



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C

Posgrado en Ciencias Biológicas

“Caracterización química y variación espacio-temporal de los componentes antihemaglutinina del virus de influenza A presentes en hojas de *Caesalpinnia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm”

Tesis que presenta:

Lic. Ernesto Alfonso Canto Ramírez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, Febrero 2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Ernesto Alfonso Canto Ramírez, titulado “Caracterización química y variación espacio-temporal de los componentes antihemaglutinina presentes en hojas de *Caesalpinia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm”, fue realizado en el laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y en el Centro de investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi en el área de Química de productos naturales, bajo la dirección de la Dra. Rocío Borges Argáez, y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 29 de enero de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Ernesto Alfonso Canto Ramírez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante, la fortaleza para afrontar las dificultades y la salud para seguir con mi vida profesional.

A mis asesores de tesis: la **Dra. Roció Borges Argáez** y Dra. **Guadalupe Ayora Talavera** por todo el apoyo, paciencia, comprensión y enseñanzas que me brindaron a lo largo de estos dos años para enriquecer mi formación profesional.

A mis revisores el Dr. **Luis Sáenz Carbonell**, M.C **Pablo Sansores Peraza** y Dra. **Luisa López Ochoa** por invertir su valioso tiempo en la revisión de mi documento.

A mi familia que me ha apoyado todos los días en mi formación académica, a mi padre que me enseñó a ser perseverante y nunca rendirme, a mi madre que me enseñó a ser constante y ha estado siempre a mi lado en los momentos más difíciles y, por último, pero no menos importante, a mi hermano porque ha estado presente cuando lo necesito.

A los amigos que conocí en CICY, sin los cuales no habría podido lograr terminar este proyecto: Tania, Mary, Edder, Yuneisi, Eros, Francisco, Yahir, Williams, Nadia, Gloria e Iván por sus consejos académicos, así como personales ya que fueron un apoyo muy importante para mi durante todo este tiempo.

Al M.C y futuro Doctor **Jesús Avilés Gómez**, un gran amigo que me apoyó desde el inicio de la licenciatura hasta el final de mi posgrado con sus consejos durante todo el camino.

A mi mejor amiga y novia, la **M.C Areli Robles Romero** porque desde que nos conocimos, durante los tutoriales, ha estado presente cada vez que la necesito, me ha brindado su conocimiento y sus consejos, pero lo más importante su cariño incondicional.

A la Q.B.B. **Mirbella Cáceres Farfán** por su asesoramiento en la obtención de los perfiles cromatográficos por HPLC y por todo el apoyo que me brindó durante estos dos años, por su paciencia y por sus consejos que me ayudaron mucho en mi formación y sin ella no habría sido posible.

Al personal de posgrado que amablemente siempre me apoyó aclarando mis dudas y escuchando mis comentarios para poder realizar los procedimientos necesarios.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca No. 929225 para los estudios de maestría, así como el apoyo para el proyecto Ciencia Básica (Clave A1-S 27652) al que perteneció la tesis realizada.

Al Biólogo **Francisco Chi May** de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, por su apoyo técnico durante las colectas de especímenes vegetales en las localidades de Oxcutzcab y Yaxcabá.

Al **Biólogo Sigfredo Rebolledo**, del parque Científico localizado en Sierra Papacal por su apoyo técnico en la colecta de especímenes vegetales de Sierra Papacal

A la M.C **Fabiola Escalante Erosa** por su apoyo técnico y su asesoramiento en la obtención de los perfiles cromatográficos por CG-EM

A la Dra. **Lisette Cetina Montejo** y todos los que precedieron este trabajo, que gracias a sus aportaciones y su duro trabajo enriquecieron el contenido del presente trabajo.

Índice	<i>i</i>
Lista de Abreviaturas	<i>iii</i>
Índice de Figuras	<i>iv</i>
Índice de Cuadros	<i>v</i>
Resumen	<i>9</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE Acetonitrilo

AcOEt Acetato de etilo

ECY Extracto de *caesalpinia yucatanensis*

MS Metabolitos secundarios

CCD Cromatografía en capa delgada

CG Cromatografía de gases

CG-EM Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

CLV Cromatografía líquida al vacío

COSY Resonancia bidimensional de correlación homonuclear

HA Hemaglutinina

HAI Inhibición de la Hemaglutinina

HMBC Resonancia bidimensional de correlación heteronuclear a varios enlaces

HPLC Cromatografía líquida de alta eficiencia

HSQC Resonancia bidimensional de correlación heteronuclear a un enlace

Hx Hexano

J Constante de acoplamiento

MeOH Metanol

NA Neuraminidasa

RMN-H¹ Resonancia magnética nuclear de protón

RMN-C¹³ Resonancia magnética nuclear de carbón

Tr Tiempo de retención

INDICE

Capítulo I. Planteamiento del Trabajo

1.INTRODUCCION	3
1.1 Antecedentes General	5
1.1 Metabolitos secundarios de las plantas	5
1.1.2 Factores que afectan la producción de metabolitos secundarios en plantas	6
1.1.3 Plantas medicinales	8
1.1.4 Genero Caesalpinia	10
1.1.5 Caesalpinia yucatanensis (Britton & Rose) Greenm	11
1.1.6 Virus de la influenza	15
1.1.7 Ciclo de replicación viral	20
1.2 JUSTIFICACION	21
1.3 PREGUNTAS DEL PRESENTE ESTUDIO	22
1.4 HIPOTESIS	22
1.5 OBJETIVOS	22
1.5.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
1.7 ESTRATEGIA METODOLÓGICA.	23
CAPITULO II. COLECTA, EXTRACCIÓN Y PERFIL QUÍMICO DE EXTRACTOS DE HOJAS DE Caesalpinia yucatanensis (Britton & Rose) Greenm	
2.1 INTRODUCCION	24
2.2 MATERIALES Y METODOS	25
2.2.1 Materiales y reactivos	25
2.2.2 Colecta del material vegetal	26
2.2.3 Procesamiento del material vegetal	27
2.2.4 Fraccionamiento	27
2.2.5 Partición líquido-líquido de extracto MeOH	27
2.2.6 Análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC de las colectas de <i>C. yucatanensis</i> (extractos de ACN: MeOH)	27

2.2.7 Análisis de los perfiles cromatográficos por CG/EM de las colectas de <i>C. yucatanensis</i> (extractos Hx)	28
2.3 RESULTADOS	28
2.3.1 Rendimientos de extractos de hoja obtenidos de <i>C. yucatanensis</i> colectadas en las distintas localidades.	28
2.3.2 Condiciones ambientales de los sitios de colecta de <i>C. yucatanensis</i> en ambas épocas y en las tres localidades	31
2.3.3 Análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC de las colectas de <i>C. yucatanenses</i>	32
2.3.4 Análisis de los perfiles cromatográficos por cromatografía de gases de las colectas de <i>C. yucatanenses</i>	34
2.3.5 Compuestos identificados en los extractos hexánicos de <i>C. yucatanensis</i> durante las épocas de secas y lluvias.	37
2.4 DISCUSIÓN	40
CAPÍTULO III. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN BIODIRIGIDA DE LOS COMPONENTES CON ACTIVIDAD ANTI-HEMAGLUTININA PRESENTES EN EXTRACTOS DE HOJA DE <i>Caesalpinia yucatanensis</i> (Britton & Rose) Greenm	
3.1 INTRODUCCION	48
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.2.1 Materiales y reactivos	49
3.2.2 Colecta del material vegetal	50
3.2.3 Procesamiento del material vegetal	50
3.2.4 Fraccionamiento	50
3.2.5 Partición líquido-líquido de extracto MeOH	50
3.2.6 Fraccionamiento por CLV del extracto ACN:MeOH	51
3.2.7 Cromatografía por permeación en gel (Sephadex LH 20) de CYV-567	51
3.2.8 Cromatografía por permeación en gel (Sephadex LH 20) de la subfracción STM	52
3.2.9 Datos espectroscópicos y espectrométricos de 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona	53
3.2.10 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA)	53
3.2.11 Porcentaje de inhibición de la HA	54

3.3 RESULTADOS	54
3.3.1 Rendimientos de extractos crudos obtenidos para el aislamiento biodirigido	54
3.3.2 Evaluación de las fracciones obtenidas de la CLV de la partición de ACN	55
3.3.3 Evaluación de fracciones obtenidas de F567 por columna de permeación en gel (Sephadex LH-20)	57
3.3.4 Evaluación de la fracción CCG-4851 por columna de permeación en gel (Sephadex LH-20)	58
3.3.5 Caracterización del componente activo :5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)	59
3.4 DISCUSIÓN	63
3.4.1 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)	66
CAPÍTULO IV. MONITOREO POR ESPECTROMETRÍA DE GASES/MASAS DE LA PRESENCIA DE 5-HIDROXI-2(2-HIDROXI-3,4,5-TRIMETOXIFENIL)-7-METOXI-4H-CROMEN-4-ONA) EN EXTRACTOS DE HOJAS DE <i>Caesalpinia yucatanensis</i> (Britton & Rose) Greenm COLECTADAS EN TRES LOCALIDADES DEL ESTADO DE YUCATÁN.	
4.1 INTRODUCCION	71
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	73
4.2.1 Colecta y obtención del material vegetal	75
4.2.2 Procesamiento de las plantas	75
4.2.3 Extracción y fraccionamiento	75
4.2.4 Partición del extracto metanólico de <i>C. yucatanensis</i>	76
4.2.5 Análisis de los perfiles cromatográficos por CG/EM de las colectas de <i>C. yucatanensis</i> (extractos de ACN:MeOH)	76
4.3 RESULTADOS	76
4.4 DISCUSION	84
CAPITULO V DISCUSIÓN GENERAL	91
CAPITULO VI CONCLUSIONES	93
PERSPECTIVAS	93
ANEXOS	94
BIBLIOGRAFIA	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (Sepúlveda, 2004)

Figura 1.2 *Caesalpinia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm

Figura 1.3 Representación esquemática del virus de influenza. (Manjarrez,1999)

Figura 1.4 Modelo de la orientación y posición de las proteínas transmembranales HA, NA y M2 en la membrana del virus de la influenza. (Manjarrez, 1999)

Figura 1.5. Ciclo de replicación del virus de la influenza. (Manjarrez,1999)

Figura 1.6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

Figura 2.1 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Oxkutzcab durante las épocas de secas y lluvias

Figura 2.2 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas y lluvias

Figura 2.3 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Yaxcabá durante la época de secas y lluvias

Figura 2.4 Comparación de los perfiles cromatográficos por CG de la localidad de Oxkutzcab durante la época de secas y lluvias

Figura 2.5 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas y lluvias

Figura 2.6 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Yaxcabá durante la época de secas y lluvias

Figura 2.7 Perfil cromatográfico comparativo de las zonas de colecta durante la época de secas

Figura 2.8 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab obtenido durante la época de lluvias

Figura 2.9 Perfil cromatográfico de la muestra tres de extracto hexánico de hojas de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 2.10 Perfil cromatográfico de la muestra uno de extracto hexánico de hojas de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 2.11 Perfil cromatográfico de la muestra uno de extracto hexánico de hojas de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 2.12 Perfil cromatográfico de la muestra tres de extracto hexánico de hojas de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 2.13 Perfil cromatográfico de la muestra uno de extracto hexánico de hojas de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 2.14 Perfil cromatográfico de la muestra tres de extracto hexánico de hojas de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 2.15 Rendimiento promedio de cada sitio de colecta

Figura 2.16 Comparación de las condiciones ambientales de temperatura y humedad registrada en cada sitio de colecta durante las épocas de secas y lluvias

Figura 2.17 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Oxkutzcab durante las épocas de secas y lluvias

Figura 2.18 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas y lluvias

Figura 2.19 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Yaxcabá durante la época de secas y lluvias

Figura 2.20 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Oxkutzcab durante la época de secas y lluvias

Figura 2.21 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas y lluvias

Figura 2.22 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Yaxcabá durante la época de secas y lluvias

Figura 3.1. Placas cromatográficas de las 10 fracciones obtenidas por CLV vistas en UV a 365 (A) y 254 (B) nm en la cual se observan la presencia de componentes de distinta polaridad

Figura 3.2 Placa cromatográfica de las 24 fracciones revelada con ácido fosfomolibdico

Figura 3.3 Placa cromatográfica de las 25 fracciones revelada con ácido fosfomolibdico obtenidas del fraccionamiento por columna automatizada

de CY-567

Figura 3.4 Placa de ensayo de hemaglutinación de las fracciones de VLC

Figura 3.5 Placas cromatográficas de la cromatografía líquida al vacío

de las fracciones 5,6 y 7 vistas en UV a 365 y 254 nm y vistas con ácido

fosfomolibdico en la cual se observan la presencia de 3 componentes principales

Figura 3.6 Placas del ensayo de hemaglutinación de las sub-fracciones de CY-567

Figura 3.7 Placas del ensayo de hemaglutinación de las sub-fracciones

de CY-567 obtenidas por columna automatizada

Figura 3.8 Espectro de RMN- H^1 del compuesto activo con la estructura

de 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

indicando las señales de los protones oxigenado

Figura 3.9 Espectro de RMN- C^{13} del compuesto activo con la estructura

de 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

indicando las señales de los carbonos oxigenados

Figura 3.10. Ampliación del espectro de HSQC del compuesto activo

5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

indicando la relación directa entre protones y carbonos

Figura 3.11 Correlaciones establecidas por el estudio de HMBC del compuesto

activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Figura 3.12 Ampliación del espectro de HMBC del compuesto activo

5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

indicando la correlación entre protones y carbonos

Figura 3.13 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Figura 3.14 Porcentajes de inhibición de las fracciones 4, 5, 6 y 7 a las distintas concentraciones

(100% 50 % 25% 12.5%)

Figura 3.15 Porcentajes de inhibición de las fracciones B, C, J, K, L y M a las distintas

concentraciones (100% 50 % 25% 12.5%)

Figura 3.16 Cristales presentes en la muestra "M"

Figura 4.1 Distribución de *Caesalpinia yucatanensis* en la península de Yucatán,

los lugares de colecta y número de individuos colectados en cada área (Conabio,2018)

Figura 4.2 Mapa de los municipios de la península de Yucatán donde se realizaron las colectas de

los individuos de *Caesalpinia yucatanensis*

Figura 4.3 Estándar flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Figura 4.4 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 4.5 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 4.6 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 4.7 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 4.8 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía de gases

Figura 4.9 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 4.10 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 4.11 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía de gases

Figura 4.12 Gráfico de los porcentajes de área de los individuos colectados

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1 Ejemplos de compuestos derivados de plantas con acción terapéutica (Barquero, 2007)

Cuadro 1.2 Efecto antiviral de las fracciones de *C. yucatanensis* contra el virus de Influenza A durante el cotratamiento (Cetina Montejo, 2012)

Cuadro 1.3 Efecto antiviral de las fracciones de *C. yucatanensis* de hoja contra el virus de Influenza A durante el co-tratamiento.

