21 días.

Para el cultivo a mediana escala, se preparó un cultivo semilla en medio líquido PDA (150 mL) y se fermentó durante 14 días. Este cultivo sirvió para inocular el medio de arroz sólido (1,000 g), el cual se dejó en crecimiento durante 31 días en condiciones de luz-sombra normal y temperatura ambiente.

Todos los medios de cultivo, se esterilizaron en una autoclave con un ciclo de esterilización de 30 minutos, temperatura 121°C y presión de 15 psi. Posteriormente se inocularon con la especie fúngica y se dejaron fermentar. Las composiciones de los medios utilizados se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Medios de cultivo.

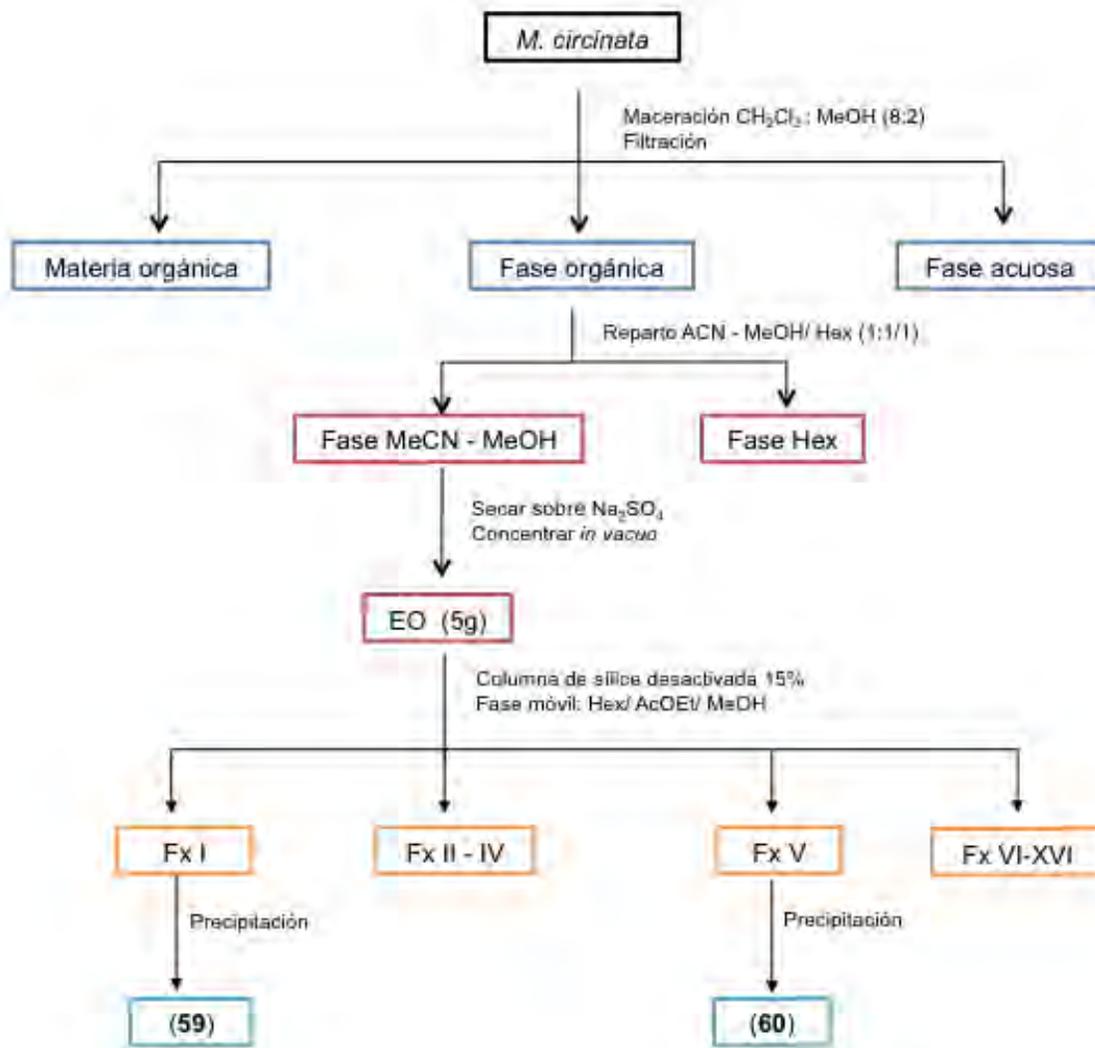
Medio	Composición																		
<i>PDB (BD Difco®)</i> (Líquido)	Almidón de papa..... 4.0 g Dextrosa..... 20.0 g Agua destilada..... cbp 1 L																		
<i>PDB (BD Difco®)</i> (Sólido)	Almidón de papa..... 4.0 g Dextrosa..... 20.0 g Agar bacteriológico..... 15.0 g Agua destilada..... cbp 1 L																		
<i>Arroz</i>	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>Integral.....</td> <td>17.5 g</td> </tr> <tr> <td>Pequeña escala</td> <td>Blanco.....</td> <td>17.5 g</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Agua.....</td> <td>70 mL</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Integral.....</td> <td>125 g</td> </tr> <tr> <td>Mediana escala</td> <td>Blanco</td> <td>125 g</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Agua.....</td> <td>500 mL</td> </tr> </table>		Integral.....	17.5 g	Pequeña escala	Blanco.....	17.5 g		Agua.....	70 mL		Integral.....	125 g	Mediana escala	Blanco	125 g		Agua.....	500 mL
	Integral.....	17.5 g																	
Pequeña escala	Blanco.....	17.5 g																	
	Agua.....	70 mL																	
	Integral.....	125 g																	
Mediana escala	Blanco	125 g																	
	Agua.....	500 mL																	

6.4.2 Obtención del extracto orgánico y fraccionamiento preliminar

Una vez concluido el tiempo de fermentación, se procedió a la preparación del extracto orgánico (EO). Para ello, se llevaron a cabo procesos de maceración sucesivas y exhaustivas con una mezcla de diclorometano-metanol (CH₂Cl₂-MeOH) en proporción 8:2 (6 x 700 mL). Posteriormente, el extracto obtenido de cada maceración se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El extracto obtenido se sometió a un proceso de desgrase mediante una serie de repartos empleando una mezcla de acetonitrilo metanol (CH₃CN-MeOH) 1:1 y hexano en volúmenes iguales (8 x 200 mL), la fracción de CH₃CN-MeOH se concentró *in vacuo* para obtener de esta manera el EO.

El fraccionamiento del EO se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta con gel de sílice (575 mL) desactivada al 15 %, empleando como eluyente mezclas de polaridad creciente de Hexano-Acetato de etilo-Metanol (Hex-AcOEt-MeOH), con incremento gradual de polaridad. Se obtuvieron un total de

359 fracciones, que de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica se reunieron en dieciséis fracciones primarias (Fx I - Fx XVI) (**Esquema 1**).



Esquema 1. Preparación y fraccionamiento del EO de *M. circinata*.

6.5 Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en *M. circinata*

6.5.1 Aislamiento de la 1,4,8-trihidroxi-3-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)-9H-xanten-9-ona

De la fracción primaria Fx I precipitaron espontáneamente 38.2 mg de un

polvo amarillo, identificado como 1,4,8-trihidroxi-3-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)-9H-xanten-9-ona (Fx I, **59**):

1,4,8-trihidroxi-3-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)-9H-xanten-9-ona (59):

Polvo amarillo, p.f. 170-175°C; UV (MeOH): λ_{\max} 228, 259, 349 nm, IR (ATR): ν_{\max} 3567, 1660, 1629, 823 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (400Hz), CDCl_3 δ_{H} (ppm): 6.73 (1H, d, $J = 8.43$ Hz, H-2), 7.44 (1H, d, $J = 8.42$ Hz, H-3), 6.57 (1H, d, $J = 0.87$ Hz, H-7), 2.37 (3H, d, $J = 0.71$, - CH_3 -11), 3.49 (2H, dd, $J = 1.11, 6.94$ Hz, H-1'), 5.31 (1H, dddt, $J = 1.43, 1.43, 2.88, 5.85, 7.01$, H-2'), 1.79 (6 H, dd, $J = 1.39, 6.50$, H-4'), 1.79 (6 H, dd, $J = 1.39, 6.50$, H-5'), 11.79 (1 H, s, OH-1), 5.10 (1H, s, OH-5), 10.97 (1 H, OH-8); $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3 δ_{C} (ppm): 160.3 (C-1), 111.2 (C-2), 138.2 (C-3), 119.5 (C-4), 153.4 (C-4a), 135.8 (C-5), 134.6 (C-6), 112.1 (C-7), 153.5 (C-8), 106.1 (C-8a), 186.2 (C-9), 108.0 (C-9a), 142.7 (C-10a), 17.2 (C-11), 28.9 (C-1'), 122.3 (C-2'), 133.9 (C-3'), 18.4 (C-4'), 26.1 (C-5'); HR-ESI-MS m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ 325.1069 (calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_5$).

6.5.2 Aislamiento de la 2-((4,5-dihidroxi-7-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidroantracén-2-il)oxi)-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3,4-diil diacetato

De la fracción primaria Fx V precipitó espontáneamente 21.4 mg de un sólido color naranja que se lavó en repetidas ocasiones con acetonitrilo (CH_3CN) con el fin de purificarlo, se identificó como 2-((4,5-dihidroxi-7-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidroantracén-2-il)oxi)-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3,4-diil diacetato (FxV, **60**).

2-((4,5-dihidroxi-7-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidroantracén-2-il)oxi)-5-

(hidroximetil)tetrahidrofuran-3,4-diil diacetato (60): Polvo naranja, p.f. 216-216 °C; UV (MeOH): λ_{\max} 224, 263, 434 nm, IR (ATR): ν_{\max} 3564, 1741, 1215, 1677 cm^{-1} , $^1\text{H-RMN}$ (400Hz), CDCl_3 δ_{H} (ppm): 7.08 (1H, dd, $J = 0.94, 1.77$ Hz, H-2), 7.62 (1H, dd, $J = 0.70, 1.72$ Hz, H-4), 7.47 (1H, d, $J = 2.47$ Hz, H-5), 6.9 (1H, d, $J = 2.46$ Hz, H-7), 2.45 (4H, s, CH_3 -11), 6.07 (1H, d, $J = 4.49$ Hz, H-1'), 5.2 (1H, dd, $J = 4.45, 7.0$, Hz, H-2'), 5.42 (1H, dd, $J = 2.97, 7.0$ Hz, H-3'), 4.32 (1H, q, $J = 2.96, 2.96$,

2.94 Hz, H-4'), 3.87 (2H, qd, $J = 2.99, 12.24, 12.23, 12.23$ Hz, H-5'), 2.16 (3H, s, H-7'), 2.2 (3H, s, H-9'), 12.05 (1H, s, OH-1), 12.23 (1H, s, OH-8); ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 163.0 (C-1), 125.0 (C-2), 149.2 (C-3), 121.9 (C-4), 133.6 (C-4a), 110.3 (C-5), 163.7 (C-6), 110.3 (C-7), 165.3 (C-8), 111.7 (C-8a), 191.4 (C-9), 114.1 (C-9a), 182.3 (C-10), 135.7 (C-10a), 22.7 (C-11) 98.8 (C-1'), 71.7 (C-2'), 70.5 (C-3'), 84.7 (C-4'), 62.5 (C-5'), 170.4 (C-6'), 21.3 (C-7'), 171.1 (C-8'), 21.0 (C-9'); HR-ESI-MS m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ 485.1074 (calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$).

6.6 Evaluaciones biológicas

6.6.1 Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio del EO y compuestos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de intestino delgado de rata

La determinación se realizó por medio de un ensayo espectrofotométrico, en un equipo iMark (BioRad®) utilizando cajas de 96 pozos.

Las muestras ensayadas se disolvieron en buffer de fosfatos pH=7 y/o metanol, para el caso del EO se preparó una solución a 5000 ppm y para los compuestos **59** y **60** soluciones stock a 5.52 y 1.44 mM, el sustrato y el control positivo acarbosa se prepararon a una concentración de 10 mM. El crudo enzimático obtenido a partir de intestino delgado de rata (Sigma Aldrich®) se preparó pesando 40 mg y disolviendo en 1 mL de buffer.

Para el caso de la curva de acarbosa (por triplicado), se utilizaron alícuotas de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 18 μL de la solución stock en cada pozo y 20 μL de enzima además de buffer. Se incubó durante 10 minutos a 37 °C y se agregaron a cada pozo una alícuota de 10 μL de sustrato, se realizó la primera lectura (A_0) a una longitud de 415 nm y se incubó por 30 minutos, al término de este tiempo se realizó la segunda lectura (A_{30}). Los valores de las absorbancias se adquirieron mediante el programa Microplate Manager 6 y con los datos obtenidos se calculó

el % de inhibición con la siguiente relación:

$$\% \text{ inhibición} = \left[1 - \frac{A_{30} - A_0}{A} \right] * 100$$

Donde:

A_{30} = Absorbancia medida a los 30 minutos.

A_0 = Absorbancia medida al tiempo cero.

A = Absorbancia del blanco (pozo sin inhibidor).

Los datos obtenidos a partir de esta ecuación fueron procesados en el programa estadístico OriginPro versión 9 para el cálculo de CI_{50} , utilizando un análisis de regresión no lineal con la ecuación de Hill 1.

Para los compuestos **59** y **60** el ensayo se realizó de la misma manera, bajo los siguientes esquemas:

Tabla 5. Ensayo inhibición enzimas α -glucosidasas (Intestino delgado rata) de **59**.

	μL						
Buffer	70	58	54	50	42	34	30
Enzima	20	20	20	20	20	20	20
Fx I	0	12	16	20	28	36	40
Incubar 10 min. Leer absorbancia (A_0)							
Sustrato	10	10	10	10	10	10	10
Incubar 30 min. Leer absorbancia (A_{30})							
Calcular CI_{50}							

Tabla 6. Ensayo inhibición enzimas α -glucosidasas (Intestino delgado de rata) de **60**.

	μL						
Buffer	70	60	50	40	30	20	10
Enzima	20	20	20	20	20	20	20
Fx V	0	10	20	30	40	50	60
Incubar 10 min. Leer absorbancia (A_0)							
Sustrato	10	10	10	10	10	10	10
Incubar 30 min. Leer absorbancia (A_{30})							
Calcular CI_{50}							

6.6.2 Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio del EO y compuestos puros sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*

El ensayo se realizó de la misma manera que el descrito anteriormente, con pequeñas variaciones. Se preparó 1U/ mL de enzima de levadura (α GHY; Sigma-Aldrich®) en buffer de fosfatos una noche anterior a realizar el ensayo.

Inicialmente se evaluó la enzima con sustrato (*p*-NPG) 5 mM con el objetivo de determinar el volumen de enzima a utilizar. Para ello, se utilizaron alícuotas de 0, 4, 8, 12, 16 y 20 μ L de enzima y cuanto bastara para 100 μ L de volumen final con buffer de fosfatos; se leyó la absorbancia (A_0) y se incubó 30 minutos para leer de nuevo la absorbancia final (A_{30}). Por medio de la diferencia entre las absorbancias se utilizó el volumen de enzima con el que se obtuviera una absorbancia próxima a 0.6.

Para el experimento de inhibición, se prepararon soluciones stock de 5 mM para el sustrato, para los compuestos **59** y **60** concentraciones de 0.6 y 1.44 mM, respectivamente, y para el control positivo acarbosa (**4**) de 10 mM.

La curva de acarbosa se realizó siguiendo la metodología empleada para la enzima de intestino delgado de rata, descrita anteriormente. Para los compuestos **59** y **60** el ensayo se realizó mediante los siguientes esquemas:

Tabla 7. Ensayo inhibición enzimas α -glucosidasas (*S. cerevisiae*) de **59**.

	μ L					
Buffer	77	75	73	71	69	67
Enzima	13	13	13	13	13	13
Fx I	0	12	16	20	28	36
Incubar 10 min. Leer absorbancia (A_0)						
Sustrato	10	10	10	10	10	10
Incubar 30 min. Leer absorbancia (A_{30})						
Calcular CI_{50}						

Tabla 8. Ensayo inhibición enzimas α -glucosidasas (*S. cerevisiae*) de 60.

	μL							
Buffer	77	75	73	71	69	67	57	47
Enzima	13	13	13	13	13	13	13	13
Fx V	0	2	4	6	8	10	20	30
Incubar 10 min. Leer absorbancia (A_0)								
Sustrato	10	10	10	10	10	10	10	10
Incubar 30 min. Leer absorbancia (A_{30})								
Calcular CI_{50}								

El cálculo del % de inhibición y CI_{50} , se determinó como se describió anteriormente.

7. Resultados y discusión

El presente proyecto describe el estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea circinata* (ATCC, clave 34526) con el objetivo de contribuir a la investigación y descubrimiento de nuevos agentes inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. La selección de dicha especie se realizó bajo un criterio quimiotaxonómico, ya que en nuestro grupo de trabajo se estudió un miembro del género *Malbranchea*, la especie *M. aurantiaca*, investigación que derivó en la obtención de metabolitos bioactivos con núcleos estructurales novedosos y con actividad biológica de relevancia farmacológica (Martínez-Luis, et al. 2005; Martínez-Luis et al. 2006; Figueroa et al. 2008; Madariaga-Mazón et al. 2015). Además, representa el primer estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea circinata*, contribuyendo al conocimiento químico sobre el género *Malbranchea*.

El estudio inició con la resiembra de la especie fúngica y el establecimiento de las mejores condiciones de crecimiento mediante la fermentación en diferentes medios de cultivo. Una vez seleccionado el medio de cultivo, se preparó el EO y se evaluó su actividad como inhibidor de las enzimas α -glucosidasas (intestino delgado de rata y *S. cerevisiae*); seguido de un fraccionamiento biodirigido con la finalidad de encontrar a los metabolitos responsables de dicha actividad. Los compuestos mayoritarios encontrados se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales. Por último, se realizó la evaluación *in vitro* de los compuestos aislados.

Siguiendo la metodología antes descrita, se obtuvieron los resultados que se describen a continuación. Como primer punto se abordará la fermentación, extracción y purificación de los compuestos novedosos obtenidos, una xantona prenilada (**59**) y una antraquinona glicosilada (**60**). Como segundo punto se discutirá la actividad biológica de los metabolitos fúngicos aislados.

7.1 Estudio químico de la especie *Malbranchea circinata*

Una vez realizada la resiembra de *Malbranchea circinata* y con el objetivo de determinar las mejores condiciones de crecimiento, se prepararon dos medios de cultivo a pequeña escala (**Tabla 9**).

Tabla 9. Rendimiento del extracto orgánico obtenido con dos medios de cultivo.

	Rendimiento	
	Caldo papa-dextrosa (g extracto/200mL medio cultivo)	Medio sólido de arroz (g extracto/ 35 g arroz)
<i>M. circinata</i>	0.136	1.226

De acuerdo a los resultados presentados en la **Tabla 9**, el mejor rendimiento de EO se obtuvo en medio sólido de arroz en condiciones normales de luz-oscuridad y temperatura ambiente.

Una vez establecido el mejor medio de cultivo, se fermentó en mediana escala el medio sólido de arroz y se preparó el EO según se indicó en el punto **6.4.2** de la *Parte Experimental*, para obtener 54 g de un extracto color rojizo y de apariencia aceitosa. Debido a la presencia de una gran cantidad de grasas que interferían con el análisis cromatográfico y de actividad biológica, el EO se fraccionó mediante un reparto entre CH₃CN:MeOH (1:1) y hexano. Dichas grasas probablemente provenían de la extracción del arroz. De esta manera se obtuvieron 5.26 g de EO desgrasado.

Con el EO desgrasado se realizó cualitativamente una evaluación biológica preliminar para determinar el posible efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas de intestino delgado de rata, en donde se observó una inhibición de cerca del 40%, lo cual indicaba la probable presencia de metabolitos con actividad inhibitoria. Posteriormente se procedió con el fraccionamiento bidirigido mediante CCA en gel de sílice. Los sistemas de elución empleados se indican en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Sistema de elución del fraccionamiento por CCA para el EO de *M. circinata*.

Fracción	Hex	AcOEt	MeOH
0 - 28	80	20	-
29 - 78	70	30	-
79 - 137	60	40	-
138 - 152	50	50	-
153 - 179	40	60	-
180 - 194	30	70	-
195 - 218	20	80	-
219 - 240	10	90	-
241 - 259	-	100	-
260 - 288	-	95	5
289 - 305	-	90	10
306 - 321	-	80	20
322 - 338	-	75	25
339 - 350	-	70	30
351 - 359	-	60	40

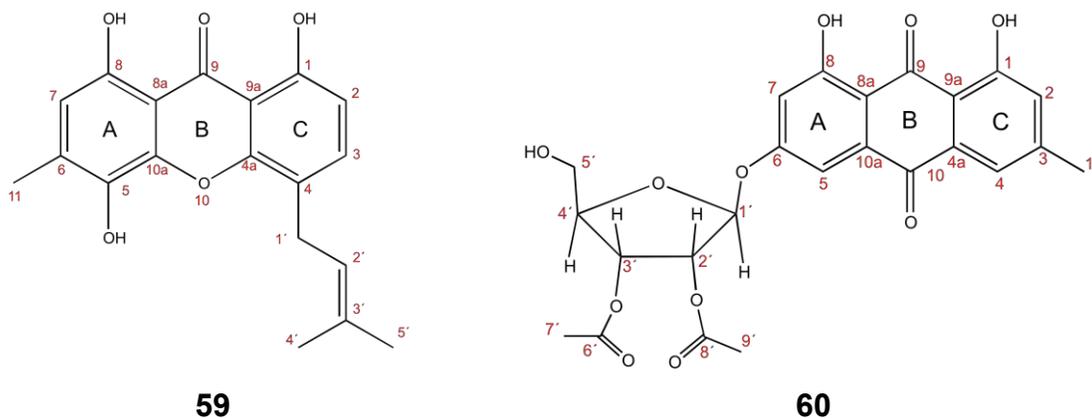
Se obtuvieron fracciones de baja, mediana y alta polaridad que de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica se reunieron en dieciséis fracciones primarias, tal como se indica en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Rendimiento de fracciones primarias.

Fracciones primarias	Fracciones incluidas	Rendimiento (mg)	Actividad Biológica¹
Fx I	1 - 6	120	+
Fx II	7 - 25	681.7	
Fx III	26 - 32	163.9	
Fx IV	33 - 46	99.6	
Fx V	47 - 61	135.4	
Fx VI	62 - 79	86.1	
Fx VII	80 - 89	59.8	+
Fx VIII	90 - 114	150.3	
Fx IX	115 - 141	79.2	
Fx X	142 - 190	253.1	
F x XI	191 - 208	27.2	+
Fx XII	209 - 230	146.8	
Fx XIII	231 - 250	35.4	
Fx XIV	251 - 283	172.6	
Fx XV	284 - 305	132.5	+
Fx XVI	306 - 359	150.3	

¹Se determinó de manera cualitativa la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas.

De las fracciones activas Fx-I y Fx-V se observaron precipitados, indicando la presencia de compuestos mayoritarios que promovían dicha precipitación. Ambos sólidos fueron lavados con mezclas de CH₃CN y/o MeOH para obtener dos compuestos puros, una xantona prenilada (**59**) y una antraquinona glicosilada (**60**).



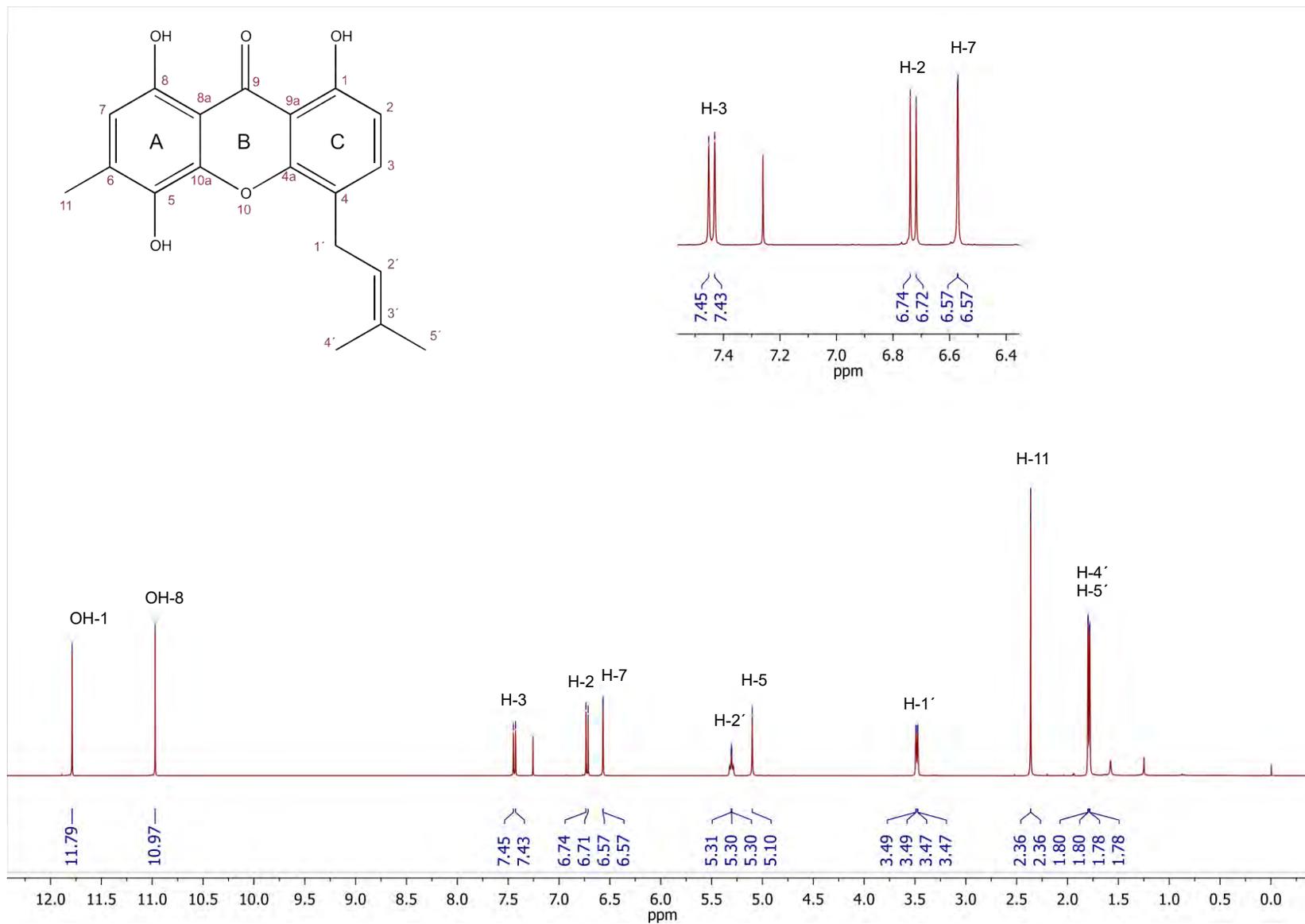
La caracterización de los compuestos fúngicos se realizó mediante el análisis de experimentos espectroscópicos: IR, RMN monodimensionales (¹H y ¹³C) y bidimensionales (HSQC, HMBC, NOESY, COSY), así como espectrometría de masas (HR-ESI-MS). Cabe destacar que ambos metabolitos resultaron ser novedosos ya que no se han reportado en la literatura.