Cuadro 1.4 Registros importantes de los efectos del virus de la Influenza en el ser humano

Cuadro 2.1 Rendimiento a partir de 150 g de material seco y molido para cada localidad colectada en las distintas épocas

Cuadro 2.2 Condiciones ambientales de los meses de secas (noviembre-enero) y lluvias (mayo-julio) de las colectas de individuos de *C. yucatanensis* en el estado de Yucatán.

Cuadro 2.3 Compuestos de *C. yucatanensis* identificados en los extractos Hx de las colectas de la época de secas

Cuadro 2.4 Compuestos de *Caesalpinia yucatanensis* de las colectas de la época de lluvias

Cuadro 2.5 Resumen de las Condiciones ambientales de cada sitio, rendimiento de los extractos MeOH y los Tr de los componentes mayoritarios observados por HPLC y CG-EM

Cuadro 2.6 Componentes de extracto Hx de las muestras colectadas en distintas regiones de Yucatán durante la época de secas, identificados por GC-MS

Cuadro 3.1 Datos obtenidos del espectro de HSQC del compuesto activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Cuadro 3.2. Datos obtenidos del espectro de HMBC del compuesto activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Cuadro 3.3 Comparación de los desplazamientos químicos de R-MN ^1H y RMN ^{13}C con lo reportado por Kongkum N. *et al.*, 2012

Cuadro 3.4 Actividad Anti-VIH-1 de las flavonas presentes en la especie *Gardenia carinata* (Kongkum N. *et al* 2012)

Cuadro 4.1 Porcentajes de Área

Cuadro 4.2 Tiempos de Retención de los individuos colectados en la época de seca

Cuadro 4.3 Tiempos de Retención de los individuos colectados en la época de lluvias

Resumen

Estudios previos enfocados a la búsqueda de alternativas antivirales naturales, identificaron que extractos metanólicos de *Caesalpinia yucatanensis*, planta endémica de la Península de Yucatán, presentaron actividad antiviral contra el virus de la influenza A (H1N1) a nivel cotratamiento (entrada viral), sugiriendo una posible interferencia con la hemaglutinina viral. Tomando en cuenta que la concentración de los metabolitos secundarios en plantas está sujeta a las condiciones ambientales del sitio de colecta, en el presente trabajo se planteó como objetivo principal, caracterizar los componentes antihemaglutinina y determinar su presencia y abundancia en extractos de hoja de *C. yucatanensis* colectadas en época de seca y lluvias en tres localidades del estado de Yucatán, México. Las muestras se colectaron en los municipios de Yaxcabá, Oxkutzcab y Sierra Papacal de noviembre a enero de 2018 (época de secas), y de Julio a agosto de 2019 (época de lluvias), siendo un total de 18 individuos, 3 por cada sitio y época de colecta. Las muestras fueron extraídas con metanol y particionadas individualmente obteniéndose los respectivos extractos de hexano y acetonitrilo/metanol. Cada extracto fue analizado por CG/EM y HPLC obteniéndose los respectivos perfiles cromatográficos. Por otra parte, para el aislamiento e identificación de los componentes activos, se realizó un fraccionamiento biodirigido de cantidades mayoritarias de extracto metanólico empleando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Con el empleo de distintas técnicas cromatográficas así como de identificación estructural, se logró el aislamiento e identificación de 5-hidroxi-7-metoxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4H-cromen-4-ona, una flavona reportada por primera vez en el género *Caesalpinia*. La localización de la flavona en los extractos de ACN de las distintas colectas, se realizó por CG/EM empleando el compuesto en cuestión como estándar. Como resultado se encontró que las muestras colectadas en las localidades de Yaxcabá y Sierra Papacal presentaron mayores porcentajes de área de éste metabolito durante la época de secas, no así las colectadas en las localidades de Oxkutzcab durante la misma época. Se sugiere que factores ambientales (temperatura y/o humedad) juegan un papel importante en la biosíntesis de este metabolito activo.

Summary

Previous studies focused on the search for natural antiviral alternatives identified that methanolic extracts of *Caesalpinia yucatanensis*, an endemic plant of the Yucatan Peninsula, presented antiviral activity against the influenza A (H1N1) virus at the cotreatment level (viral entry), suggesting a possible interference with viral hemagglutinin. Taking into account that the concentration of secondary metabolites in plants is subject to the environmental conditions of the collection site, the main objective of the present work was to characterize the anti-haemagglutinin components and determine their presence and abundance in extracts of *C. yucatanensis* collected in the dry and rainy season in three locations in Caesalpinnia the state of Yucatán, Mexico. The samples were collected in the municipalities of Yaxcabá, Oxkutzcab and Sierra Papacal from November to January 2018 (dry season), and from July to August 2019 (rainy season), for a total of 18 individuals, 3 for each site and collection time. The samples were extracted with methanol and individually partitioned, obtaining the respective extracts of hexane and acetonitrile / methanol. Each extract was analyzed by GC / MS and HPLC, obtaining the respective chromatographic profiles. On the other hand, for the isolation and identification of the active components, a biodirected fractionation of major quantities of methanolic extract was carried out using the hemagglutination inhibition test. With the use of different chromatographic techniques as well as structural identification, the isolation and identification of 5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-chromen-4-one, a flavone, was achieved reported for the first time in the genus. The localization of the flavone in the ACN extracts of the different collections was carried out by GC / MS using the compound in question as a standard. As a result, it was found that the samples collected in the localities of Yaxcabá and Sierra Papacal presented higher percentages of area of this metabolite during the dry season, not so those collected in the localities of Oxkutzcab during the same time. It is suggested that environmental factors (temperature and / or humidity) play an important role in the biosynthesis of this active metabolite.

CAPITULO I PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como medicamentos naturales para el alivio de diversas enfermedades, situación que ha continuado hasta nuestros días, a pesar de todos los adelantos de la medicina moderna, la farmacéutica y de las ciencias en general (Mitre y Camacho 2013). En el mercado mundial, el 50% de las plantas son usadas en alimentación humana, 25% en cosmética, 20% en la industria farmacéutica y un 5% en otros rubros (Salvador *et al.*, 2003). La producción proviene principalmente de países en desarrollo (América África y Asia), y se dirige a los países desarrollados: EEUU de Norteamérica y Japón (Cañigüeral *et al.*, 2003). El empleo de algunas plantas con fines terapéuticos son un indicio del gran interés e importancia de las plantas medicinales (Carrillo *et al.*, 2007).

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, de hecho, se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos que contienen está comprendido dentro de los llamados metabolitos secundarios (MS), que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida. Los MS de las plantas son una variedad útil de productos naturales no solo para la planta, sino que también poseen gran valor comercial por los distintos usos que se les atribuyen. Los metabolitos secundarios se utilizan cada vez más en la medicina como tratamientos alternativos a los medicamentos sintéticos y como aditivos alimentarios con fines terapéuticos, aromáticos y culinarios.

Diversos factores genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales pueden influir en la biosíntesis y la acumulación de metabolitos (Yang *et al.*, 2018). La síntesis y acumulación de componentes fitoquímicos depende críticamente de las condiciones ambientales. Para la mayoría de las plantas, los factores o variables externas (luz, temperatura, agua del suelo, fertilidad y salinidad del suelo) pueden afectar significativamente algunos procesos asociados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas, incluso su capacidad para sintetizar MS, lo que eventualmente conduce al cambio general de perfiles fitoquímicos que juegan un papel estratégico en la producción de

sustancias bioactivas (Verma *et al.*, 2015; Ferrandino *et al.*, 2013). La determinación de los factores que favorecen un aumento o disminución en las concentraciones de MS activos, es de especial interés para la selección de especies altamente productoras para su explotación biotecnológica.

Caesalpinnia yucatanensis (Britton & Rose) Grenm es una planta endémica de la península de Yucatán perteneciente a la familia de las leguminosas, la cual ha mostrado actividad antiviral contra el virus de influenza A. En un monitoreo aleatorio de extractos vegetales de la flora peninsular, se encontró que fracciones de hojas de *C. yucatanensis* mostraron una concentración citotóxica media (IC₅₀) menor a 0.78 µg/mL en el ensayo de reducción de efecto citopático, así como alta selectividad. Dicha actividad se observó a nivel co-tratamiento o sea a nivel de entrada viral sugiriendo una posible interacción con la hemaglutinina viral, glicoproteína de superficie viral responsable del ingreso e infección de a la célula huésped. Hasta el momento, se desconoce el o los compuestos responsables de la actividad antiviral, así también, se desconoce si la concentración de éstos compuestos pudiera estar influida por factores ambientales imperantes en los distintos sitios de localización de ésta especie.

Con base en lo anterior y dada la importancia que representa *C. yucatanensis* como fuente de compuestos con actividad antiviral, se planteó como objetivo de éste trabajo aislar e identificar los metabolitos responsables de la actividad antiviral contra el virus de influenza AH1N1pdm 2009, así como determinar su presencia y abundancia en poblaciones naturales de esta especie en distintas regiones de la Península de Yucatán.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Metabolitos secundarios de las plantas

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico (Arceo *et al.*, 2003). Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia de defensa utilizada por las plantas es la producción de MS (Croteau *et al.*, 2000).

Los MS son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Figura 1.1) (Sepúlveda *et al.*, 2004). Los MS presentes en el reino vegetal pueden dividirse en tres grupos mayoritarios basados en su ruta de biosíntesis: compuestos nitrogenados (glicósidos cianogénicos, alcaloides y glucosinolatos), compuestos fenólicos (flavonoides, quinonas, fenilpropanoides) y terpenos (isoprenoides) (Fang *et al.*, 2011). Los MS de las plantas ofrecen un potencial interesante para aplicaciones farmacológicas en las que pueden servir como fármacos en ensayos clínicos para el tratamiento de diversas enfermedades (Avalos *et al.*, 2009) (Van Wyk *et al.*, 2015). En las últimas dos décadas, los productos naturales han sido el objetivo de muchas investigaciones, y el uso directo de

estos productos se ha fomentado en las industrias farmacéutica y agrícola (Sarker *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2006). Los efectos secundarios de los medicamentos químicos han llevado a prestar más atención a las plantas medicinales (Niazian *et al.*, 2019).

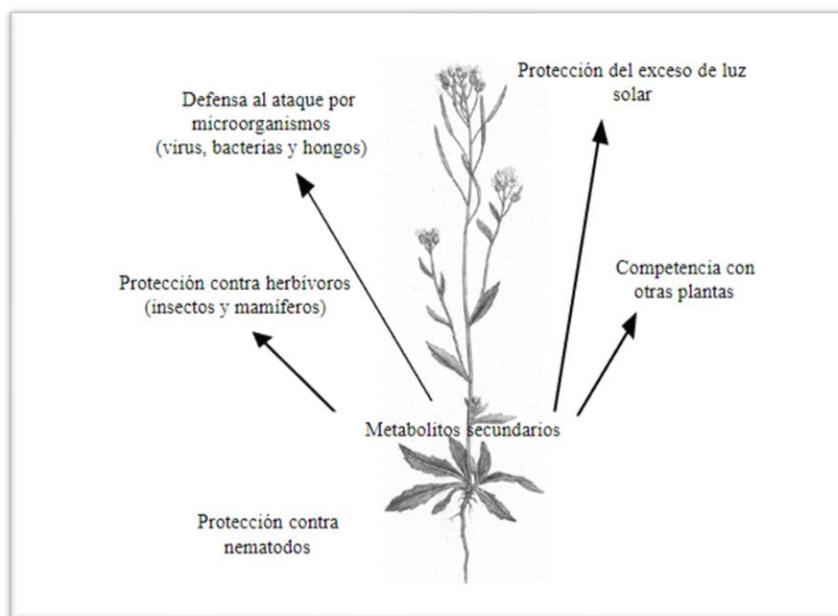


Figura 1.1 Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (Sepúlveda, 2004)

1.1.2 Factores que afectan la producción de metabolitos secundarios en plantas

El contenido de los varios tipos de MS está influenciado por el genotipo de la planta (la especie y la variedad), las características ambientales como la radiación solar (Carvalho *et al.*, 2010) y la disponibilidad de agua, la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades (Waterman y Mole, 1994). Acorde a esto Valares Masa en el 2011 indicó que las condiciones ambientales como el déficit de agua y de nutrientes pueden reducir el crecimiento de las plantas y la velocidad fotosintética. En tales condiciones, carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensa basadas en carbono pertenecientes al metabolismo secundario.

Los MS pueden variar también de acuerdo al tipo de órgano vegetal que se trate o de la edad de la planta. Por ejemplo, el contenido de saponinas en la especie *Panax notoginseng* es mayor en las raíces de especies de 3 años de edad que en raíces de

plantas más jóvenes (Hong *et al.*, 2005); por el contrario, el contenido de terpenos en *Colonopsis pilosula* decrece conforme la especie es más vieja (Zhu *et al.*, 2014). En plantas perenes maderables el contenido de MS puede incrementarse con la edad, o bien detenerse, e incrementarse de nuevo hasta cierto grado (Geng *et al.*, 2011).

Las hojas son el órgano principal en donde se realiza la fotosíntesis, así como constituyen uno de los lugares de almacenamiento de MS, los cuales pueden estar influenciados por la edad de las hojas, época de colecta y estado de crecimiento de la especie. Por ejemplo, en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Cinnamomum verum*, la síntesis y acumulación de eugenol es alta en hojas jóvenes de un año de edad (Li *et al.*, 2016). Así también, en las hojas, la presencia de estructuras secretoras, glándulas o tricomas son los principales sitios en donde los MS se acumulan en mayor concentración (Figueiredo *et al.*, 2002).

Por otra parte, factores abióticos pueden influir negativa o positivamente en la producción de MS (Verma and Shukla, 2015). Por ejemplo, una radiación excesiva puede inactivar la fotosíntesis en los cloroplastos y causar fotoinhibición y reducción del crecimiento en las plantas (Szymanska *et al.*, 2017). En algunos casos, una alta irradiación puede estimular el crecimiento vegetal y la acumulación de MS, por ejemplo, la acumulación del flavonoide glicosídico escutelaria fue alto en hojas expuestas a la luz que en hojas en la sombra en la especie *Erigeron breviscapus* (Zhou *et al.*, 2016). Por el contrario, hojas con luz parcial de la especie *Flourenzia cernua* presentaron mayor contenido de terpenos que las expuestas a luz directa (Estell *et al.*, 2016). Por lo tanto, la intensidad de la luz y el fotoperíodo presentan diferentes efectos en la producción de MS en diferentes plantas.

Así también, el crecimiento vegetal está directamente ligado a los rangos de temperatura a que la planta esté expuesta y por ende pueden afectar la producción de MS. Los MS pueden también incrementarse o disminuir su producción bajo distintos rangos de temperatura, y esto depende de la especie que se trate, así como de múltiples factores fisiológicos como bioquímicos (Li *et al.*, 2016b).

El estrés por sequía también juega un papel importante en la producción de MS en plantas, pues está relacionado con decremento de la absorción de agua que influye negativamente en varios procesos fisiológicos alterando la biosíntesis de MS (Ashrafia *et*

al., 2018). Por ejemplo, se ha reportado que el contenido de flavonoides y compuestos fenólicos es elevado en condiciones de sequía severa en plantas (Azhar *et al.*, 2011). La elevación de compuestos fenólicos y flavonoides está altamente relacionada entre el balance de las fuentes de carbohidratos y su decremento. Se ha reportado que la acumulación de carbohidratos solubles en las células vegetales se afecta por el decremento de su transportación en plantas bajo sequía severa (Jaafar *et al.*, 2012). Algunas veces el estrés por sequía puede inducirse para la sobreproducción de MS, como por ejemplo en *Hypericum brasiliensis*, en donde bajo condiciones de estrés hídrico, se elevan las concentraciones de MS como rutin, quercetin y ácido betulínico (Verma and Shukla, 2015). Otros ejemplos de incremento en la producción de MS por estrés por sequía se reportan para especies del género *Artemisia*, *Labisia pumila*, *Scutellaria baicalensis*, entre otras especies (Verma and Shukla; Jaafar *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018).

1.1.3 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos con algún efecto farmacológico. En la actualidad se calcula unas 260, 000 especies de plantas a nivel mundial, de las que el 10 % se puede considerar medicinal. Según la clasificación de tratados médicos de fitoterapia, en épocas modernas y pasadas, las regiones tropicales son favorecidas por una mayor proporción de especies medicinales, teniendo en cuenta que todavía no se conoce la totalidad de la flora vegetal.

La identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por el uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica (Reyes *et al.*, 2010). Los compuestos derivados de plantas continúan influyendo en el descubrimiento de fármacos (Sameiyan *et al.*, 2019). El mercado mundial de plantas medicinales y medicamentos derivados de plantas en 2015 se estimó en 25, 6 mil millones de dólares y se espera que aumente a 35,4 mil millones de dólares en 2020 (Castro *et al.*, 2017).

Cuadro 1.1 Ejemplos de compuestos derivados de plantas con acción terapéutica (Barquero, 2007)

Compuestos	Acción terapéutica	Planta
Acetildogoxina	Tónico cardíaco	<i>Digitalis lanata</i> Eht.
Aescina	Anti-inflamatorio	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.
Aesculetina	Antidisentérico	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance
Ajmalicina	Antihípertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth ex. Kurz
Anisodamina	Anticolinérgico	<i>Anisodus tanguticus</i> (Maxim.) Pascher
Anisodina	Anticolinérgico	<i>Anisodus tanguticus</i> (Maxim.) Pascher
Arecolina	Antihelmintico	<i>Areca catechu</i> L.

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, de hecho, se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o MS, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida. Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides.

Se ha demostrado que existe gran variación en cuanto a la concentración de estos en la planta, no hay un patrón de máxima producción ni órganos especiales de almacenaje de MS, sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas (Martínez *et al.*, 2012).

1.1.4 Genero *Caesalpinia*

Este género comprende más de 500 especies de árboles y arbustos tropicales y subtropicales (Mabberley *et al.*, 2008) los cuales han sido reportados con diversas propiedades biológicas tales como antioxidantes (Saenjum *et al.*, 2010) (Batubara *et al.*, 2010), antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas (Wang *et al.*, 2011) (Nakamura *et al.*, 2002) y analgésicas

Las especies de genero *Caesalpinia* han sido ampliamente estudiadas no solamente en cuanto a su composición química si no en las muchas actividades biológicas relacionadas a sus componentes. En este género se ha reportado el aislamiento de flavonoides (Islas *et al.*, 2011) relacionados con actividad antiviral significativa (Chiang *et al.*, 2003), antioxidante (Islas *et al.*, 2011; Novia *et al.*, 2018), analgésica (Baldim *et al.*, 2012), y antitumoral (Gallego, 2016) entre otras. Se han reportado aislamientos de triterpenos con actividad antibacteriana (Baldim *et al.*, 2012), diterpenos con actividad antipalúdicas y anti-inflamatoria (Bello, 2016), polifenoles con actividad antitumoral (Castañeda, 2012), al igual que la presencia de otros compuestos como cumarinas, taninos y saponinas (Yhasminie, 2019). Especies como *C. decapetala* presentan compuestos con actividad antitumoral contra la línea celular MGC-803 (cáncer gástrico), tales como emodina, baicalín y apigenina, así como compuestos con efectiva actividad antiradicalaria frente al radical DPPH como rutina, quercetina, baicalín e incluso comparable con el ácido ascórbico (Wei *et al.*, 2013).

De acuerdo a los estudios realizados hasta la actualidad, los componentes químicos del genero *Caesalpinia* son más de 280. Entre ellos se puede encontrar diterpenos, triterpenos, flavonoides, fenoles aromáticos y fenilpropanoides (Wei *et al.*, 2013). Los diterpenos son los componentes predominantes en el género *Caesalpinia* (Gallego, 2016).

1.1.5 *Caesalpinia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm

Caesalpinia yucatanensis es una planta medicinal encontrada al sur de México, en la Península de Yucatán, Chiapas, Michoacán y Tabasco (Ibarra-Manríquez, 2002), conocida en maya como taa k'in che. *C. yucatanensis* forma parte de la familia de las Fabáceas subfamilia *Caesalpinaceae* (Ulibarri, 2008; Gasson *et al.*, 2009). *C. yucatanensis* se consume comúnmente (flores y hojas) como bebidas herbales tradicionales (Toegel *et al.*, 2012). Entre los usos medicinales reportados para ésta especie se reporta su uso tradicional para el tratamiento de fiebre, dolor de cabeza diarrea y falta de sueño (Méndez *et al.*, 2014).

C. yucatanensis es un arbusto o árbol de 9 -10 m de altura. El tronco crece hasta 25 cm de diámetro. Las hojas son alternas oblongas a ovales, 2 - 3.5 cm de largo, usualmente brillantes, más claras en el reverso. La inflorescencia es racémica a holgada, de 5 a 35 cm de largo. Los tallos de las flores miden 1.5 - 2 cm de largo; el cáliz está cubierto con capullos, las hojas del cáliz son libres, ovadas, de 8 a 10 mm de largo; Las coronas son elípticas a obovadas, 1 - 1.5 cm de largo, amarillas, con manchas naranjas (Figura 1.5). El pistilo es único. La vaina es a menudo más bien hoz, 6 - 12 cm de largo y 2 - 2.5 cm de ancho.



Figura 1.2 *Caesalpinia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm

En estudios previos de evaluación antiviral de extractos vegetales de la península de Yucatán realizados por el grupo de la Dra. Rocío Borges Argáez del Centro de Investigación Científica de Yucatán en colaboración con el grupo de la Dra. Guadalupe Ayora Talavera del departamento de Virología de CIR Hideyo Noguchi, de la Universidad Autónoma de Yucatán se determinó que el extracto metanólico de hojas de *C. yucatanensis* presentó efecto inhibitorio contra el virus de influenza AH1N1pdm 2009 empleando el ensayo de reducción del efecto citopático a nivel cotratamiento (entrada viral), con un IC_{50} de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ y altos índices de selectividad. El fraccionamiento biodirigido mediante cromatografía líquida al vacío (CLV) del extracto metanólico de hojas permitió seleccionar las fracciones AV4 y AV5, las fracciones de mayor polaridad o hidrofílicas (ver cuadro 1.2), como las más activas (Cetina Montejo, 2012).

Cuadro 1.2 Efecto antiviral de las fracciones de *C. yucatanensis* contra el virus de Influenza A durante el cotratamiento (Cetina Montejo, 2012)

FRACCIÓN	A/Yucatán/2370/09		A/México/InDRE797/10	
	MOI:0.01		MOI:0.001	
	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AV1	>25	4	>25	4
AV2	>25	4	8.01	12.48
AV3	>25	4	>25	4
AV4	<0.195	48.51	<0.195	48.51
AV5	<0.195	368.97	<0.195	368.97
AV6	2.57	29.8	<0.78	98.21

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

IS: Índice de selectividad. IS: CC₅₀/IC₅₀

MOI: Multiplicidad de infección, siglas en inglés

AV1-AV6 Extractos de hoja obtenidos por cromatografía líquida a vacío (CLV). Los indicados en negro presentaron los menores valores de IC₅₀

Estudios posteriores de fraccionamiento biodirigido de extracto metanólico de hojas (Cuadro 1.3) confirmó nuevamente la actividad antiviral de las fracciones polares contra la cepa viral de influenza AH1N1pdm2009. Sin embargo, hasta el momento no se han purificado ni identificado los responsables de éste efecto inhibitorio, uno de los objetivos del presente trabajo.

Cuadro 1.3 Efecto antiviral de las fracciones de *C. yucatanensis* de hoja contra el virus de Influenza A durante el co-tratamiento.