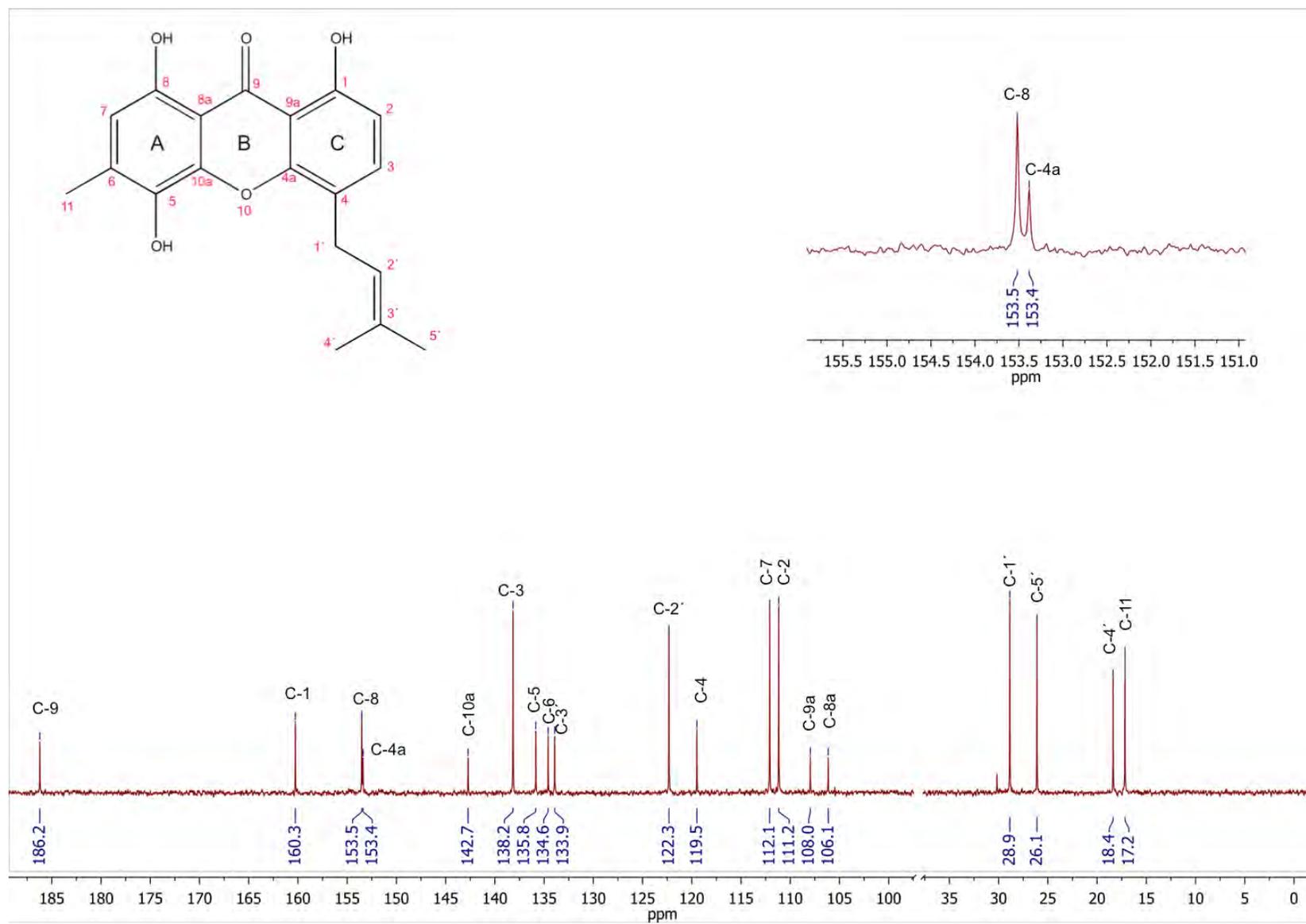
7.1.1 Caracterización estructural de la xantona prenilada (**59**)

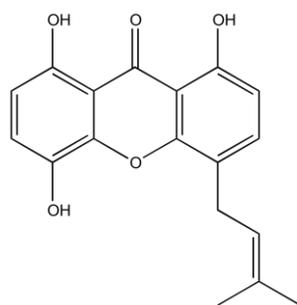
El compuesto **59** se aisló como un polvo amarillo, su fórmula molecular se estableció mediante espectrometría de masas [EM-HR-ESI] como C₁₉H₁₈O₅, con un grado de insaturación igual a once. El espectro de IR (**Figura A1**) mostró bandas de absorción en ≈ 3500 , 1659, 1625 y 820 cm⁻¹, características de grupos hidroxilo, prenilo y núcleo xantona. Los datos obtenidos a partir de los espectros de RMN (¹H y ¹³C; **Figuras 6 y 7**) [**Tabla 12**] fueron similares a aquellos reportados para la caraxantona (**61**) (Fouotsa et al. 2012), una xantona que, a diferencia del compuesto **59**, carece de un grupo metilo en la posición 6.

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C para **59** (CDCl₃, ¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz).

Posición	δ C (ppm)	δ H (mult, J en [Hz])	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	COSY
1	160.3			
2	111.2	6.73 (d, 8.43)	1, 4, 9, 9a	
3	138.2	7.44 (d, 8.42)	1, 4a, 9a, 1'	2
4	119.5			
4a	153.4			
5	135.8			
6	134.6			
7	112.1	6.57 (d, 0.87)	6, 8, 8a, 9, 10a	
8	153.5			
8a	106.1			
9	186.2			
9a	108.0			
10a	142.7			
11	17.2	2.37 (d, 0.71)	5, 6, 7, 8a, 10a	
1'	28.9	3.49 (dd, 1.1, 6.94)	3, 4, 4a, 2', 3'	
2'	122.3	5.31 (dddt, 1.43, 1.43, 2.88, 5.85, 7.01)	4'	1', 4', 5'
3'	133.9			
4'	18.4	1.79 (dd, 1.39, 6.5)	2', 5'	1'
5'	26.1	1.71 (dd, 1.39, 6.5)	2', 4'	1'
OH-1		11.79 (s)	1, 2, 3, 9a	
OH-5		5.10 (s)	.	
OH-8		10.97 (s)	5, 7, 8, 8a	

Figura 6. Espectro RMN- ^1H del compuesto 59.

Figura 7. Espectro RMN- ^{13}C del compuesto 59.



61

En el espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , **Figura 7**) se observaron señales para 19 carbonos, incluyendo una cetona (C-9, δC 186.2 ppm) de xantona, tres carbonos bases de oxígeno en anillo aromático (δC 135.8, δC 153.5 y δC 160.3 ppm); señales para un residuo prenilo: dos metilos (C-4', δC 18.4; y C-5', 26.1 ppm) soportados sobre un doble enlace (C-3', δC 133.9 ppm) y un metileno alfa a éste último (C-1', δC 28.9 ppm); así como la presencia de un metilo (C-11, δC 17.2 ppm) sobre anillo aromático. En el espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observaron señales para tres protones en anillo aromático (δH 6.73, 7.44 y 6.57 ppm), un metileno alfa a un doble enlace (δH 3.49 ppm), y dos hidroxilos quelatados (δH 10.97 y 11.79 ppm).

En primer lugar, el residuo prenilo se evidenció por la presencia de dos metilos desapantallados (CH_3 -4' y CH_3 -5') adyacentes a un doble enlace que mostraron un acoplamiento de tipo alílico ($J = 1.39$ Hz) con el protón olefínico en H-2', que a su vez se acopla con los protones del metileno H-1' ($J = 6.94$ Hz), como se observa en la **Figura 8**.

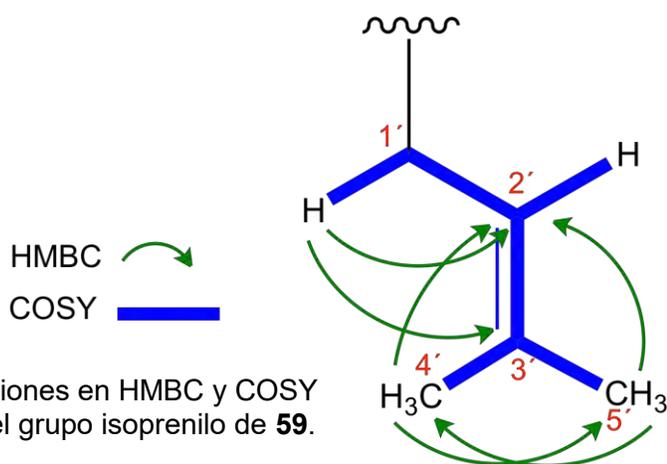


Figura 8. Correlaciones en HMBC y COSY observadas para el grupo isoprenilo de **59**.

Las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales HMBC (**Figura 9**) y COSY (**Figura 10**) para los protones del prenilo en H-1' con tres carbonos aromáticos (C-4, C4a y C3) y con el doble enlace (C-2' y C-3'), indicaban que el residuo de prenilo se encontraba unido a la xantona en la posición C-4.

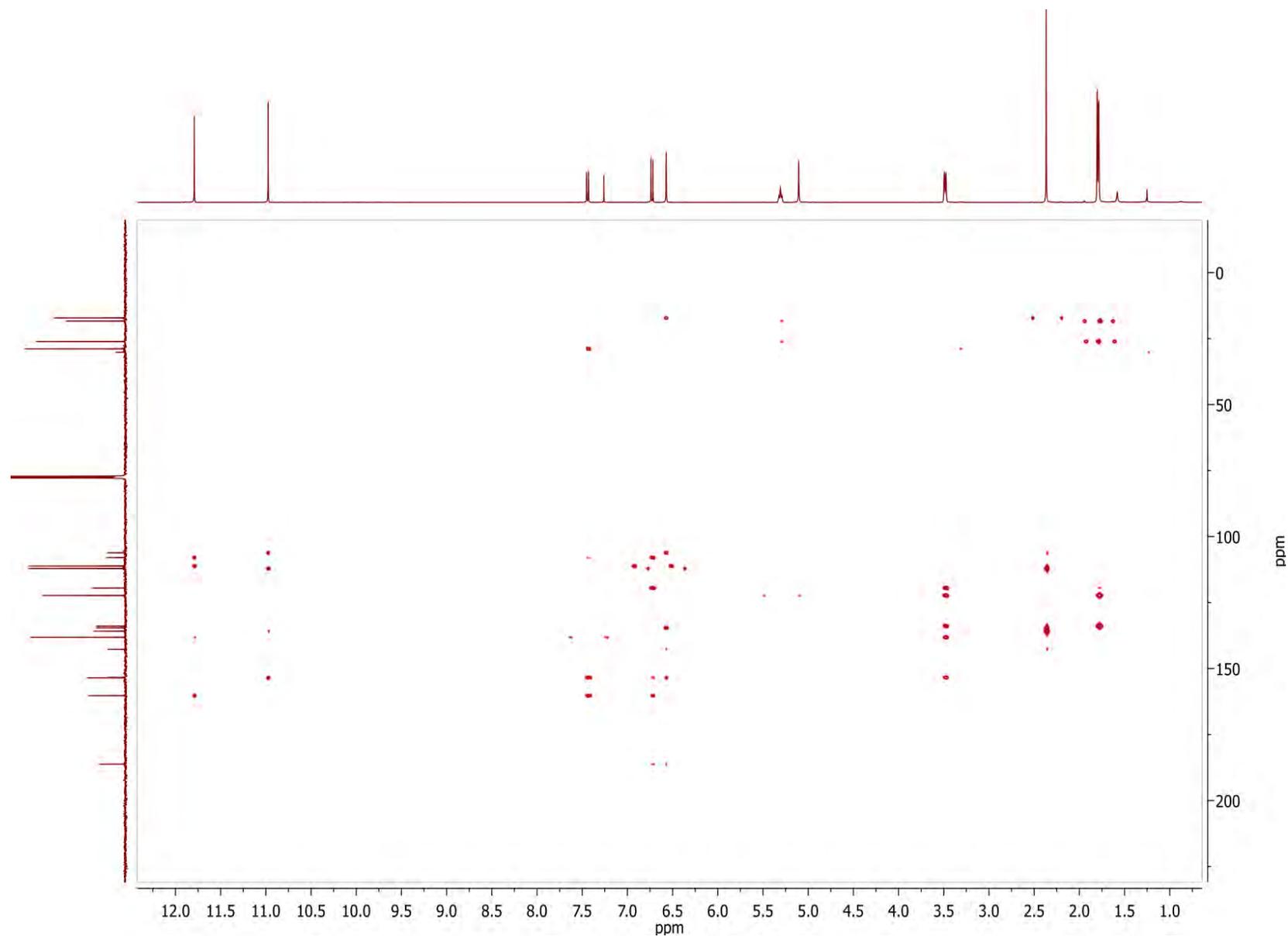


Figura 9. Espectro HMBC del compuesto 59.

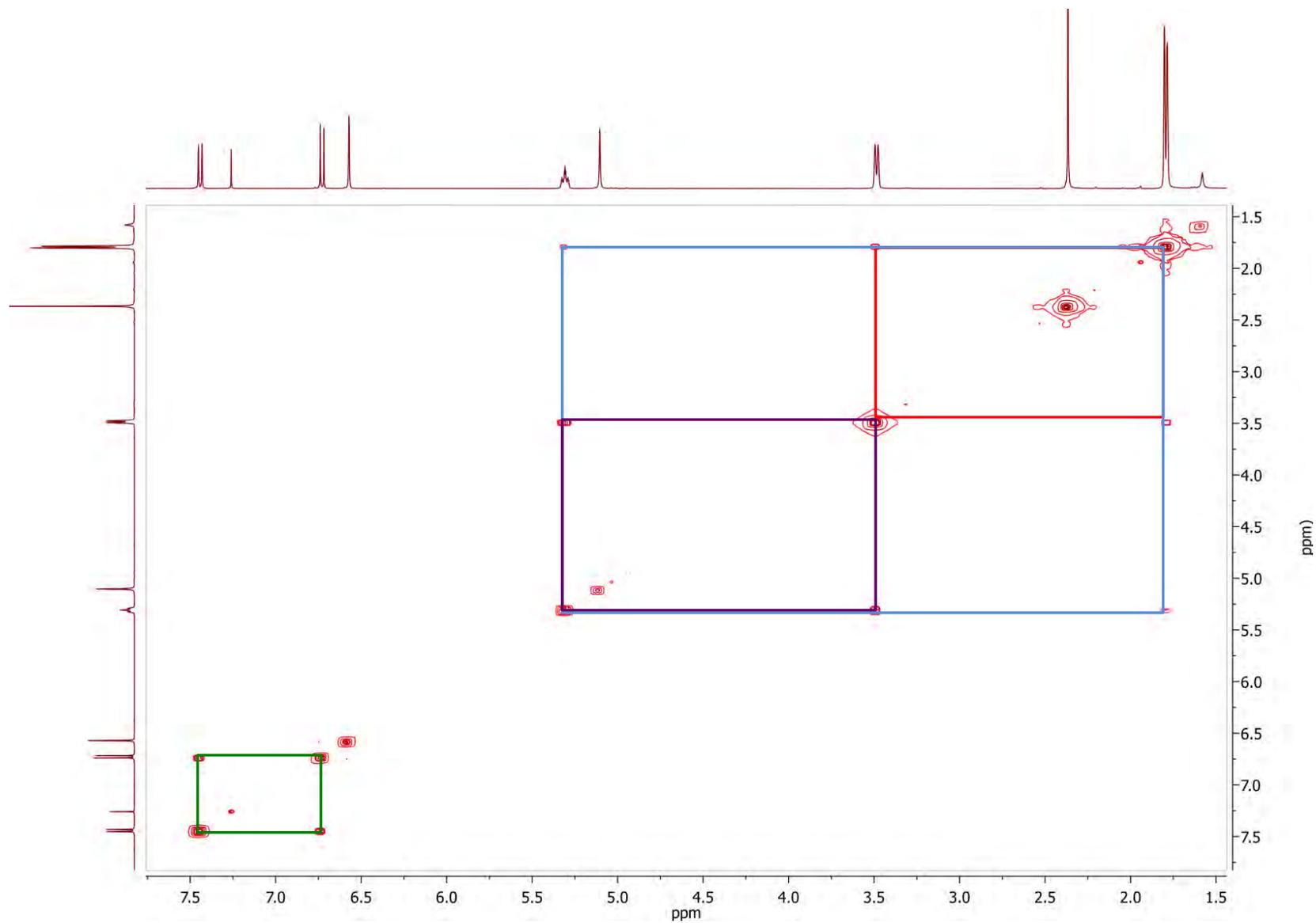


Figura 10. Espectro COSY del compuesto **59**.

El análisis de las constantes de acoplamiento de los protones aromáticos en δH 6.73 ppm (H-2, $J = 8.43$ MHz) y δH 7.44 ppm (H-3, $J = 8.42$ MHz), sugirieron un arreglo *orto* en anillo aromático; además las intensas correlaciones observadas en el HMBC para el protón en H-3 con C-1, C-2, C-4, C-4a y C-1', determinaron el arreglo del anillo C de la xantona (**59**). Adicionalmente, el desplazamiento químico de C-1 indicaba la presencia de un hidroxilo quelatado (OH-1, δH 11.79 ppm), corroborado por las correlaciones en HMBC con C-9a, C-1 y C-2 (**Figura 11**).

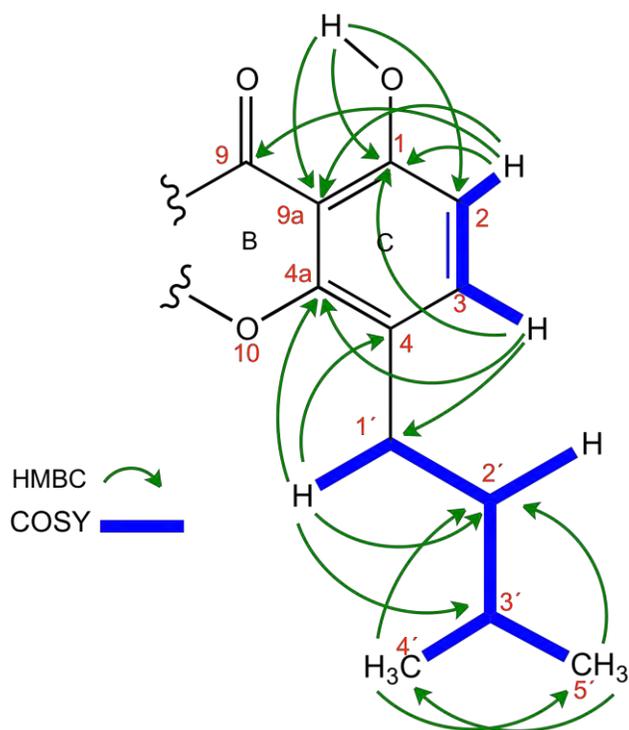


Figura 11. Correlaciones HMBC y COSY selectas del anillo B y C del compuesto **59**.

Por otro lado, el anillo A de la xantona se estableció mediante las correlaciones observadas entre H-7 (δH 6.57 ppm), C-6, C-8 y C-8a; así como el protón del hidroxilo en C-8 (δH 10.97 ppm) con C-5, C-7 y C-8a. Adicionalmente, la correlación del metilo (C-11, δC 16.7 ppm) con C-5, C-6 y C-7, suponían la posición del metilo sobre C-6 del anillo A. Por último, las correlaciones observadas para H-7 con la cetona (C-9), C-8a y C-10a del anillo B, completaban la

caracterización del compuesto 1,4,8-trihidroxi-3-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)-9H-xanten-9-ona (**Figura 12**).

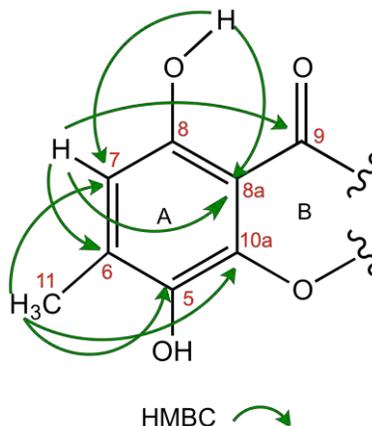
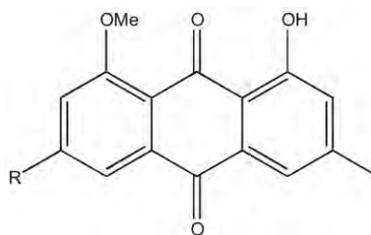


Figura 12. Correlaciones HMBC selectas del anillo A y B del compuesto **59**.

7.1.2 Caracterización estructural de la antraquinona glicosilada (**60**)

El compuesto **60** se aisló como un sólido color naranja, su fórmula molecular se estableció mediante espectrometría de masas [EM-HR-ESI] como $C_{24}H_{22}O_{11}$, con un grado de insaturación igual catorce. El espectro de IR (**Figura A2**) mostró bandas de absorción en $\approx 3500, 1740, 1200, 1670\text{ cm}^{-1}$, características de grupos hidroxilo, carbonilo de acetato, hidroxilo sobre un anillo aromático y cetona de antraquinona. De acuerdo a los espectros de RMN (^1H y ^{13}C ; **Figuras 13 y 14**) [**Tabla 13**], el compuesto **60** resultó un análogo de la 3-O-(α -D-ribofuranosil)-questina (**62**) aislada del hongo endófito *Eurotium rubrum* con la diferencia de la acetilación del azúcar y la carencia del metoxilo en la posición C-8 (Li et al. 2009).

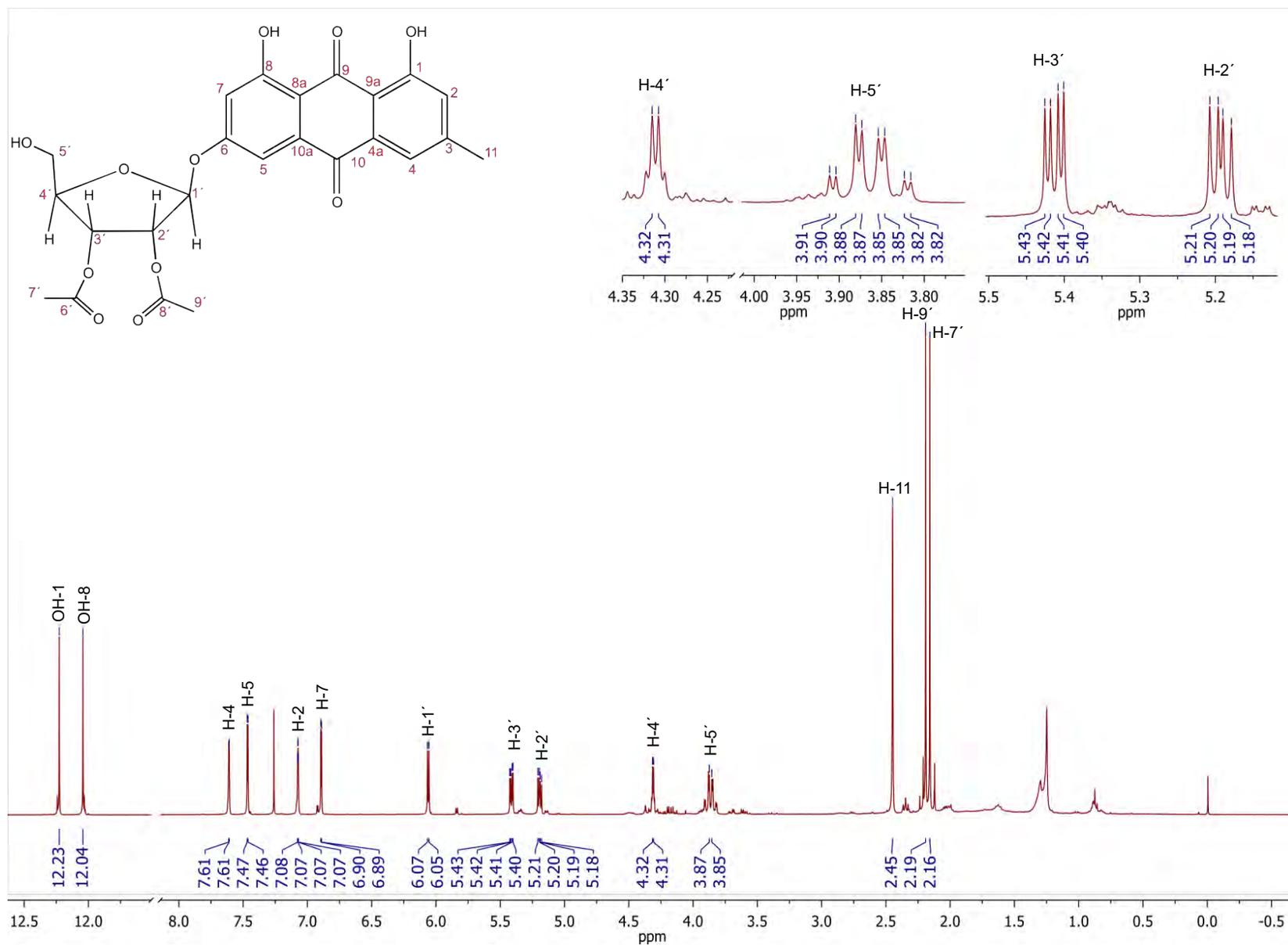


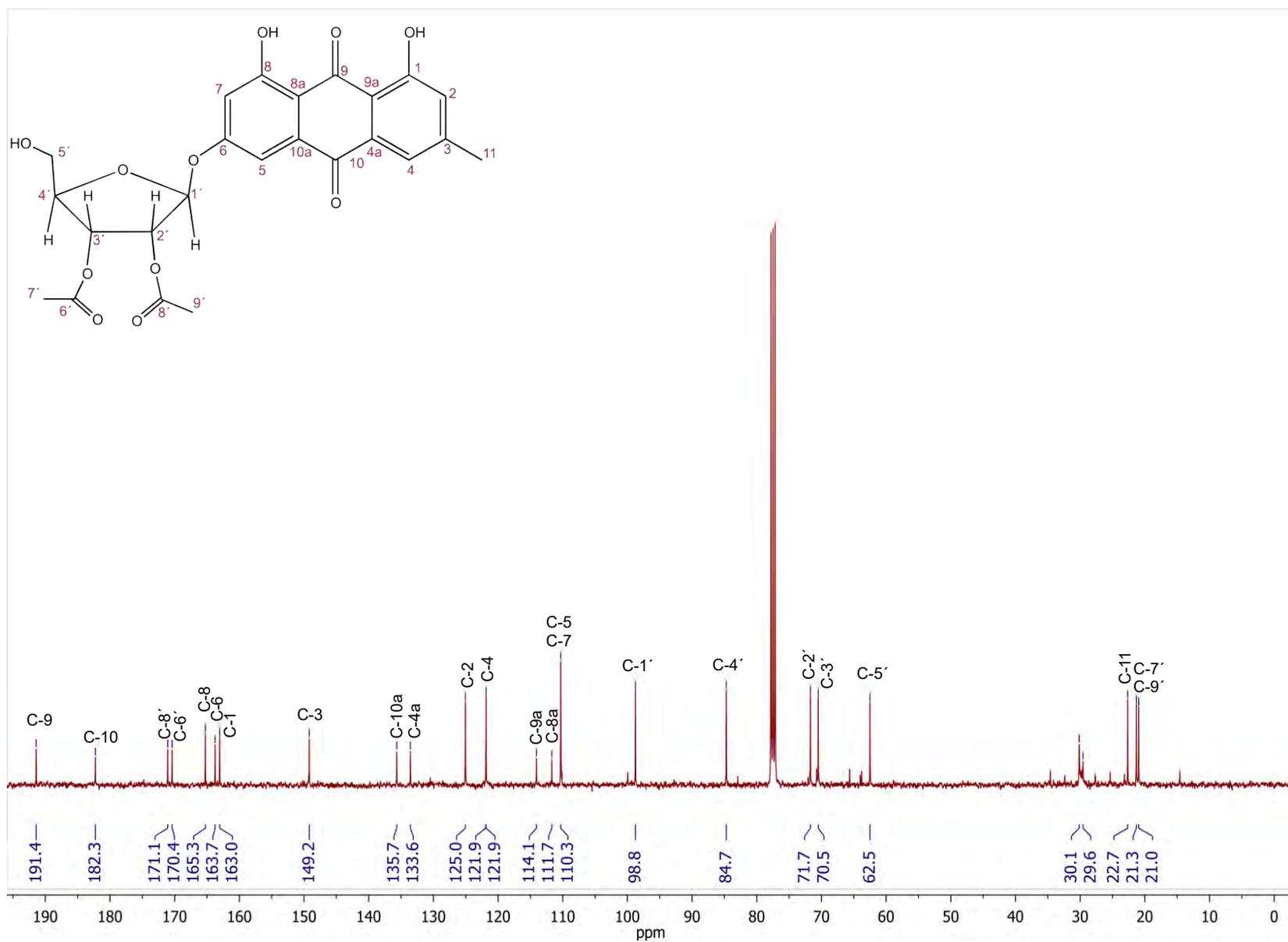
R= α -D-ribofuranosil

62

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C para **60** (CDCl₃, ¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz).