A/Yucatán/2370/09			
MOI:0.001			
FRACCIÓN	IC50 (µg/mL)	FRACCIÓN	A/Yucatán/2370/09 MOI:0.001 IC50 (µg/mL)
CYH-1	>6.25	CYH-473 AcoEt	0.11
CYH-2	>6.25	CYH-473 H2O	>12.5
CYH-3	>0.195	cyH-473 AC1	=-----
CYH-8	>0.71	cyH-473 AC2	=-----
CYH-9	>6.25	cyH-473 AC3	=-----
CYH-4	>0.195	cyH-473 AC4	=-----
CYH 4-1	>0.53	cyH-473 AC5	=1.16
CYH-418	>0.195	cyH-473 AC6	=-----
CYH-425	>1.09	cyH-473 ACA	3.16
CYH-432	>1.31	cyH-438	>6.25
CYH-473 ACB	=-----	cyH-473 ACC	=-----
CYH-446	>0.195	cyH-473 ACD	=-----
CYH-455	>4.15	cyH-473 ACE.F	=-----
CYH-461	>3.70	cyH-473 ACG	1.38
CYH-75	>2.42	cyH-473 ACH.I	=-----
CYH-473	>0.195		

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

MOI: Multiplicidad de infección, siglas en inglés

CYH: Fracciones obtenidas de extracto de hojas de *C. yucatanensis*

1.1.6 Virus de la influenza

La influenza es una infección viral aguda de las vías respiratorias, altamente contagiosa, que puede afectar la mucosa nasal, la faríngea, bronquios y en ocasiones hasta los alvéolos pulmonares. Esta infección puede tener un comportamiento endémico, epidémico o de una pandemia. Los síntomas son parecidos a los del catarro común o resfriado; sin embargo, los síntomas son más graves y su inicio es generalmente abrupto. El cuadro clínico de la influenza puede variar, observándose desde un cuadro febril agudo leve hasta una infección pulmonar y, en ocasiones, asociarse a complicaciones graves. (Solórzano *et al.*, 2009). En ocasiones se utiliza en forma equivocada el término de gripe como sinónimo, cuando en realidad se trata de casos de catarro común o rinofaringitis. La gripe es causada por el virus de la influenza A, B ó C, el catarro común es causado por múltiples virus respiratorios (rinovirus, coronavirus, adeno-virus, virus parainfluenza, entre otros).

Los virus A y B de la influenza en seres humanos causan epidemias estacionales de la enfermedad casi todos los inviernos en los Estados Unidos. La aparición de un virus nuevo y muy diferente de la influenza A con la capacidad de ocasionar infecciones en las personas puede desencadenar una pandemia de influenza. Las infecciones de influenza tipo C causan generalmente una enfermedad respiratoria leve y no se cree que puedan desencadenar epidemias. Recientemente se añadió a la clasificación los virus de influenza D. Los virus de influenza D afectan principalmente al ganado y no se cree que puedan causar infecciones o enfermedades en los seres humanos (CDC, 2017).

Los virus de influenza están constituidos por una nucleocápside y una envoltura (Figura 1.3). La nucleocápside está compuesta por el genoma viral, ARN y proteínas de empaquetamiento, nucleoproteínas. La envoltura está formada de una bicapa lipídica con composición similar a la membrana de la célula hospedera y tres proteínas transmembranales de superficie (Figura 1.4) codificadas por el virus: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y la proteína M2. La HA es la proteína responsable de la unión al receptor celular y fusión de membranas; la NA es una enzima que actúa sobre el receptor y participa en la liberación de partículas virales y finalmente la proteína M2 forma un canal iónico. La HA y NA son glucoproteínas que definen a los subtipos virales por diferencias antigénicas (Manjarrez, 1999).

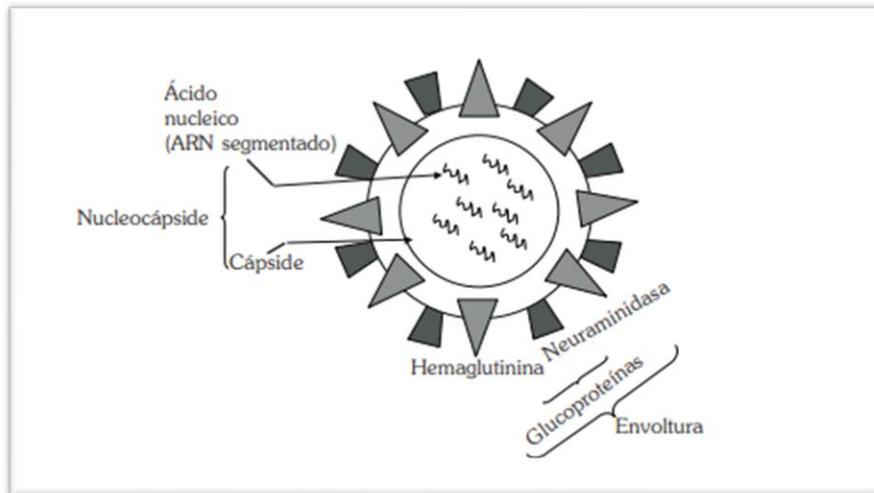


Figura 1.3 Representación esquemática del virus de influenza. (Manjarrez,1999)

Los virus de influenza son virus envueltos, los tipos A y B tienen 8 segmentos de ARN y el tipo C, tiene 7 segmentos que codifican diferentes proteínas, dos de las cuales no son estructurales (NS) y tres son proteínas transmembranales, dos de ellas son glicoproteínas: la HA y la NA (Manjarrez,1999)

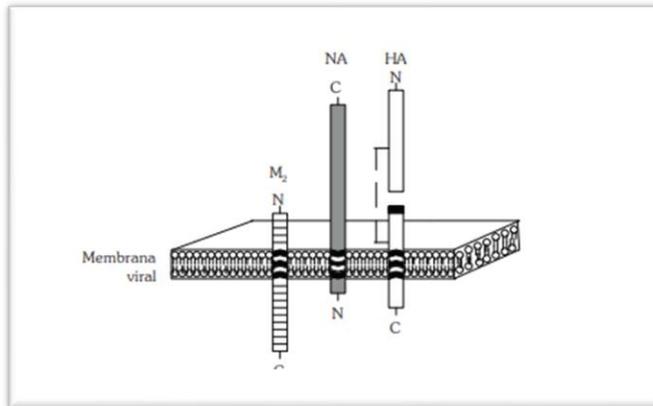


Figura 1.4 Modelo de la orientación y posición de las proteínas transmembrales HA, NA y M2 en la membrana del virus de la influenza. (Manjarrez, 1999)

La HA es la proteína responsable de la unión al receptor celular y fusión de la membrana y la NA es una enzima que actúa sobre el receptor y participa en la liberación de partículas virales (Carrada., 2010), estas son las dos glicoproteínas de superficie de los virus de la influenza A que son los objetivos de la detección inmunológica. Estas glicoproteínas son muy variables, y hasta ahora se han identificado 18 variantes HA y 11 NA (Peng *et al.*, 2017). Los virus de influenza A pueden dividirse en diferentes subtipos. Los subtipos actuales de virus de influenza A que se detectan en las personas son A (H1N1) y A (H3N2). En la primavera de 2009 emergió un nuevo virus de influenza A (H1N1) (sitio web de los CDC sobre la influenza H1N1 2009) que comenzó a causar enfermedades en las personas. Este virus era muy diferente de los virus de la influenza A (H1N1) que circulaban entre las personas en aquel momento. El nuevo virus causó la primera pandemia de influenza luego de más de 40 años de no haberse registrado ninguna pandemia por virus de éste tipo. Ese virus (a menudo llamado "2009 H1N1") ahora ha reemplazado al virus H1N1 que circulaba anteriormente entre los seres humanos (sitio web de los CDC sobre la influenza H1N1 2009).

La influenza es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, ya que afecta gran parte de la población mundial cada año (Toro M. *et al.*, 2009). Los virus de la influenza A infectan a una amplia gama de animales, incluyendo aves, cerdos y otros mamíferos; por lo tanto, pueden llevar al desarrollo de pandemias (Wongphatcharachai *et al.*, 2013) (Carrasco *et al.*, 2006). Estos virus causan epidemias locales y continentales, lo mismo que pandemias con grandes pérdidas económicas debidas a los costos médicos asociados a la infección en los humanos, y a la morbilidad y mortalidad de los animales afectados (Reid, 2003). El virus de la influenza fue aislado por primera vez de los cerdos en 1930 (Smole *et al.*, 2009) y en los humanos en 1933, aunque se tienen registros de una enfermedad epidémica similar a la influenza descrita por Hipócrates hace más de 2, 000 años. Históricamente estos virus han sido causantes de una alta mortalidad; se acepta que sólo la pandemia de 1918 originó más muertes que la primera guerra mundial, siendo India el país que presentó la mayor mortalidad en la población (Reid, 2003).

En el año 2005, la Organización Mundial de la Salud (OMS) planteó nuevos lineamientos para el manejo de las pandemias, lo cual impulsó a las autoridades locales y nacionales a revisar y actualizar sus planes de preparación para posibles pandemias. La OMS y CDC están en constante monitoreo de casos de influenza ya que las epidemias anuales de gripe pueden afectar gravemente a todas las poblaciones, pero el mayor riesgo corresponde a las embarazadas, niños de 6 a 59 meses, los ancianos, los pacientes con enfermedades como VIH/sida, asma, neumopatías crónicas o cardiopatías crónicas, y los profesionales sanitarios (CDC, 2017).

En el caso de la influenza tipo A, esta ha generado las pandemias más conocidas de la historia, lo fue en el caso de la famosa gripe española en el año de 1918, cuando aún Europa se recuperaba de una guerra mundial, aunque no se ha registrado otra de tanta magnitud, le siguieron otras pandemias que afectaron a un número considerable de la población, en la Cuadro 1.4 se registran los brotes de influenza A que han causado alerta en la población.

Cuadro 1.4 Registros importantes de los efectos del virus de la Influenza en el ser humano

AÑO	SUCESO
1918-1919	Aproximadamente más de 40 millones de muertes, dentro de las cuales la tasa de mortalidad fue más alta en personas menores de 50 años. Eran los años en los que se creía que la influenza era causada por bacterias, por lo que no se contó con herramientas para controlarla. Actualmente los científicos han podido clasificar al virus como cepa de influenza H1N1.
1957-1958	La influenza mantuvo una frecuencia anual después de la pandemia de 1918, pero no surgió un tipo de influenza nuevo y virulento hasta inicios de 1957 en China el cual se identificó que era de tipo H2N2.
1968-1969	Nuevamente en Asia surge una nueva cepa H3N2, llegando a Estados Unidos donde aproximadamente 34,000 personas murieron
1997	La siguiente amenaza significativa que surgió con la influenza provino nuevamente de Asia, donde un virus de influenza aviar (H5N1) infectó a pájaros, y luego se transmitió a humanos.
2009	La última influenza pandémica apareció en México así aparecieron casos en California y Texas, y la enfermedad continuó su propagación hacia el norte. Los científicos identificaron al virus como influenza H1N1

La vacunación previene la infección por el virus de la influenza, así también los medicamentos antivirales pueden emplearse para tratar a los pacientes infectados; sin embargo, ambas se ven obstaculizadas por la alta variabilidad de las glicoproteínas de superficie de IAV (principalmente NA y HA) y la aparición de cepas resistentes (Borges-Argáez *et al.*, 2019).

1.1.7 Ciclo de replicación viral

En el ciclo de replicación de influenza están establecidos diversos eventos adsorción, penetración, replicación y síntesis de proteínas, maduración, transcripción y liberación, y por último ensamblaje. El virus se une a receptores celulares por medio de la HA; entra por endocitosis a la célula huésped. El pH en el endosoma es de suma importancia para que prosiga el ciclo. El genoma de ARN segmentado de polaridad negativa se sintetiza en el núcleo, realizándose dos tipos de transcripciones, una para ARNm poliadenilado y otra para la síntesis del ARN genómico de polaridad negativa. La síntesis de proteínas se realiza en el citoplasma y las proteínas P, NS y M1 migran al núcleo celular; luego estas proteínas migran nuevamente al citoplasma para unirse con las proteínas HA, NA y M2 que permanecen todo el tiempo en el citoplasma, se ensamblan, maduran y finalmente se da la liberación de las partículas (Figura 1.5). En este paso es importante la participación de la NA (Manjarrez, 1999).