Posición	δ C	δ H (mult, J en [Hz])	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	COSY
1	163.0			
2	125.0	7.08 (dd, 0.94, 1.77)	1, 4, 9a	
3	149.2			
4	121.9	7.62 (dd, 0.70, 1.72)	2, 9a, 10	
4a	133.6		11	
5	110.3	7.47 (d, 2.47)	6, 7, 8a, 10, 10a	2, 7
6	163.7			
7	110.3	6.9 (d, 2.46)	5, 6, 8, 8a	
8	165.3			
8a	111.7			
9	191.4			
9a	114.1			
10	182.3			
10a	135.7			
11	22.7	2.45 (s)	2, 3, 4, 9a	
1'	98.8	6.07 (d, 4.49)	6, 3', 4'	2'
2'	71.7	5.2 (dd, 4.45, 7.0)	3'	1'
3'	70.5	5.42 (dd, 2.97, 7.0)	1', 4', 5'	2', 4'
4'	84.7	4.32 (q, 2.96, 2.96, 2.94)	3', 5'	5'
5'	62.5	3.87 (qd, 2.99, 12.24, 12.23, 12.23)	3', 4'	
6'	171.1			
7'	21.0	3.08 (s)	8'	
8'	170.4			
9'	21.3	2.16 (s)	6'	
OH-1		12.05 (s)	2, 3, 6, 9a	
OH-8		12.23 (s)	1, 5, 7, 8, 8a	

Figura 13. Espectro RMN- ^1H del compuesto **60**.

Figura 14. Espectro RMN- ^{13}C del compuesto 60.

En el espectro de RMN-¹H (100 MHz, CDCl₃, **Figura 13**) se observaron señales para 22 protones, que incluían 4 aromáticos (δ H 6.9 – 7.62 ppm), 2 hidroxilos quelatados (δ H 12.23 y 12.05 ppm) y un metilo sobre anillo aromático (δ H 2.45 ppm); adicionalmente se observaron señales para un residuo de azúcar (δ H 4.3 – 6.0 ppm). Por otra parte, en el espectro de carbono se observaron 24 señales, en donde el núcleo antraquinona se evidenció por la presencia de dos carbonilos con desplazamientos característicos (δ C 191.4 y 182.3 ppm). Las señales para el residuo de azúcar correspondían a una ribofuranosa, la cual presentaba acetilaciones en los carbonos C-2' y C-3'.

La caracterización del residuo de azúcar se llevó a cabo principalmente mediante el análisis de los espectros HMBC y COSY (**Figuras 16 y 17**). La configuración del C-1' se determinó como α -D-ribofuranosa con base en la constante de acoplamiento observada entre H-1' y H-2' ($J^3 = 4.45$ Hz), ya que valores de $J^3_{H-1',H-2} \approx 1.2$ Hz indican una configuración β , mientras que valores cercanos a 4.5 Hz indican la configuración contraria (Du et al. 2014). La configuración de los carbonos adyacentes se estableció analizando sus constantes de acoplamiento: para el H-2' y H-3' se observó una $J^3_{C-2',C-3} = 7.0$ Hz típica de un arreglo axial, mientras para H-3' y H-4' la constante fue menor a 3 Hz indicando un arreglo ecuatorial; esto se corroboró con las correlaciones en el los espectros COSY y NOESY (**Figuras 15, 18, y 19**). Cabe destacar que las señales de H-2' y H-3' se encontraban desplazadas a campo bajo, indicando un apantallamiento producto de la presencia de grupos acetato sobre C-2' y C-3', confirmado por las correlaciones observadas en el HMBC entre C-8'/H-2' y C-6'/H-3.

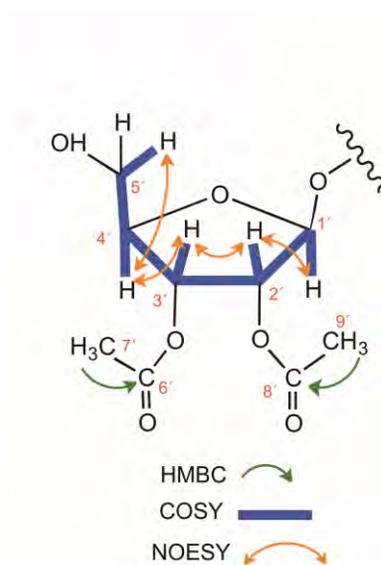


Figura 15. Correlaciones observadas para el residuo de azúcar de **60**.

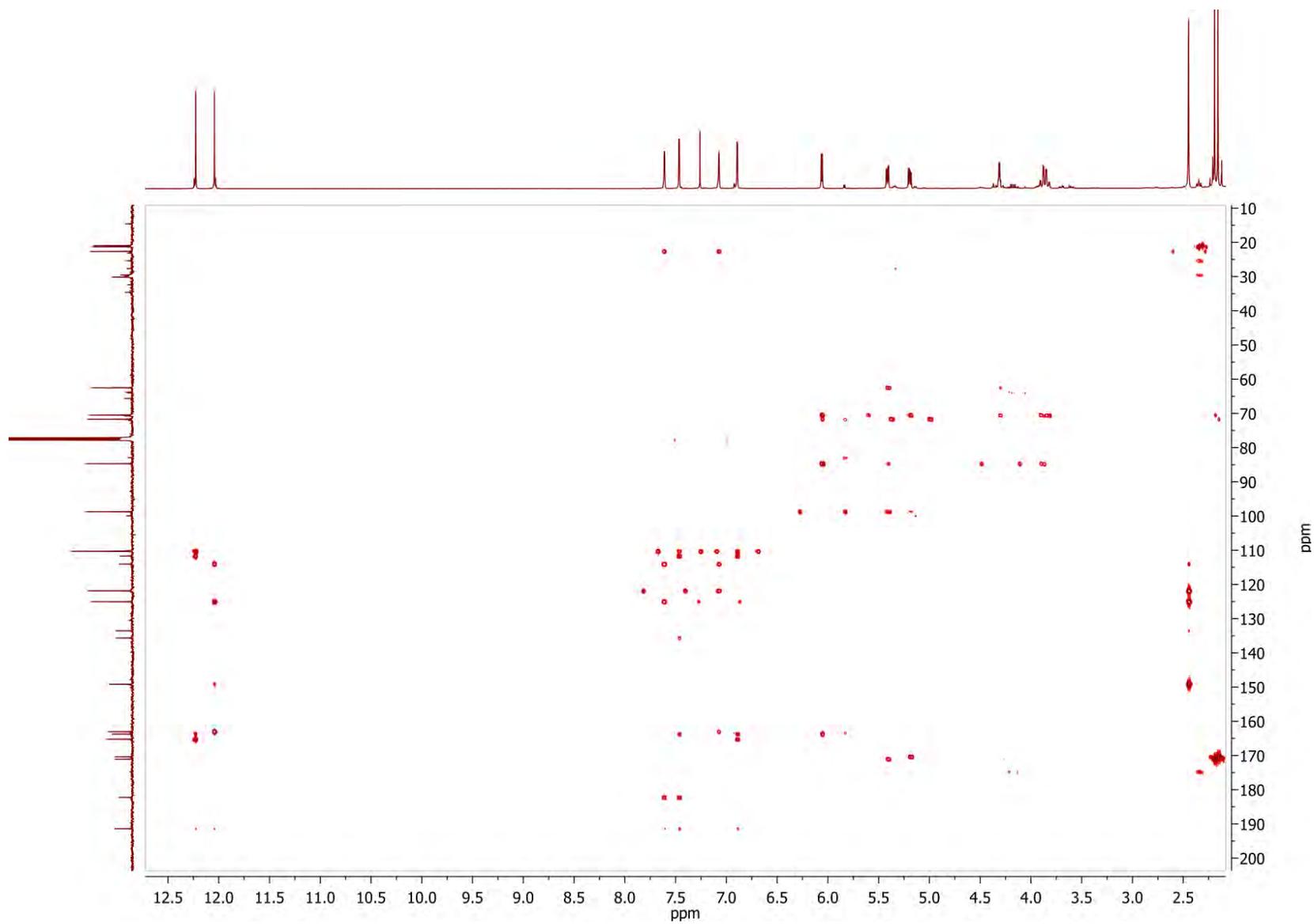


Figura 16. Espectro HMBC del compuesto 60.

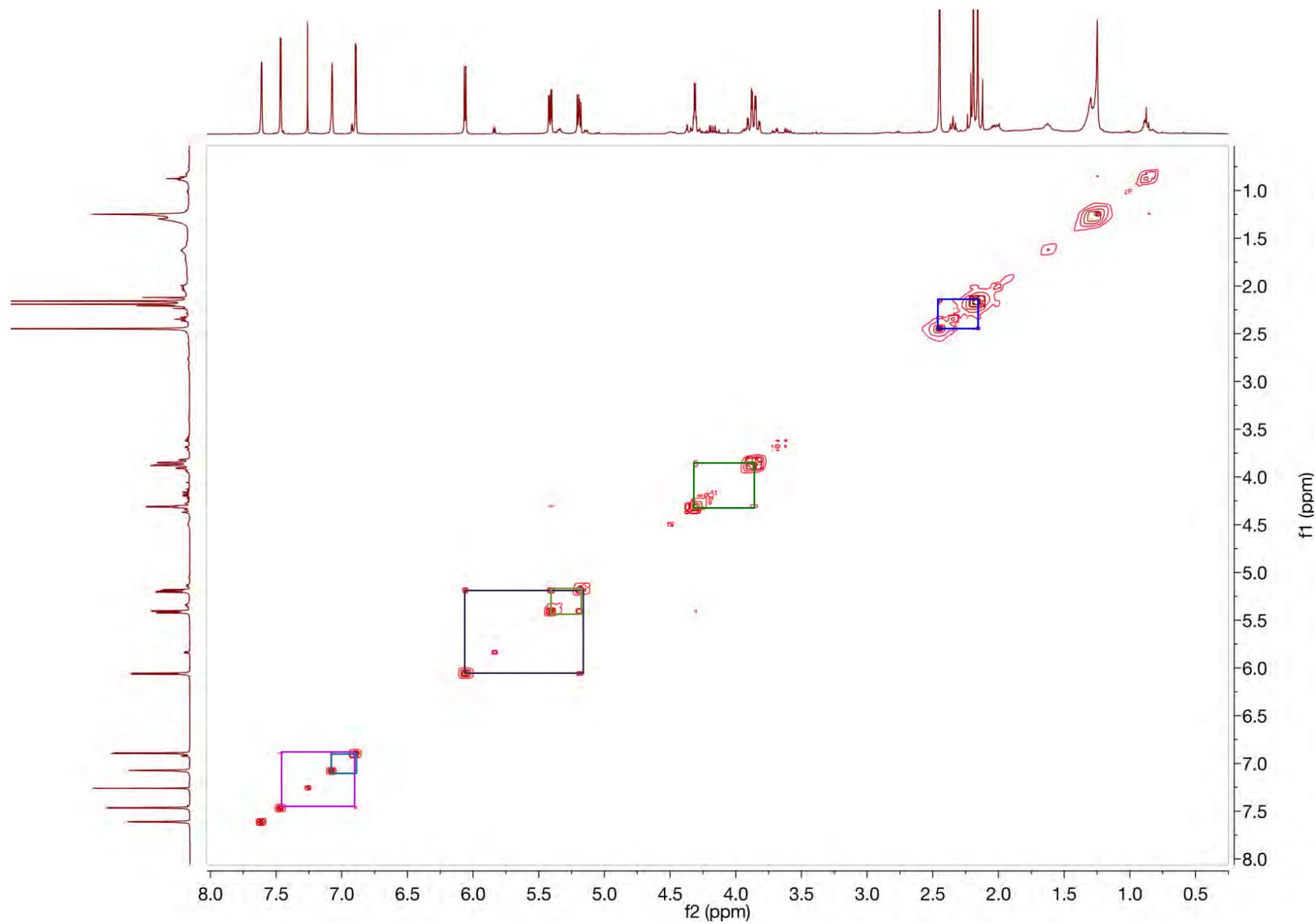


Figura 17. Espectro COSY del compuesto 60.

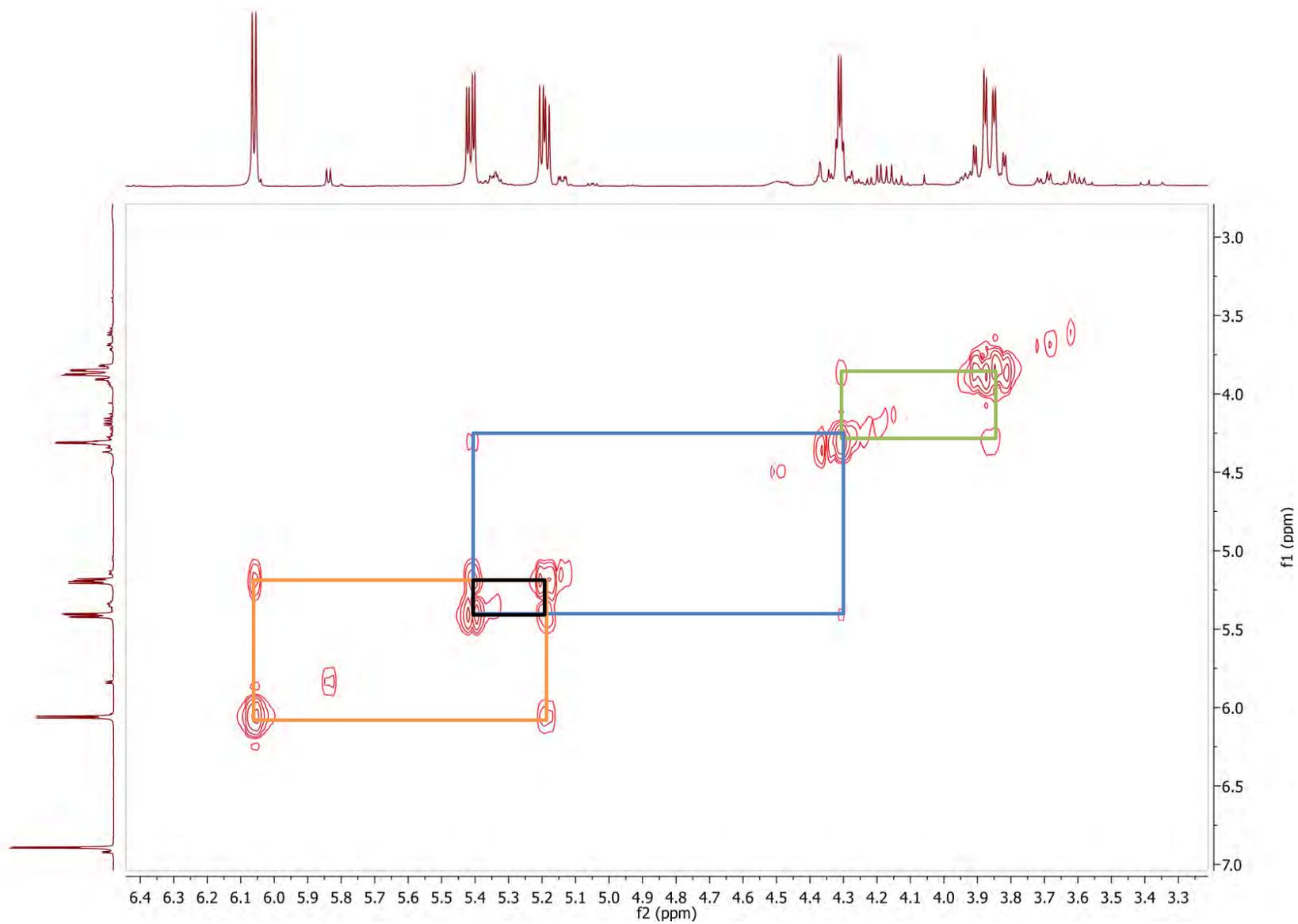


Figura 18. Espectro COSY, correlaciones del residuo de azúcar.

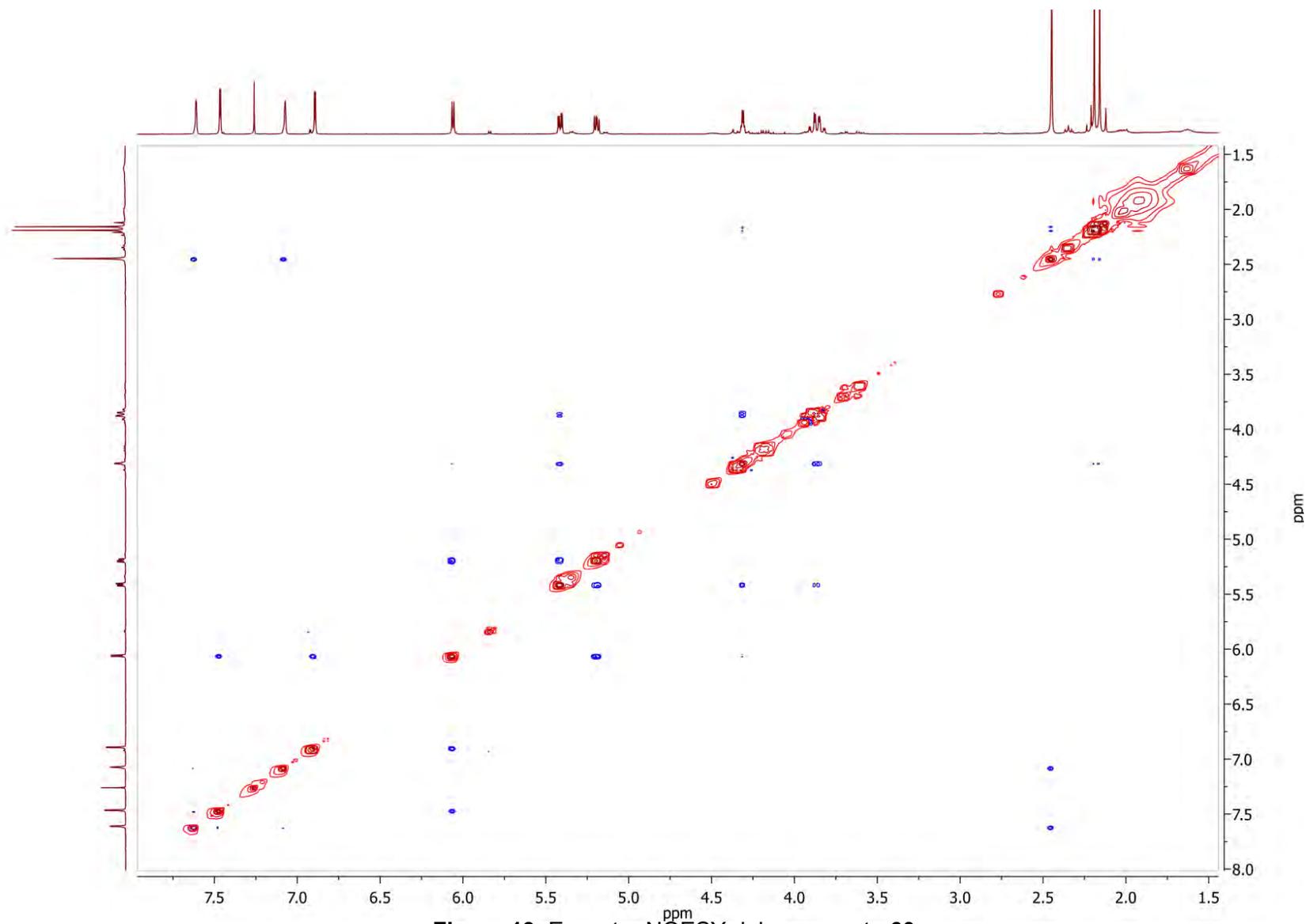


Figura 19. Espectro NOESY del compuesto 60.

La conexión del residuo de azúcar con núcleo antraquinona se determinó mediante las correlaciones observadas H-1'/C-6 así como la correlación homonuclear H-1' y H-5 (**Figura 20**).

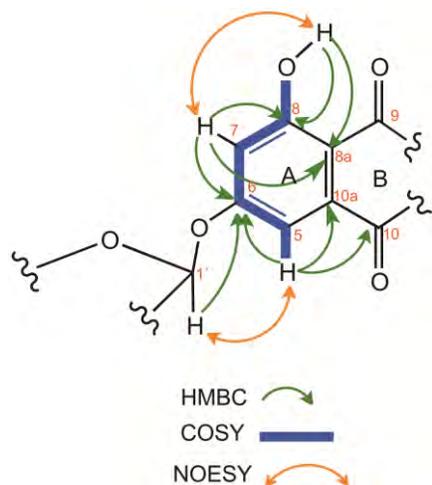


Figura 20. Correlaciones anillo A con C-1' del compuesto **60**.

El análisis de las constantes de acoplamiento entre H-5 y H-7 permitió establecer la sustitución del anillo A, sugiriendo un arreglo *meta* ($J^4_{H-5,H-7} = 2.46$ Hz) corroborado por sus correlaciones en el experimento COSY. La posición del hidroxilo quelatado (δ_H 12.23 ppm) se asignó con base en las interacciones observadas entre OH-8/C-8/C-8a y OH-8/H-7 (**Figura 20**).

De la misma manera, el anillo C presenta un arreglo *meta* ($J^4_{H-2,H-4} = 1.77$ Hz), sustituido por un grupo metilo (δ_C 22.7 ppm) en la posición C-3, como lo sugieren las correlaciones en el HMBC CH₃-11/C-2/C-3/C-4. Por último, la presencia de un hidroxilo quelatado (δ_H 12.05 ppm) en C-1, se evidenció con las interacciones entre OH-1/C-1/C-2/C-3/C-9a (**Figura 21**).

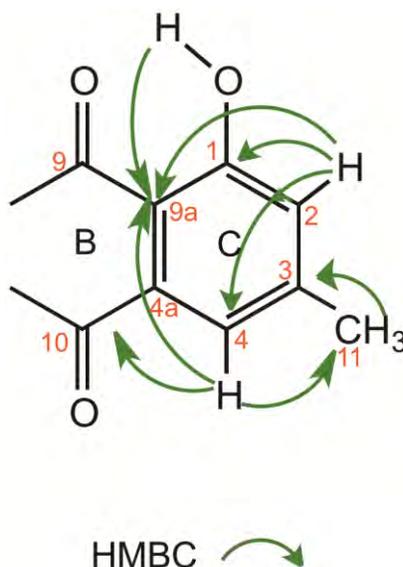


Figura 21. Correlaciones HMBC del anillo C y B del compuesto **60**.

7.2 Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas

Para la determinación de la actividad biológica, se utilizó un ensayo espectrofotométrico que se describió en el apartado **6.6.1** de la *Parte Experimental*. Esta determinación se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del sustrato *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) en presencia de la enzima α -glucosidasa. La actividad enzimática es directamente proporcional a la cantidad de *p*-nitrofenol libre generado durante la reacción del sustrato con los compuestos de prueba (Oki et al. 1999) (**Figura 22**).

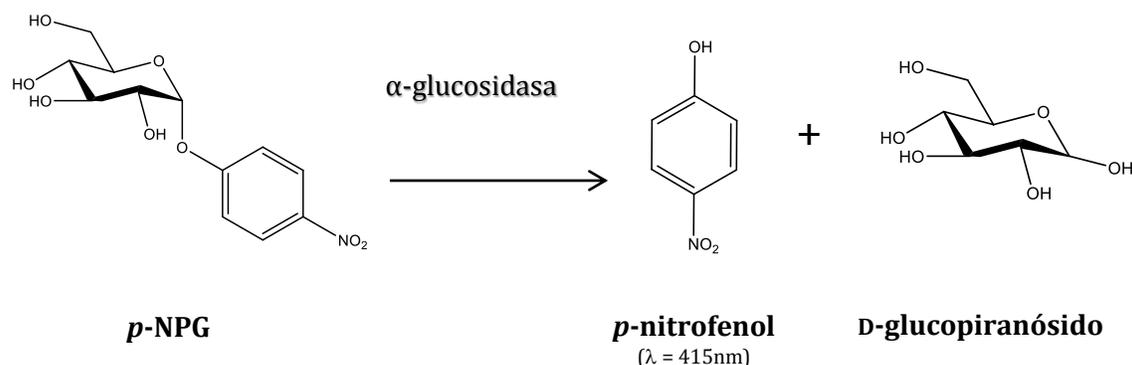


Figura 22. Reacción enzimática llevada a cabo en el experimento de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

7.2.1 Evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos **59** y **60** aislados, sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de intestino delgado de rata

Los resultados de este experimento indicaron que los compuestos **59** y **60** inhiben la actividad de la enzima de manera dependiente de la concentración (**Figuras 6** y **7**), alcanzando cerca de un 80% de inhibición, con valores de CI_{50} que se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 14. Evaluación del potencial inhibitorio de las enzimas α -glucosidasas (rata).

Compuesto	CI_{50} (μ M)	% Inhibición	R^2
59	1186.14 \pm 18.41	78.22 \pm 5.86	0.9939
60	466.72 \pm 13.21	93.30 \pm 9.29	0.9901
Acarbosa*	361.79 \pm 64.55	72.11 \pm 4.28	0.9962

* Inhibidor de las enzimas α -glucosidasas empleado como control positivo.

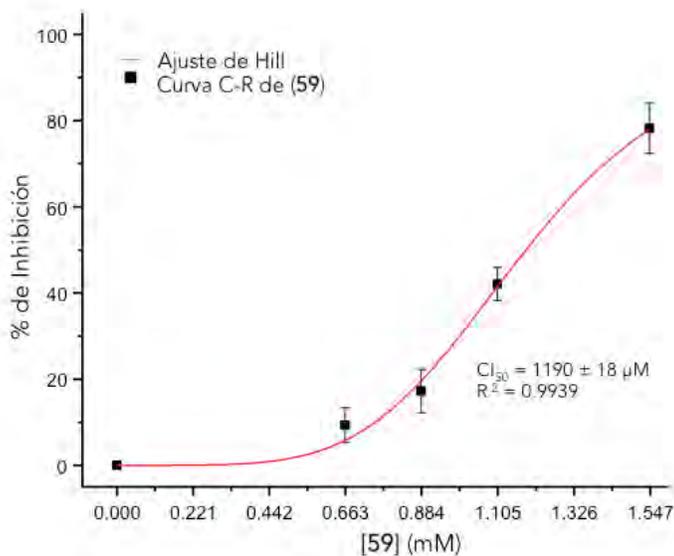


Figura 23. Curva de inhibición de **59** sobre las enzimas α -glucosidasas de intestino delgado de rata.