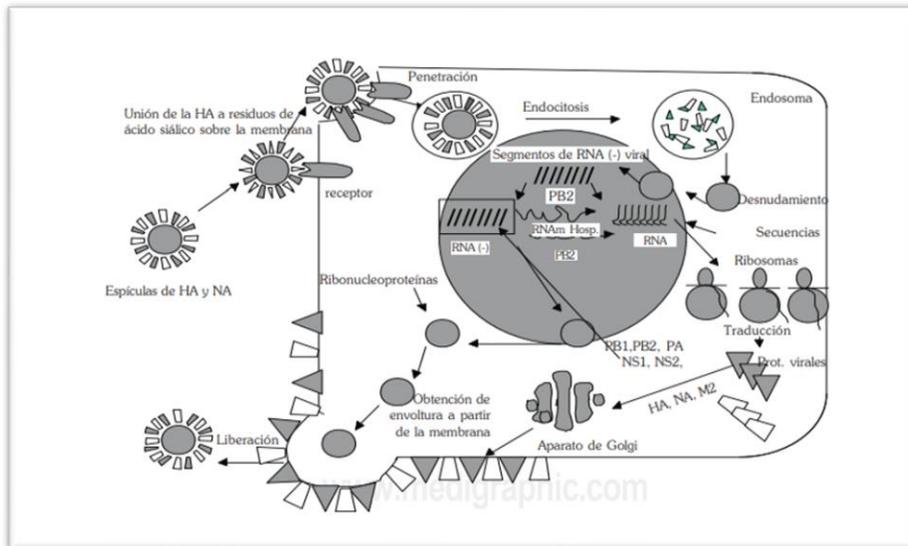


Figura 1.5 Ciclo de replicación del virus de la influenza. (Manjarrez,1999)

1.2 JUSTIFICACIÓN

El virus de la influenza A (H1N1) representa un problema a nivel regional y mundial dado que ataca el sistema respiratorio del ser humano, siendo los niños y personas mayores la población más vulnerable, ocasionado enfermedades e incluso la muerte. Desde la antigüedad se han utilizado las plantas con fines medicinales para tratar enfermedades en el ser humano aprovechando sus propiedades. Las plantas medicinales producen metabolitos secundarios que les proporcionan actividades antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, etc. En la actualidad el avance en el conocimiento de los MS activos de fuentes naturales es mayor debido a las nuevas tecnologías que se emplean para su identificación, y con base en este conocimiento se han sintetizado una serie de medicamentos que hoy en día utilizamos, ya sea como extracto o como ingrediente activo de una formulación farmacéutica. Sin embargo, ciertas enfermedades, como las virales, constantemente demandan la búsqueda de nuevos tratamientos más efectivos y con menos efectos secundarios, debido a la capacidad de los virus de presentar mutaciones y con ello, resistencia a los antivirales.

Recientemente se han realizado trabajos de investigación con plantas nativas y endémicas de la península de Yucatán en la búsqueda de nuevos agentes con potencial antiviral contra la influenza A. De este monitoreo, la especie *C. yucatanensis* presentó importante actividad antiviral lo cual plantea el interés en el estudio de esta especie, que conlleve a la elucidación estructural de sus ingredientes activos.

Sin embargo, al ser una planta silvestre existen factores ambientales que determinan el contenido y la cantidad de componentes activos, que pueden causar variación en la producción de dichos metabolitos, así como su actividad contra el virus.

1.3 PREGUNTA DEL PRESENTE ESTUDIO

¿Los cambios en las condiciones del medio ambiente en las localidades de Sierra Papacal, Oxcutzcab, y Yaxcabá, ¿pueden generar modificaciones en la composición y presencia de sus ingredientes activos y como consecuencia, en la actividad antiviral de *Caesalpinnia yucatanensis* contra el virus de la influenza tipo A H1N1pdm 2009?

1.4 HIPÓTESIS

La variación de condiciones ambientales (Temperatura-Humedad) de tres poblaciones de *Caesalpinnia yucatanensis* genera cambios en la actividad anti-hemaglutinina y en la concentración de los metabolitos activos de esta especie contra el virus de la influenza tipo A (H1N1).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad espacio-temporal en la producción y actividad antiviral de metabolitos secundarios aislados en hojas de diferentes poblaciones de *Caesalpinnia yucatanensis* de la península de Yucatán

1.5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los componentes anti-hemaglutinina presentes en hojas de *C. yucatanensis* mediante un enfoque biodirigido empleando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación del virus de influenza a H1N1.

- Emplear el o los componentes activos como marcadores químicos y determinar su presencia o ausencia en ejemplares vegetales colectados en distinta época y localidad del estado de Yucatán utilizando CG/EM.

1.6 ESTRATEGIA METODOLÓGICA.

La figura 1.6 muestra la estrategia metodológica planteada en el presente trabajo. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HA) se realizaron a la par del análisis de muestras de los distintos sitios de colecta

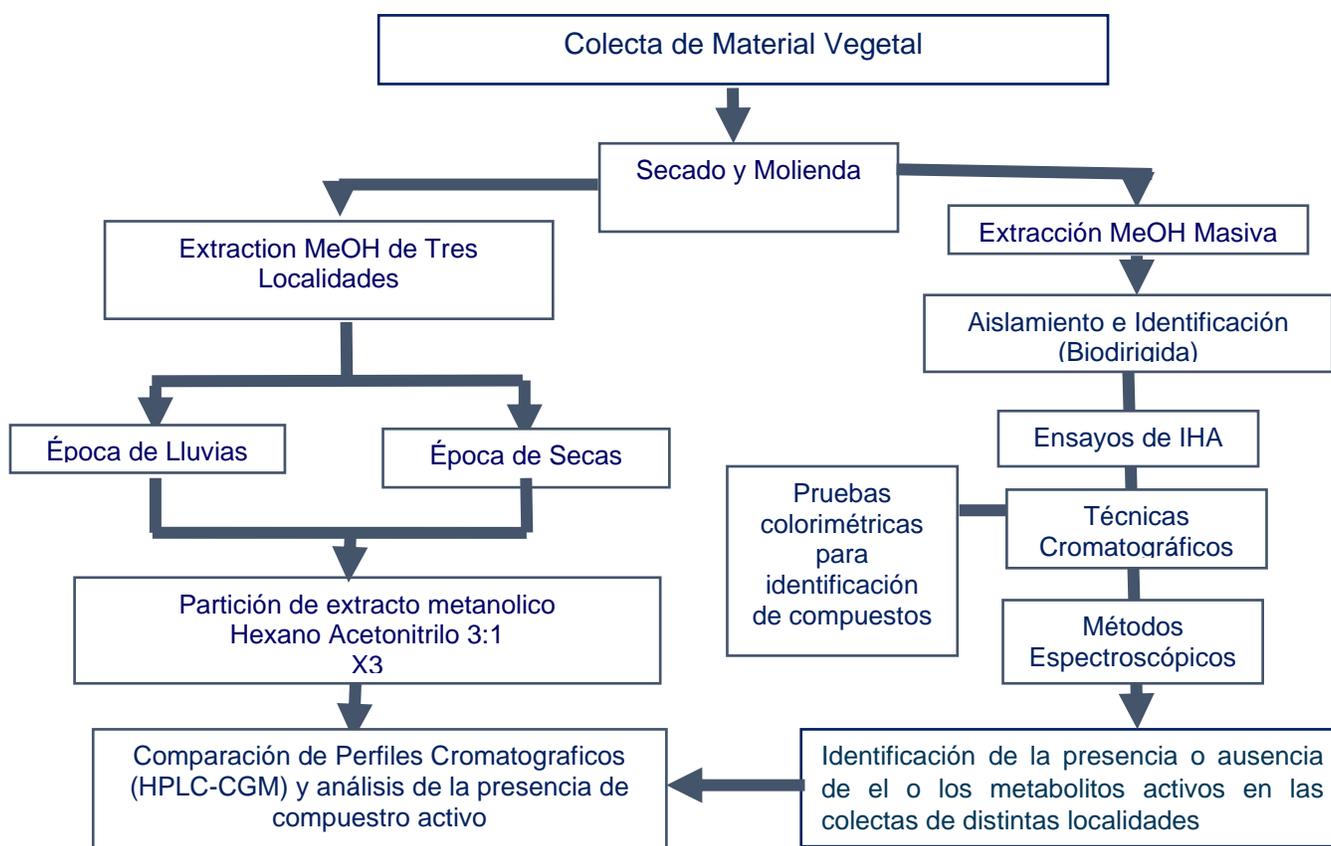


Figura 1.6 Diagrama de flujo de la estrategia experimental

CAPITULO II. COLECTA, EXTRACCIÓN Y PERFIL QUÍMICO DE EXTRACTOS DE HOJAS DE *Caesalpinnia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm

2.1 INTRODUCCION

Uno de los aspectos más importantes en la producción de plantas medicinales es alcanzar altos rendimientos de material vegetal y elevados contenidos de principios activos, lo que depende tanto de factores internos de la planta como son aquellos relacionados con el adecuado crecimiento de la especie en cuestión, los referidos a la recolección y conjuntamente también las condiciones climáticas, pues como seres vivos que son, las plantas están en constante interacción con el medio que las rodea; esencialmente el clima influye en un momento determinado en su crecimiento y desarrollo y en especial en la producción de sus metabolitos secundarios (Lérida Acosta, 2003)

Caesalpinnia yucatanensis es una especie vegetal que ya ha sido estudiada anteriormente, sin embargo, no se ha encontrado en la literatura reportes fitoquímicos que nos indiquen su composición química, aunque existen reportes sobre la fitoquímica del género *Caesalpinnia*. En *C. melanadenia* se ha reportado la presencia de flavonoides, alcaloides, diterpenos, triterpenos y quinonas, con actividad biológica (Pichardo *et al.*, 2013). *C. granadillo* se utiliza en Venezuela como árbol forrajero y se han aislado flavonoides, cumarinas, quinonas y fenoles (Pizzani *et al.*, 2006). *C. echinata* es una especie bastante estudiada en la medicina popular donde se usa como cicatrizante y astringente, en ella se han aislado flavonoides, terpenos y esteroides (Islas *et al.*, 2011). Como podemos ver la fitoquímica del género ha sido ampliamente estudiada y se conocen un gran número de metabolitos aislados del género con distintas actividades biológicas reportadas como antioxidantes (Saenjum *et al.*, 2010) (Batubara *et al.*, 2010), antimicrobianas (Callohuari *et al.*, 2017), antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas (Wang *et al.* 2011) (Nakamura *et al.*, 2002) y analgésicas (Karine *et al.*, 2018) (Toegel *et al.*, 2012). En el caso de *C. yucatanensis* se reporta su uso tradicional para el tratamiento de fiebre, dolor de cabeza, diarrea y falta de sueño (Méndez *et al.*, 2014).

Por lo anterior, en éste capítulo se describen los análisis del perfil de componentes presentes en los distintos especímenes colectados en los sitios y épocas de colecta, así también se presentarán los resultados obtenidos del rendimiento de las colectas

realizadas, y se discutirán los datos obtenidos de los perfiles de HPLC y CG/EM con miras al conocimiento de los componentes presentes en ésta especie de estudio y su relación con la temperatura y humedad imperantes en cada sitio de colecta.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Materiales y reactivos

En el desarrollo del trabajo experimental se emplearon disolventes grado técnico destilados en el laboratorio. Las hojas fueron molidas en una licuadora industrial marca...La eliminación del disolvente del extracto metanólico y de las obtenidas por partición líquido/líquido con hexano y acetonitrilo se realizó en un evaporador rotatorio Buchi R-151. Las muestras se pesaron en una balanza analítica OAHUS PA 114 C. Para el análisis por HPLC se emplearon disolventes grado HPLC obtenidos comercialmente.

2.2.2 Colecta del material vegetal

El material vegetal se colectó en tres sitios de la península de Yucatán: Oxkutzcab, Sierra Papacal y Yaxcabá. Los datos de temperatura y humedad relativa de cada sitio de colecta fueron proporcionados por el Biólogo Francisco Chi May de la unidad de recursos naturales del CICY. El municipio de Oxkutzcab se localiza en la región sur del Estado, ocupando una superficie de 512.23 Km² situándose entre las coordenadas 20°21´ latitud norte y 89°22´ longitud oeste, posee una altitud sobre el nivel del mar de 33 metros. (INEGI 2010). El clima en toda la región es cálido-subhúmedo, presenta una temperatura media anual de 26.3°C con lluvias en los meses de mayo y junio. Cuando se interrumpen se presenta la sequía de medio verano. Tiene una precipitación pluvial media anual de 84.2 milímetros. La humedad relativa en el mes de marzo es del 66% y en el mes de diciembre es del 89%. La vegetación en el municipio se clasifica como selva mediana subcaducifolia con vegetación secundaria. La composición del suelo corresponde al tipo regosol que se encuentra en toda la región.

El municipio de Yaxcabá localizado en la región central-sur del estado de Yucatán, México. Las coordenadas geográficas son 20° 19' y 20° 49' latitud norte y 80° 36' y 88° 56' longitud oeste, con una altitud promedio de 29 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de 26° C, con una precipitación pluvial media anual de 1,118 mm, sujeta a variaciones por la presencia de huracanes (Rodríguez *et al.*2019). El clima que predomina es cálido subhúmedo (Aw) con lluvias en verano, donde la humedad va disminuyendo de sur a norte (García 2004) con temperaturas record en el mes de mayo y las más bajas en enero. La lluvia anual es 1111mm, con una humedad relativa anual de 89% (INEGI 2010; CONAGUA 2016). Los tipos de suelos característicos del municipio son Cambisoles. Calcisoles y en baja proporción Luvisoles (García y Sosa 2013). La vegetación es un bosque tropical subdesiduo en diferentes etapas de sucesión (flores *et al.* 2010) (Rosado-Aguilar *et al.*,2017)

La localidad de Sierra Papacal se encuentra localizado en las coordenadas 21° 7' 19.92" latitud norte, 89° 43' 41.16" latitud oeste, a una altitud promedio de 9 metros sobre el nivel del mar. En Sierra Papacal el tipo de clima es semiárido cálido, temperatura media anual mayor de 22 ° C, temperatura del mes más frío mayor de 18 ° C. Lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal del 5% al 10.2% del total anual. La precipitación media aproximada es de 679 mm (CLIMATE-DATA). El tipo de vegetación es selva baja caducifolia. El tipo de suelo del área de colecta es litosol (SICA).