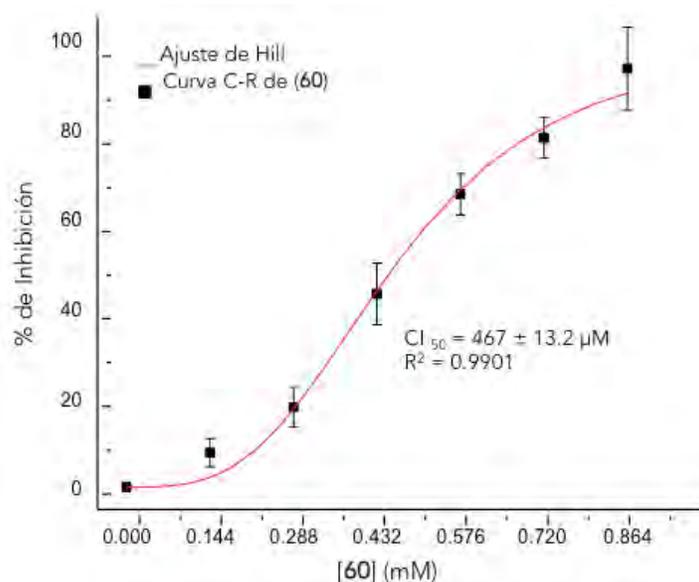


Figura 24. Curva de inhibición de **60** sobre enzimas α -glucosidasas de intestino delgado de rata.

7.2.2 Evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos **59** y **60** aislados, sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los compuestos **59** y **60** fueron evaluados también con enzima α -glucosidasa de levadura (tipo I) la cual hidroliza sustratos heterogéneos como *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido. Los resultados de CI_{50} que se observan en la **Tabla 13**, demuestran un efecto concentración dependiente.

Tabla 15. Evaluación del potencial inhibitorio de las enzimas α -glucosidasas (*S. cerevisiae*).

Compuesto	CI_{50} (μ M)	% Inhibición	R^2
59	15.61 \pm 1.55	99.17 \pm 0.26	0.9657
60	40.9 \pm 2.34	99.65 \pm 0.48	0.9902
Acarbosa	501.03 \pm 13.7	93.05 \pm 0.37	0.9978

Como se observa en la **Tabla 15**, tanto la xantona como la antraquinona fueron más potentes que la acarbosa, cerca de 33 y 13 veces más activas, respectivamente (**Figura 8**). Algunos autores han reportado compuestos de tipo xantona con actividad inhibitoria de la α GHY. Por ejemplo, de un estudio reciente

realizado a la planta *Garcinia nobilis* se aislaron siete xantonas preniladas, de las cuales algunas mostraron inhibición moderada sobre la enzima α GHY, siendo las más activas la 8-hidroxidudraxantona G (**61**) y la morusignina I (**62**), con una CI_{50} de 76 y 84 μ M respectivamente (Fouotsa et al. 2012).

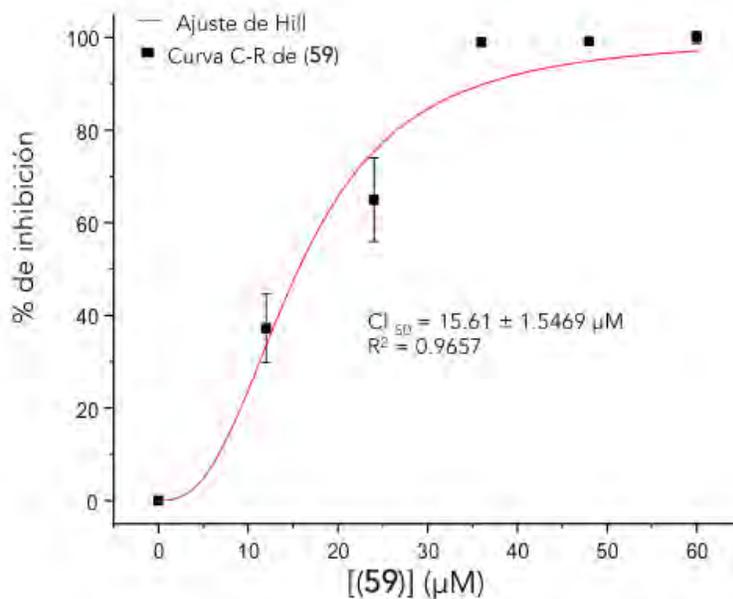
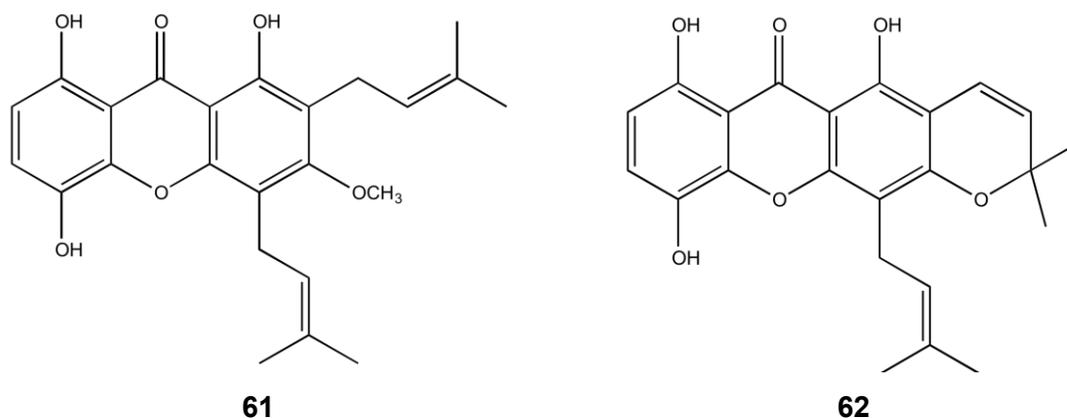


Figura 25. Curva de inhibición de (**59**) sobre enzima α -glucosidasa de levadura.

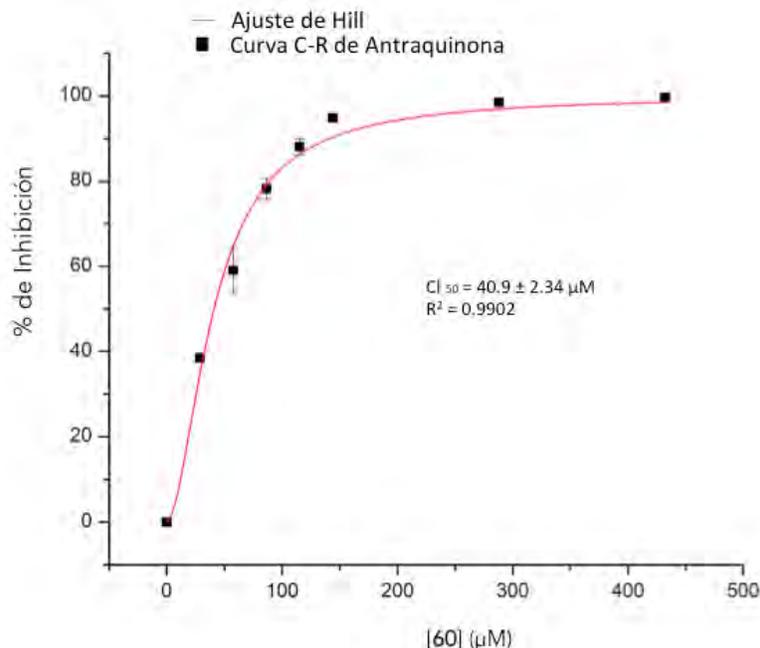
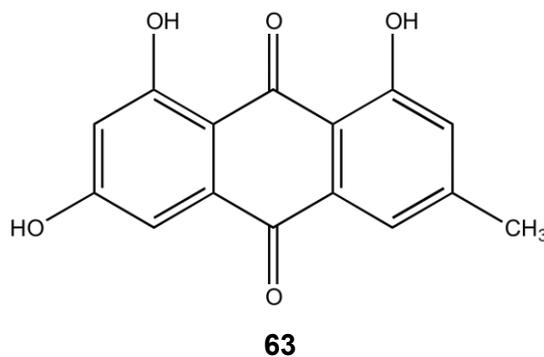


Figura 21. Curva de inhibición de (60) sobre enzima α -glucosidasa de levadura.

Respecto a las antraquinonas, se han descrito algunos estudios de actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas; por ejemplo aquellas aisladas de la especie vegetal *Rheum emodi*, de las cuales la más potente fue la emodina (63) con una CI_{50} de 30 μ g/mL alcanzando un % de inhibición del 93 % (Arvindekar et al. 2015).



Hasta este punto se han mostrado los resultados de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas tanto de intestino delgado de rata como de *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe destacar que la actividad de los productos en ambos ensayos fue distinta, obteniendo una menor inhibición para las enzimas α -

glucosidasas de intestino delgado de rata. Este resultado puede explicarse en términos del contenido enzimático; mientras que en el ensayo de raspado intestinal de rata se tiene un pool enzimático, es decir, enzimas con diferentes actividades glicosidasa hidrolasa (maltasa, isomaltasa, sacarasa y amilasa, entre otras); en el ensayo de inhibición de la enzima α GHY se tiene una sola enzima GH con actividad sacarasa. Así, la actividad observada para el ensayo de raspado intestinal estaría dando cuenta para la inhibición de diferentes enzimas a la vez, con lo que la actividad se ve disminuida, reflejado en el porcentaje de inhibición. Por otro lado, en el caso de la acarbosa, no se observa especificidad por alguna de las enzimas, ya que la CI_{50} en ambos casos, se encuentra en el mismo orden de actividad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Jones y colaboradores, en donde la acarbosa exhibe una amplia afinidad por enzimas α -glucosidasas (por ejemplo, la α -amilasa), lo que conlleva al uso de altas dosis para alcanzar la actividad inhibitoria resultando en efectos secundarios no deseados, tales como complicaciones gastrointestinales (Jones et al. 2011).

8. Conclusiones

El fraccionamiento biodirigido del EO de la especie *Malbranchea circinata* condujo al aislamiento y caracterización de dos compuestos novedosos, la 1,4,8-trihidroxi-3-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)-9H-xanten-9-ona (**59**) y 2-((4,5-dihidroxi-7-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidroantracén-2-il)oxi)-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3,4-diil diacetato (**60**).

Ambos metabolitos se comportan en un ensayo *in vitro* como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas de intestino delgado de rata y *Saccharomyces cerevisiae*, siendo más activos contra la enzima de levadura alrededor de 30 veces más potentes que la acarbosa. Dichos resultados podrían sugerir una actividad antihiper glucemiante, útil en el tratamiento de la DM2.

Los resultados presentados en el presente proyecto de investigación representan el primer estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea circinata*, contribuyendo al conocimiento químico del género *Malbranchea*, estudiado por su importancia en el descubrimiento de metabolitos bioactivos.

9. Perspectivas

- Llevar a cabo evaluaciones *in vivo* con los compuestos **59** y **60** para comprobar su efecto potencial como agentes antihiper glucémicos en una curva de tolerancia a la sacarosa.
- Realizar estudios de cinética enzimática con los metabolitos **59** y **60** con la finalidad de establecer los parámetros cinéticos de inhibición.
- Realizar estudios *in silico* de acoplamiento molecular de los compuestos aislados con las enzimas alfa-glucosidasas (de diferentes sustratos y actividades) con el objetivo de proponer un sitio de unión a la enzima.
- Estudiar las fracciones activas Fx XI y Fx XV para la búsqueda de otros compuestos con posible actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas y realizar las evaluaciones *in vitro* y/o *in vivo* pertinentes.

10. Bibliografía

- Ahirwar, S., Soni, H., Rawat, H. K., Ganaie, M. A., Pranaw, K., & Kango, N. (2016) Production optimization and functional characterization of thermostable β -mannanase from *Malbranchea cinnamomea* NFCCI 3724 and its applicability in mannotetraose (M4) generation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 0, pp.1–10.
- Akana, D.W., Osoe, T.H. & Tabashi, T.I., (2008) Two new furanone glycosides , malfilamentosides A and B , from *Malbranchea filamentosa*. , 58(1), pp.1–6.
- Arvindekar, A., T. More., Payghan P., Laddha, K., Ghoshal, N., Arvindekar, A., (2015). Evaluation of anti-diabetic and alpha glucosidase inhibitory action of anthraquinones from *Rheum emodi*. *Food & function*, 6(8), pp.2693–700.
- Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A. & Carvalho, I. (2006) α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62(44), pp.10277–10302.
- Chiung, Y. M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., Chen, G. Y., Chen, Z. C., & Nakayama, M. (1993) A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *The Journal of antibiotics*, 46(12), pp.1819–26.
- Choudhary, M. I., Shah, S. A. A., Atta-Ur-Rahman, Khan, S. N., & Khan, M. T. H. (2010) Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from fungal hydroxylation of tibolone and hydroxytibolones. *Steroids*, 75(12), pp.956–966.
- Du, F.Y., Li, X.M., Song, J.Y., Li, C.S., Wang, B.G., (2014). Anthraquinone derivatives and an orsellinic acid ester from the marine alga-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Helvetica Chimica Acta*, 97(7), pp.973–978.
- El Kaissi, S. & Sherbeeni, S. (2011) Pharmacological management of type 2 diabetes mellitus: an update. *Current diabetes reviews*, 7(6), pp.392–405.
- Figuroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Río-Portilla, F., González, M. D. C., & Mata, R. (2011) Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with

- calmodulin. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 26(3), pp.378–385.
- Figuroa, M., Del Maria, C.G. & Mata, R. (2008.) Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Natural Product Research*, 22(8), pp.709–714.
- Fouotsa, Meli, A., Djama, C., Rasheed, S., Marasini B.P., Ali, Z., Prasad, K., Ephrem, A., Shaheen, F., Iqbal, M., Sewald, N. (2012). Xanthones inhibitors of α -glucosidase and glycation from *Garcinia nobilis*. *Phytochemistry Letters*, 5(2), pp.236–239.
- González-Andrade, M., Mata, R., Madariaga-Mazón, A., Rodríguez-Sotres, R., Del Pozo-Yauner, L., & Sosa-Peinado, A. (2013). Importance of the interaction protein-protein of the CaM-PDE1A and CaM-MLCK complexes in the development of new anti-CaM drugs. *Journal of molecular recognition : JMR*, 26(4), pp.165–74.
- Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S. I., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., ... Kawai, K. I. (2005). 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry*, 66(23), pp.2776–2779.
- Israili, Z.H. (2011). Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American journal of therapeutics*, 18(2), pp.117–152.
- Jones, K., Sim, L., Mohan, S., Kumarasamy, J., Liu, H., Avery, S., Naim, H.Y., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B.L., Pinto, B.M., Rose, D.R. (2011). Mapping the intestinal α -glucosidase enzyme specificities of starch digesting maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(13), pp.3929–34.
- Kim, J. H., Kim, H. J., Park, H. W., Youn, S. H., Choi, D. Y., & Shin, C. S (2007). Development of inhibitors against lipase and α -glucosidase from derivatives of monascus pigment. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), pp.93–98.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O., (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), pp.19–29.
- Li, D.-L., Li, X.-M. & Wang, B.-G. (2009). Natural anthraquinone derivatives from a marine mangrove plant-derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*: structural elucidation and DPPH radical scavenging activity. *Journal of microbiology and biotechnology*,

- 19(7), pp.675–80.
- Liu, Y., Xia, G., Ma, L., Ding, B., Lu, Y., He, L., Xia, X., She, Z. (2014). Vermistatin Derivatives with α -Glucosidase Inhibitory Activity from the Mangrove Endophytic Fungus *Penicillium* sp. *HN29-3B1*. *Planta Medica*, 80(10), pp.912–917.
- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., & Mata, R. (2015). Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), pp.551–558.
- Mahajan, C., Basotra, N., Singh, S., Di Falco, M., Tsang, A., & Chadha, B. S. (2016). *Malbranchea cinnamomea*: A thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. *Bioresource Technology*, 200, pp.55–63.
- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M. C., Lira-Rocha, A., & Mata, R. (2006). Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron*, 62(8), pp.1817–1822.
- Martínez-Luis, S., González, M. C., Ulloa, M., & Mata, R. (2005). Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry*, 66(9), pp.1012–6.
- Moorthy, N., J. Ramos, M. & A. Fernandes, P. (2012). Studies on α -Glucosidase Inhibitors Development: Magic Molecules for the Treatment of Carbohydrate Mediated Diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), pp.713–720.
- Nakai, H., Okuyama, M., Kim, Y., Saburi, W., Wongchawalit, J., Mori, H., Chiba, S., Kimura, A. (2005). Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia, Bratislava*, 60, pp.131–135.
- Oki, T., Matsui, T. & Osajima, Y., (1999). Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), pp.550–3.
- Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., Del Carmen González, M., Glenn, A. E., & Mata, R. (2013). Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, 94, pp.198–205.

-
- Rivera-Chávez, J., Figueroa, M., González, M. D. C., Glenn, A. E., & Mata, R. (2015). α -Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* Associated with *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*, 78(4), pp.730–735.
- Saito, M., Matsuura, I. & Okazaki, H., (1979). Tf-26Vx, an antibiotic produced by a thermophilic fungus. *The Journal of antibiotics*, 32(11), pp.1210–2.
- Schlegel, B., Hanel, F. & Gollmick, F.A., (2003). New Quinones and Hydroquinones from *Malbranchea*. *The Journal of antibiotics*, , 56(11), pp.917–922.
- Sharma, M., Chadha, B.S. & Saini, H.S., (2010). Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. *Bioresource Technology*, 101(22), pp.8834–8842.
- Tousif, M. I., Shazmeen, N., Riaz, N., Shafiq, N., Khatoon, T., Schulz, B., Ashraf, M., Shaukar, A., Hussain, H., Jabbar, A., Saleem, M. (2014). α -Glucosidase and lipoxygenase inhibitory derivatives of cryptosporiopsis from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis sp.* *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(11), pp.1068–1073.
- Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K., Yaguchi, T., Fukushima, K., Goda, Y., & Hosoe, T. (2014). Cytotoxic anthrasteroid glycosides, malsterosides A–C, from *Malbranchea filamentosa*. *The Journal of Antibiotics*, 67(8), pp.585–588.
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Okada, H., Fukushima, K., & Kawai, K. (2008). Structures of new triterpene glycosides, Malbrabcheosides A-D from *Malbranchea filamentosa*. *Heterocycles*, 75(5), pp.1109–1122.
- Wakana, D., Hosoe, T., Wachi, H., Itabashi, T., Fukushima, K., Yaguchi, T., & Kawai, K. (2009). The cytotoxic and antifungal activities of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*. *The Journal of antibiotics*, 62(4), pp.217–9.
- Wang, K., Bao, L., Qi, Q., Zhao, F., Ma, K., Pei, Y., & Liu, H. (2015). Erinacerins C-L, isoindolin-1-ones with α -glucosidase inhibitory activity from cultures of the medicinal mushroom hericium erinaceus. *Journal of Natural Products*, 78(1), pp.146–154.

- Wang, S. M., Han, J. J., Ma, K., Jin, T., Bao, L., Pei, Y. F., & Liu, H. W. (2014). New α -glucosidase inhibitors with p-terphenyl skeleton from the mushroom *Hydnellum conrescens*. *Fitoterapia*, 98, pp.149–155.
- Watts, K. R., Loveridge, S. T., Tenney, K., Media, J., Valeriote, F. A., & Crews, P. (2011). Utilizing DART mass spectrometry to pinpoint halogenated metabolites from a marine invertebrate-derived fungus. *Journal of Organic Chemistry*, 76(15), pp.6201–6208.
- WG, S., ZY, W., WW, P., LF, M., YM, Y., & ZJ, Z. (2015). α -Glucosidase Inhibitors from the Fungus *Aspergillus terreus* 3.05358. *Chemical & Biodiversity*, 12(11), pp.1718–24.
- Yang, Y. L., Liao, W. Y., Liu, W. Y., Liaw, C. C., Shen, C. N., Huang, Z. Y., & Wu, S. H. (2009). Discovery of new natural products by intact-cell mass spectrometry and LC-SPE-NMR: Malbranpyrroles, novel polyketides from thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea*. *Chemistry - A European Journal*, 15(43), pp.11573–11580.
- Zuñiga-Guajardo, S. y Rangel-Rodríguez, I. (2003). Historia de la Diabetes Mellitus y el descubrimiento de la insulina. *Diabetes hoy. Para el médico y el profesional de la salud*: 1(IV), p.p. 984-986.

11. Anexo

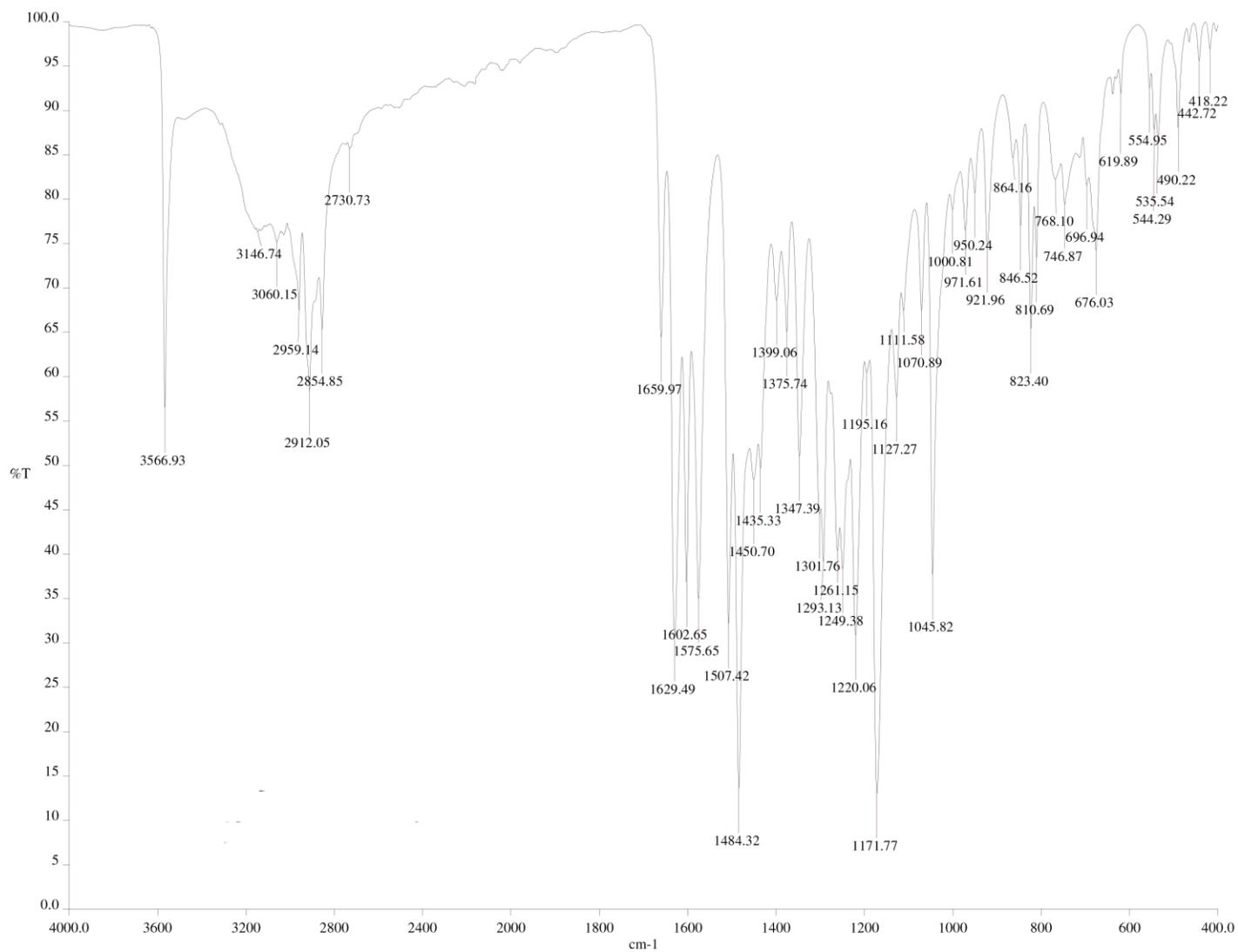


Figura A 3. Espectro IR del compuesto 59.

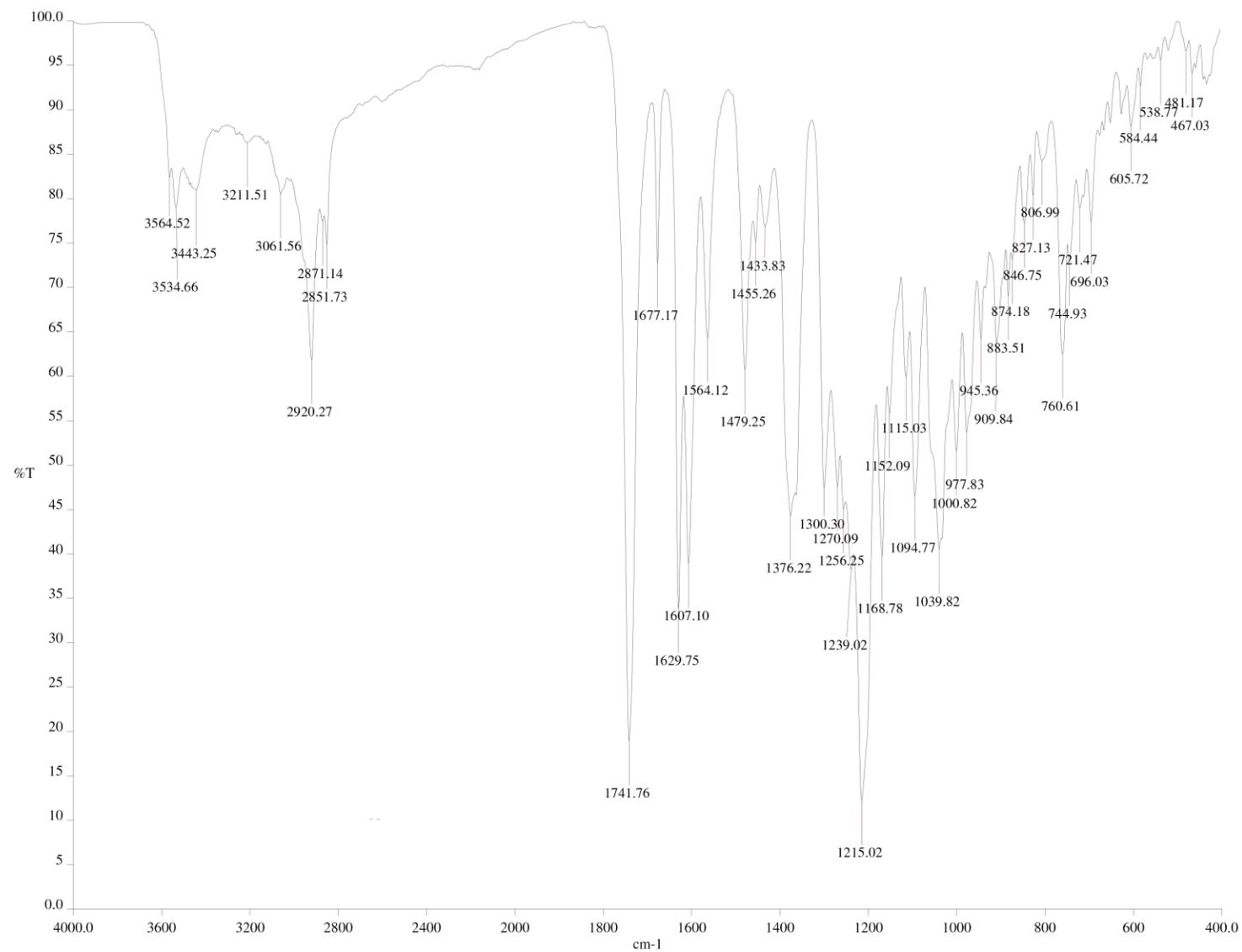


Figura A 4. Espectro IR del compuesto 60.