En cada sitio se colectaron tres especies adultas. Estas colectas se realizaron en los meses de noviembre-diciembre (época de secas), y junio-agosto (época de lluvias).

2.2.3 Procesamiento del material vegetal

El material vegetal obtenido fue secado a 40°C durante tres días en un secador ubicado en las instalaciones del CICY. El material seco se molió en una licuadora industrial para disminuir el tamaño de partícula para después ser pesado.

2.2.4 Fraccionamiento

El material seco y molido (100 g de cada individuo) fue extraído a temperatura ambiente dejándolo reposar con metanol (MeOH) durante 24 horas (se realizó 3 repeticiones sucesivas a cada individuo). Al término de cada extracción, se filtró y concentró a presión reducida en un rotaevaporador a 40 °C obteniéndose el respectivo extracto MeOH. Una porción del material molido obtenido de cada sitio de colecta y de cada individuo se preservó para su extracción masiva, fraccionamiento y cuantificación (Ver capítulo 3). El material molido seco remanente (3.06 kg) fue extraído con MeOH hasta obtener 76.5 g de extracto MeOH el cual fue preservado para su estudio.

2.2.5 Partición líquido-líquido de extracto MeOH

38.1 g de extracto MeOH de cada individuo fueron sometidos a una extracción líquido-líquido empleando 168 mL de hexano y 56 mL de ACN: MeOH. La fase Hx se separó empleando un embudo de separación y la fase orgánica ACN:MeOH fue sometida a una segunda extracción con Hx (mL). El proceso se repitió 3 veces y las fracciones fueron secadas en rotaevaporador y transferidas a viales para ser preservadas en refrigeración. Se obtuvieron 11.6 g de extracto Hx y 26.5g de extracto de ACN:MeOH.

2.2.6 Análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC de las colectas de *C. yucatanensis* (extractos de ACN: MeOH)

Para el análisis por HPLC de las particiones se empleó un equipo de HPLC Perkin Elmer Modelo Flexar con inyección manual y con detector de Ultravioleta de la marca Flexar y el software Chromera. Se utilizó como fase móvil acetonitrilo-agua grado HPLC en modo gradiente, en una relación de 20- 80 % (10 min), con un incremento a 30-70% por 5 min, de manera isocrática en la relación 30- 70% durante 10 min, un incremento de acetonitrilo a 95% durante 25 min, quedando a 95- 5% por 2 min, regresando en 8 minutos a la relación inicial (5- 95%); la velocidad de flujo del disolvente fue de 0.7 mL/min. Se inyectaron 20 ml de la fracción a una concentración de 1 mg/ml. La columna empleada fue una columna analítica de fase reversa de la marca Alltech.

2.2.7 Análisis de los perfiles cromatográficos por CG/EM de las colectas de *C. yucatanensis* (extractos hexánicos)

Para el análisis por CG/EM de las particiones se hexánicas se empleó un equipo de cromatografía de gases Agilent Technologies modelo 6890 Network acoplado a espectrometría de masas Agilent Technologies modelo 5975B utilizando una columna capilar HP-5MS, de 25 m de longitud, 0.320 mm de diámetro y 0.52 μm de espesor. El programa de temperaturas fue: temperatura inicial de 120°C durante 2 min hasta llegar a 300°C durante 10 min. Las muestras se inyectaron al 5% en disolución con diclorometano y se inyectó 1 μL de la solución.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Rendimientos de extractos de hoja obtenidos de *C. yucatanensis* colectadas en las distintas localidades.

En los meses de noviembre y diciembre de 2018 durante la época de secas se realizó la primera colecta de individuos de *C. yucatanensis* de Oxkutzcab en la reserva de Kaxil Kiuik y Sierra Papacal en las instalaciones del CICY en el parque científico de Yucatán; por último, en enero de 2019 se realizó la colecta en el municipio de Yaxcabá. En los meses de mayo, y junio de 2019 durante la época de lluvias se realizó la segunda colecta de individuos de *C. yucatanensis* en los mismos sitios indicados.

En el Cuadro 2.1 podemos observar los resultados de los rendimientos obtenidos a partir de 150 gramos de material seco, expresado en porcentajes para cada localidad en ambas épocas y los rendimientos de las particiones Hx y de ACE/MeOH a partir de 1g de extracto MeOH. Como resultados observamos que en la localidad de Oxkutzcab durante la época de secas se obtuvieron rendimientos de 6.98 g (4.65%) de extracto MeOH en el individuo 1 el cual mostro un rendimiento en las particiones de 0.30 g de extracto Hx y 0.20 g de extracto ACE/MeOH. Para el individuo 2 se obtuvo 7.62 g (5.08%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones los resultados fueron de 0.35 g de extracto Hx y 0.65 g de extracto de ACE/MeOH. Por último, el individuo 3 presentó 6.45 g (4.30%) de extracto MeOH, en las particiones se registraron 0.25 g de extracto Hx y 0.46 g de extracto ACE/MeOH.

Los individuos de Oxcutzcab colectados en la época de lluvias mostraron un incremento notable en el rendimiento comenzando por el individuo 1 con resultados de 19.17 g (12.78%) de extracto MeOH, en las particiones se registró un rendimiento de 0.56 g de extracto Hx y 0.31 g de extracto ACE/MeOH. El rendimiento del individuo 2 se incrementó hasta los 21.94 g (14.62%) de extracto MeOH, mientras que el resultado de las particiones fue de 0.56 g de extracto Hx y 0.36 g de extracto ACE/MeOH. Por último, el individuo 3 mostró rendimientos de 18.35 g (12.23%) de extracto MeOH mientras que para las particiones se obtuvo 0.42 g de extracto Hx y 0.51 g de extracto de ACE/MeOH.

Para la localidad de Yaxcabá el individuo 1 de la época de secas presentó un rendimiento del 15.59 g (10.39%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones 0.23 g de extracto Hx y 0.59 g de extracto ACE/MeOH. En el individuo 2 de la misma localidad se observa un rendimiento de 9.78 g (6.52%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones 0.39 g de extracto Hx y 0.50 g de extracto de ACE/MeOH. Finalmente, el individuo 3 mostró un rendimiento de 17.02 g (11.42%) de extracto MeOH, mientras en las particiones 0.38 g de extracto Hx y 0.57 g de extracto ACE/MeOH.

Durante la época de lluvias en Yaxcabá se observó un incremento en el rendimiento en relación a la época de secas en donde del individuo 1 se obtuvo 16.88 g (11.62%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones se obtuvieron 0.23 g de extracto Hx y 0.68 g de extracto de ACE/MeOH. Del individuo 2 se obtuvieron 14.99 g (9.99%) de extracto MeOH, en las particiones 0.32 g de extracto Hx y 0.60 g de extracto de ACE/MeOH. Por el último el individuo 3 presentó resultados de 15.07 g (10.04%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones presentó un 0.41 g de extracto Hx y 0.59 g de extracto de ACE/MeOH.

En la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas el individuo 1 se presentó un rendimiento de 5.07 g (3.38%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones se observó un rendimiento de 0.25 g de extracto Hx y 0.54 g de extracto ACE/MeOH. En el individuo 2 observamos rendimientos de 3.46 g (2.30%) de extracto MeOH, mientras las particiones presentaron rendimientos de 0.26 g de extracto Hx y 0.49 g de extracto ACE/MeOH. Por último, el individuo 3 mostró rendimientos de 3.53 g (2.35%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones el rendimiento fue de 0.19 g de extracto Hx y 0.49 g de extracto de ACE/MeOH.

Durante la época de lluvias en Sierra Papacal se observó un incremento en el extracto MeOH del individuo 1 presentando un rendimiento de 11.41 g (7.60%) de rendimiento MeOH, mientras que el rendimiento en la partición Hx fue de 0.50 g y de 0.37 g del extracto de ACE/MeOH. Para el individuo 2 se obtuvo 10.69 g (7.12%) de extracto MeOH, mientras que para las particiones un rendimiento de 0.37 g de extracto Hx y un 0.50 g de extracto MeOH. Por último, el individuo 3 tuvo un rendimiento de 11.76 g (7.84%) de extracto MeOH, mientras que en las particiones se obtuvieron rendimientos de 0.13 g de extracto Hx y 0.79 g de extracto de ACE/MeOH.

Cuadro 2.1 Rendimiento a partir de 150 g de material seco y molido para cada localidad colectada en las distintas épocas

Localidad y época	Extracto MeOH (g)	Rendimiento (%)	Extracto Hx (g)	Extracto ACE/MeOH (g)
Oxkutzcab secas	CYO1=6.98	4.65	0.30	0.20
	CYO2=7.62	5.08	0.40	0.65
	CYO3=6.45	4.30	0.25	0.46
Oxkutzcab lluvias	CYO1=19.17	12.78	0.56	0.31
	CYO2=21.94	14.62	0.56	0.36
	CYO3=18.35	12.23	0.42	0.51
Yaxcabá Secas	CYY1=15.59	10.39	0.23	0.59
	CYY2=9.78	6.52	0.39	0.50
	CYY3=17.02	11.42	0.38	0.57
Yaxcabá lluvias	CYY1=16.88	11.62	0.23	0.68
	CYY2=14.99	9.99	0.32	0.60
	CYY3=15.07	10.04	0.41	0.59
Sierra Papacal secas	CYS1=5.07	3.38	0.25	0.54
	CYS2=3.46	2.30	0.26	0.49
	CYS3=3.53	2.35	0.19	0.49
Sierra Papacal Lluvias	CYS1=11.41	7.60	0.50	0.37
	CYS2=10.69	7.12	0.37	0.50
	CYS3=11.76	7.84	0.13	0.79

2.3.2 Condiciones ambientales de los sitios de colecta de *C. yucatanensis* en ambas épocas y en las tres localidades

Durante los meses de colecta se tomaron los registros de las condiciones ambientales (temperatura y humedad), con el apoyo del biólogo Francisco Chi May, de las tres localidades y se observaron variaciones en relación a la época y al sitio de colecta. Los datos de temperatura y humedad se nos presentan en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Condiciones ambientales de los meses de secas (noviembre-enero) y lluvias (mayo-julio) de las colectas de individuos de *C. yucatanensis* en el estado de Yucatán.

Localidad	Época de secas		Época de lluvias	
	Temperatura Máxima	Humedad (%)	Temperatura Máxima	Humedad
Oxkutzcab	23.7°C	81.71	34.9°C	93.37
Sierra Papacal	33.0°C	77.0	34.0°C	94.6
Yaxcabá	30.0°C	83.5	35.0°C	93.49

Fuente: weatherspark.com Bio Francisco Chi May

Las temperaturas en Oxkutzcab fueron desde 23.7°C con un 81.71% de humedad en la época de secas hasta los 39.4°C con 93.37% de humedad en la época de lluvias, es decir, un incremento de 11.2°C en la temperatura y 11.99% en la humedad.

En Sierra Papacal la temperatura durante los meses de secas se registró en 33°C y 77% de humedad, mientras que durante la temporada de lluvias se registraron temperaturas de 34°C y una humedad de 94.6%, es decir, un incremento de 1°C en la temperatura y 17.6% en la humedad.

En la localidad de Yaxcabá se registró durante la temporada de secas una temperatura máxima de 30°C y una humedad de 83.5%, mientras que en temporada de lluvias se registraron temperaturas máximas de 35°C y una humedad de 93.4%, es decir un incremento en la temperatura de 5°C y 9.9% en la humedad.

2.3.3 Análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC de las colectas de *C. yucatanenses*

Se analizaron por HPLC los extractos de ACE/MeOH de cada uno de los individuos que se obtuvieron en las colectas de las épocas de secas (Anexos) (noviembre-enero) y lluvias (Mayo-Julio). Los resultados obtenidos muestran una alta cantidad de compuestos de alta a baja polaridad dependiendo de la zona y la época en que fueron colectadas, siendo la época de lluvias y las muestras de Oxkutzcab las que presentaron mayor complejidad (Figura 2.1).

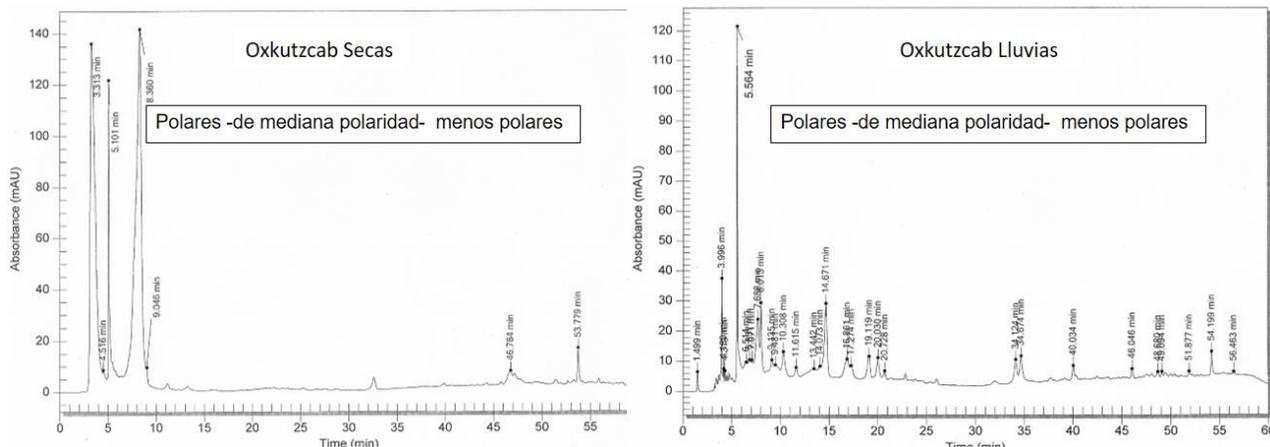


Figura 2.1 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Oxkutzcab durante las épocas de secas y lluvias

En la figura 2.1 observamos la comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de los individuos de Oxkutzcab en ambas épocas colecta. En el perfil cromatográfico de secas podemos observar la presencia de compuestos polares mayoritarios, nula presencia de compuestos de mediana polaridad y compuestos minoritarios de baja polaridad. En el perfil del individuo de la época de lluvias de la misma localidad vemos un incremento de los compuestos polares, la presencia de compuestos de mediana polaridad y un incremento de compuestos minoritarios de baja polaridad, es decir, que el individuo de Oxkutzcab muestra incrementos en la producción de compuestos totales durante la temporada de lluvias.

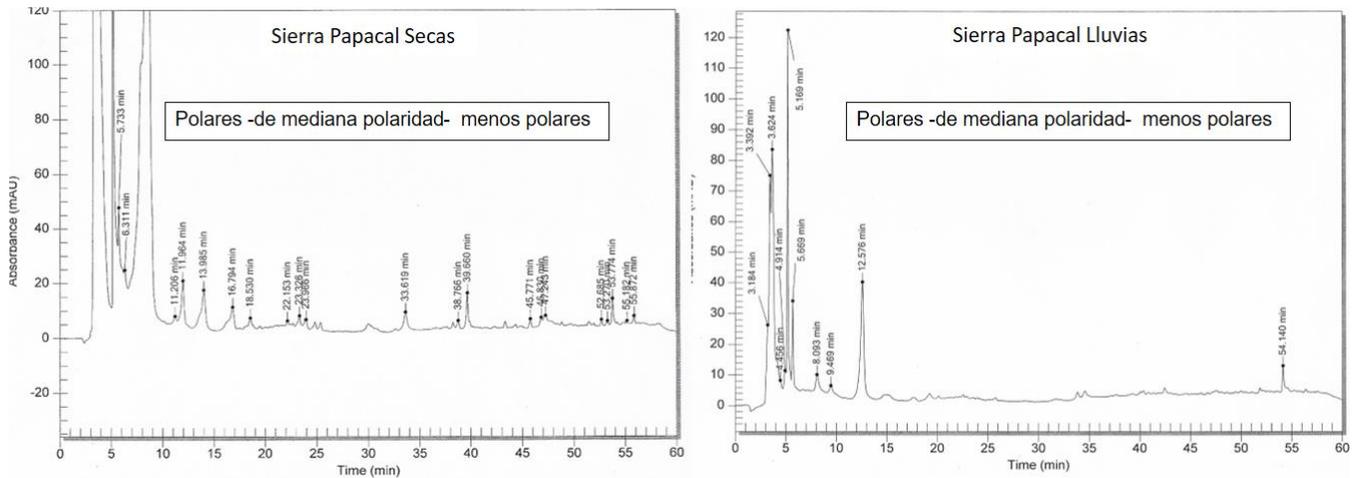


Figura 2.2 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas y lluvias

En la figura 2.2 podemos observar la comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Sierra Papacal durante ambas épocas. En el perfil cromatográfico de la época de secas observamos la presencia de compuestos polares, presencia de compuestos de mediana polaridad y la presencia de compuestos minoritarios de baja polaridad. Durante la época de lluvias observamos un comportamiento diferente en donde aumenta la presencia de compuestos polares, sin embargo, la cantidad de compuestos de mediana y baja polaridad disminuye.

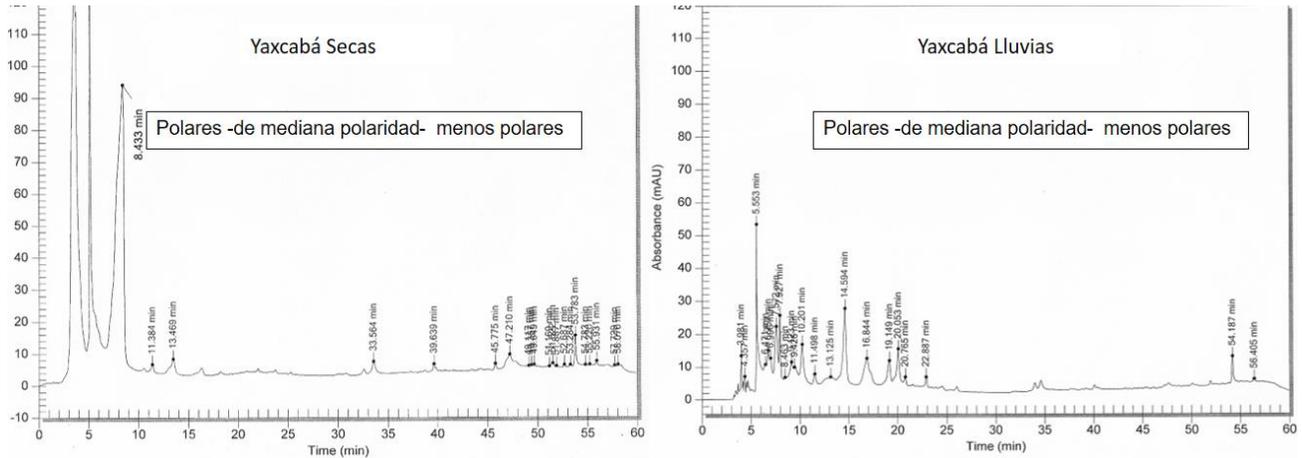


Figura 2.3 Comparación de los perfiles cromatográficos por HPLC de la localidad de Yaxcabá durante la época de secas y lluvias

En la figura 2.3 se muestra la comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de la localidad de Yaxcabá. En la época de secas observamos la presencia de compuestos polares, baja presencia de compuestos de mediana polaridad y la presencia de compuestos minoritarios de baja polaridad. Durante la época de lluvias observamos un aumento de la presencia de compuestos polares, y una disminución notable en la producción de compuestos de mediana y baja polaridad en relación a la época de secas.

2.3.4 Análisis de los perfiles cromatográficos por CG/EM de las colectas de *C. yucatanenses*

El análisis de los perfiles cromatográficos de gases masas de la fracción hexánica (Baja polaridad) permitió observar una mayor presencia de compuestos en la época de lluvias entre los 15 y 26 minutos en comparación a lo observado en la época de secas. (figura 2.4,2.2.5 y 2.6)

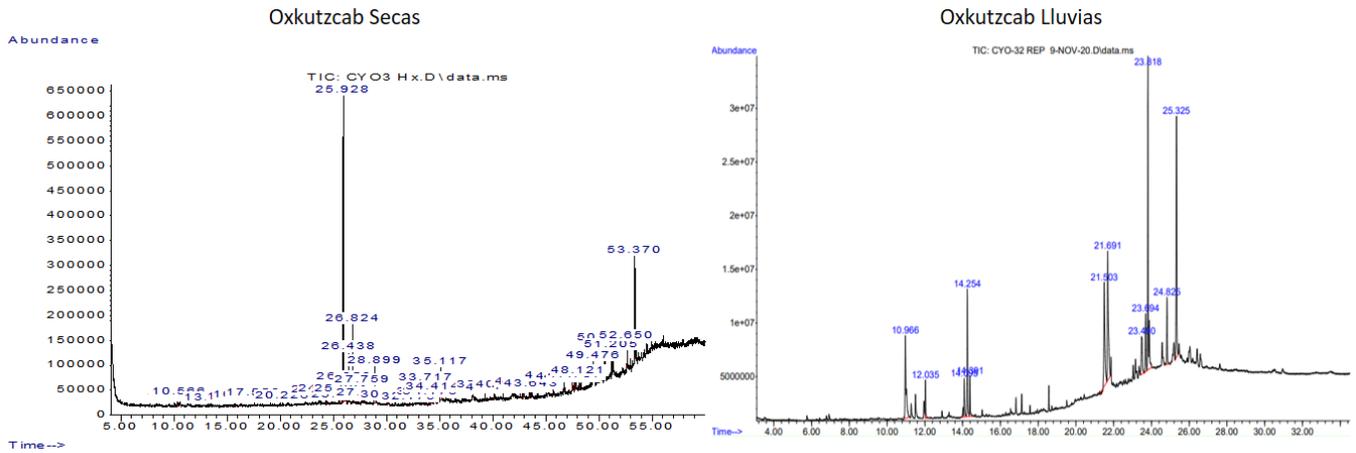


Figura 2.4 Comparación de los perfiles cromatográficos por CG de la localidad de Oxkutzcab durante la época de secas y lluvias

En la figura 2.4 se presenta la comparación de los perfiles cromatográficos por CG de la localidad de Oxkutzcab durante ambas épocas. Durante la época de secas observamos 2 picos mayoritarios con Tr de 25.92 y 53.37 y otros compuestos minoritarios presentes. Durante la época de lluvias observamos un incremento en la cantidad de compuestos mayoritarios, en comparación a la época de secas, principalmente las señales con Tr de 23.31 y 25.32 min.

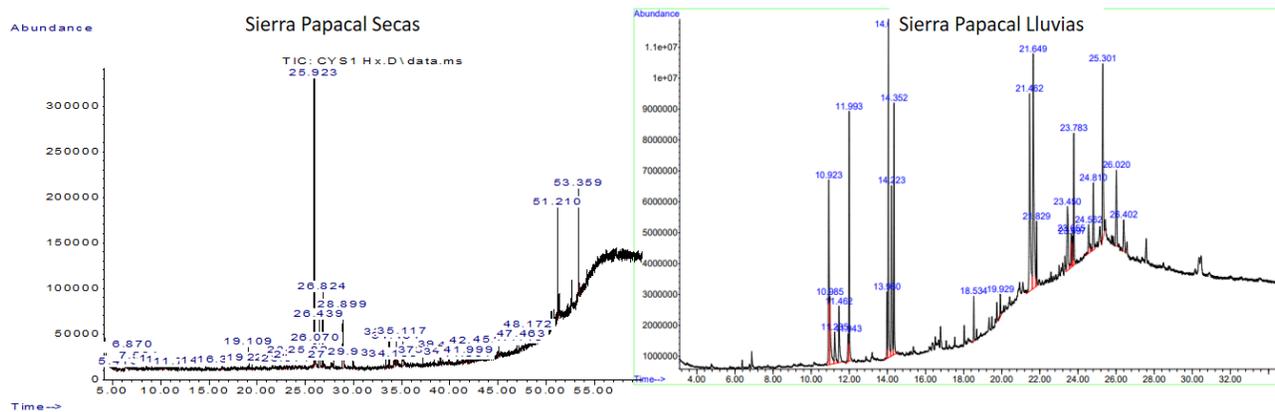


Figura 2.5 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas y lluvias

En la figura 2.5 se presenta la comparación de los perfiles cromatográficos por CG de la localidad de Sierra Papacal durante ambas épocas. En la época de secas podemos observar la presencia de 3 compuestos mayoritarios con Tr de 25.92, 51.21 y 53.35 min y otros compuestos minoritarios. Durante la época de lluvias observamos un incremento notable de los compuestos mayoritarios, en comparación de lo observado en secas, principalmente los que presentaron Tr de 14.1, 21.64 y 25.30 min.

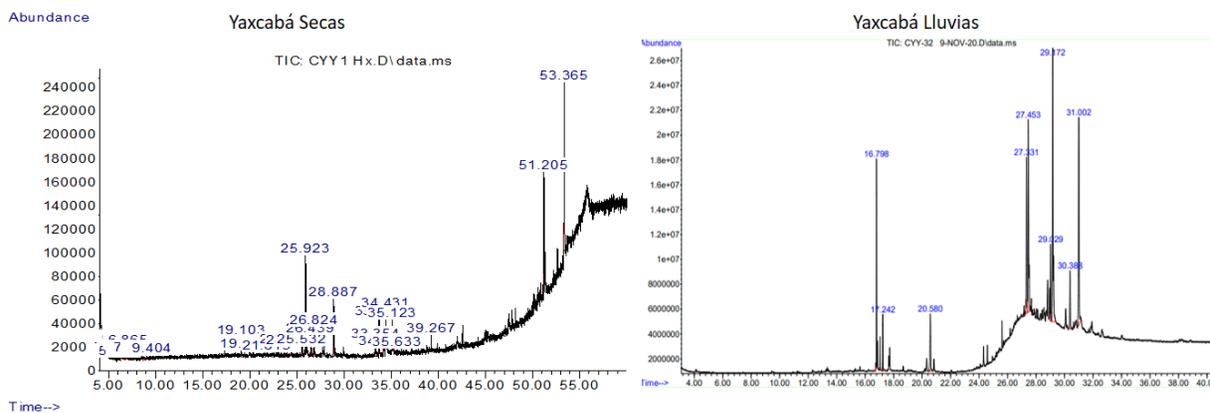


Figura 2.6 Comparación de los perfiles cromatográficos por CGM de la localidad de Yaxcabá durante la época de secas y lluvias

En la figura 2.6 se presenta la comparación de los perfiles cromatográficos por CG de la localidad de Yaxcabá durante ambas épocas. En la época de secas podemos observar la presencia de 3 compuestos mayoritarios con Tr de 25.92, 51.20 y 53.36 min y otros compuestos minoritarios. Durante la época de lluvias observamos un incremento notable de los compuestos mayoritarios, en comparación de lo observado en secas, principalmente los que presentaron Tr de 27.45, 29.72 y 31.00 min.

Este comportamiento que se observa en los perfiles cromatográficos por CG de los extractos hexánicos es similar al que pudimos observar en los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos MeOH, un incremento notable en la cantidad de compuestos totales. Este incremento en la producción de compuestos parece relacionarse con los cambios ambientales de temperatura y humedad observados entre las épocas de colecta

2.3.5 Compuestos identificados en los extractos hexánicos de *C. yucatanensis* durante las épocas de secas y lluvias.

En el cuadro 2.3 se presentan los compuestos identificados con mayor porcentaje de similitud en cada localidad durante la época de secas, sin embargo, se presentaron compuestos con alto porcentaje de similitud que pudieron ser registrados en dos o hasta tres localidades en la misma época. En Oxcutzcab y Sierra Papacal observamos la presencia de neofitadieno; sin embargo, no se encontró presencia de este compuesto en la localidad de Yaxcabá. En el caso del β -sitosterol éste se registró en Oxcutzcab y Sierra Papacal. La vitamina E se observó en las tres localidades. Por último, se observó la presencia del ácido hexadecanoico en Sierra Papacal y en Yaxcabá mientras que no se detectó su presencia en la localidad de Oxcutzcab.

Cuadro 2.3 Compuestos de *C. yucatanensis* identificados en los extractos Hx de las colectas de la época de secas

Oxkutzcab (secas) % de área	Similitud	Sierra Papacal (Seca)	Similitud	Yaxcabá (Secas)	Similitud
Neofitadieno	94%	Neofitadieno	91%	Vitamina E	98%
β -Sitosterol	93%	Vitamina E	98%	β -Sitosterol	95%
Stigmasta-3,5-dieno	99%	Ácido Hexadecanoico Metil ester	97%	Ácido hexadecanoico	98%
17-pentatriaconteno	91%	β -Sitosterol	92%	Ácido octadecanoico	99%
Vitamina E	98%	Limoneno	95%		
Ácido octadecanoico metil ester	98%				
Metil éster del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	96%				
3, 7, 11, 15-tetramethyl-2-hexadeceno	93%				

En el cuadro 2.4 observamos los compuestos con mayor porcentaje de similitud que se observaron en la época de lluvias en los tres lugares de colecta. En Oxkutzcab; Yaxcabá y Sierra Papacal observamos la presencia de fitol. El éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico se presenta en Oxkutzcab y Sierra Papacal; sin embargo, no se detectó en Yaxcabá. La Vitamina E se presentó en las tres localidades. Por último, se registró la presencia del Sitosterol únicamente en las localidades de Oxkutzcab y Yaxcabá.

Cuadro 2.4 Compuestos de *C. yucatanensis* identificados en los extractos Hx de las colectas de la época de lluvias

Oxkutzcab (Lluvias)	Similitud	Sierra Papacal (Lluvias)	Similitud	Yaxcabá (Lluvias)	Similitud
Ácido Hexadecanoico Metil ester	99%	9-Octadecanoico	90%	Fitol	99%
9,12,15- Ácido octadecatrienoico Metil ester	99%	Vitamina E	99%	Vitamina E	99%
Fitol	99%	Ácido Palmitoleico	95%	B-Tocopherol	99%
Ácido octadecanoico Metil ester	99%	Eicosano	99%	α-Tocopherol	99%
Vitamina E	99%	Ácido Hexadecanoico Metil ester	98%	Stigmasterol	97%
B-Tocopherol	99%	9,12-Ácido Octadecadienoico	99%	Γ-Sitoesterol	99%
Stigmasterol	97%	Linoleato de 2-cloroetilo	99%	B-Sitoesterol	95%
Γ-Sitoesterol	99%	9,12,15- Ácido Octadecatrienoico metil ester	99%		
B-Sitoesterol	94%	Fitol	99%		
		Nanocosano	99%		

La presencia y ausencia de ciertos compuestos durante determinadas épocas y en determinadas localidades sugiere que se producen en situaciones específicas de estrés abiótico provocadas por las variaciones observadas durante las colectas. Los resultados indican que la producción de MS puede verse influenciada por condiciones específicas

como temperatura y humedad provocando diferentes respuestas dependiendo de las condiciones espacio temporales.

2.4 DISCUSIÓN

Las variaciones en la producción observadas en cada colecta sugiere que esto podría estar relacionado a condiciones del ambiente que estimulen la producción de dichos metabolitos, como sugiere Waterman y Mole en 1994 que indican que la producción de los MS, está influenciado por el genotipo de la planta (la especie y la variedad), las características ambientales (la radiación solar y la disponibilidad de agua), la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Según Norton (1997), los factores ambientales que mayor incidencia tienen en el contenido de taninos son la estación climática, la humedad ambiental y la luminosidad por lo cual es importante determinar cuál es la época donde las condiciones ambientales favorecen la producción de los MS que poseen la actividad antiviral (Santacoloma, et al, 2012).

El cuadro 2.5 se presenta un resumen de las condiciones del ambiente y de los Tr de los compuestos encontrados en las colectas obtenidos por HPLC y CG-EM. El análisis de los datos presentados en la sección XX de este capítulo no indica que el estrés abiótico es responsable de la disminución de la producción y rendimiento de plantas medicinales como señala Li en el 2020.

Cuadro 2.5 Resumen de las Condiciones ambientales de cada sitio, rendimiento de los extractos MeOH y los Tr de los componentes mayoritarios observados por HPLC y CG-EM

Sitio y época de colecta	No. Individuo	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Rendimiento extracto MeOH (%)	Tiempo de Retención (min) de componentes de Ex. AcN/MeOH	Tiempo de Retención (min) de componentes de Ex. Hx
Oxcutzcab Secas	1	23.7	81.71	6.98 g	3.31, 5.10, 8.36	25.92, 50.56, 53.36
	2			7.62 g	3.60, 3.31, 8.02, 8.65 12.17	25.92, 56.35
	3			6.45 g	3.78 4.28 5.27, 8.36 9.00 12.88	25.92, 53.37
Oxcutzcab Lluvia	1	34.9	93.37	19.17 g	3.99, 5.56	10.93, 21.46, 21.65, 23.79
	2			21.94 g	5.38	10.92, 21.46, 21.65
	3			18.35 g	5.65	10.96, 14.25, 21.50, 21.69, 23.81, 25.32
Sierra Papacal Secas	1	33.0	77	5.07 g	3.39, 5.15, 5.73, 8.60	25.92, 52.21, 53.35
	2			3.46 g	3.55, 3.73, 5.11, 8.02 8.65	25.92 51.20 53.35
	3			3.53 g	3.60, 5.16, 5.86, 7.95, 8.63	25.92 51.21 53.36
Sierra Papacal Lluvia	1	34.0	94.6	11.41 g	3.39, 3.62, 5.16, 5.66, 12.57	10.92, 11.99, 14.05, 14.22, 14.35, 21.46, 21.64, 23.30, 23.78
	2			10.69 g	3.30, 3.51, 3.64, 5.09, 5.41 12.15	10.11, 12.52, 19.91, 23.76
	3			11.76 g	5.20	10.92, 14.05, 14.22, 14.34, 21.46, 21.65, 23.30
Yaxcabá Secas	1	30.0	83.4	15.59 g	3.52, 5.12, 8.43	25.92, 28.88, 51.20, 53.36
	2			9.78 g	3.37, 3.72, 5.11, 8.41	25.92, 28.88, 51.20, 53.36
	3			17.24 g	3.56, 3.73, 5.11, 6.15, 7.18, 8.38	25.92 28.88 51.20 53.36
Yaxcabá Lluvia	1	35	93.49	16.88 g	1.45	10.91, 14.05, 14.22, 21.45, 21.65, 25.29, 26.40
	2			14.99 g	5.55	16.79, 17.23, 20.56, 27.45, 27.33, 29.16, 30.99
	3			15.07 g	5.45 14.81	16.79, 27.33, 27.45, 29.17, 31.00

El comportamiento de esta especie en ambas épocas sugiere cómo esta especie responde a su ambiente en tiempo y espacio y como la composición química varía en respuesta a estas condiciones.

En la localidad de Oxcutzcab se dio un notable incremento en la temperatura y en la humedad entre épocas lo cual se vio reflejado en el rendimiento en cada uno de sus individuos, lo cual sugiere que la disminución en la disponibilidad de agua durante la temporada de secas fue un factor fundamental en la reducción de producción de biomasa. Este comportamiento en la disminución de la producción de biomasa se ha observado en coníferas por la ineficiencia de los cloroplastos causando una reducción en la expansión foliar (Wahid *et al.*, 2007), la baja difusión (Pinheiro y Chaves, 2011) de CO₂, disminución en la fotosíntesis y en la conductancia estomal (Mena-Petite *et al.*, 2000; Bigras, 2005).

En cuanto a los componentes observados por HPLC de los extractos metanólicos es posible observar ciertos Tr como el que aparece a 3.31min, que se presentan en más de un individuo, así como una disminución de la presencia de compuestos de baja polaridad (hidrofóbicos). En los extractos Hx por CG/EM observamos un aumento en los compuestos en la época de lluvias en un rango de 10 min a los 24 min. Cabe destacar la presencia mayoritaria del compuesto con Tr de 25.92 min en la época de secas, lo que sugiere que juega un papel importante en la resistencia al estrés por sequía ya que no se encuentra presente en la época de lluvias.

En la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas observamos altas temperaturas (33°C) acompañadas de un bajo porcentaje de humedad (77%) que se refleja en un bajo rendimiento en los tres individuos a diferencia de lo que se puede observar en la época de lluvias, esto puede deberse a que uno de los principales procesos afectados por el estrés hídrico es la fotosíntesis (Espinoza y Vallejo 2019), lo que se refleja en reducción del área foliar y del número total de hojas, de la transpiración, de la concentración intercelular de CO₂ y de la eficiencia de carboxilación, tal es el caso de *Populus cathayana* (Xu *et al.*, 2008). Esto podría explicar porque se registró un bajo rendimiento en la esta localidad.

Por otro lado, en los perfiles cromatográficos por HPLC se observó una menor presencia en los compuestos no polares en el periodo de secas y un aumento en los compuestos de

menor polaridad. Se observa que los compuestos polares en el rango de los 3 min y 5 min incrementan su producción en los tiempos de lluvias mientras que los de baja polaridad aumentan su presencia en la época de secas. Cabe señalar que el aumento en las temperaturas también afecta la tasa de fotosíntesis, uno de los procesos metabólicos principales, y en consecuencia la producción de biomasa (Farooq et al., 2009)

Los perfiles cromatográficos de CG-EM de esta localidad en la época de secas muestran de nuevo al compuesto con Tr de 25.92 min, antes reportado en la localidad de Oxcutzcab, lo que sugiere que está relacionado a la tolerancia al estrés por sequía al igual que los compuestos que se observan en el rango de los 50 y 54 min. En la época de lluvias se puede observar un notable incremento en los compuestos mayoritarios presentes en un rango de 10 a 21 min.

El bajo rendimiento de esta localidad parece relacionarse a bajos niveles de humedad a los que se atribuye una disminución del potencial de turgencia y cierre de estomas, lo que provoca que las diferencias en la presión de turgencia generen un área foliar menor para plantas, deshidratación celular, una reducción en el metabolismo y la alteración de la mitosis (Taiz y Zeiger, 2010; Farooq et al., 2009; Balaguera *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con lo que indica Davies y Zhang (1991), quienes documentan que potenciales hídricos muy negativos reducen el área foliar y aceleran la senescencia de hojas maduras. El déficit hídrico no sólo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por bajas temperaturas y por una elevada salinidad del suelo. Estas condiciones, capaces de inducir una disminución del agua disponible del citoplasma de las células, también se conocen como estrés osmótico (Levitt, 1980) y causan una disminución en la producción de biomasa, sin embargo, aumenta la producción de MS relacionados con la tolerancia a sequias.

La localidad de Yaxcabá presenta un comportamiento similar, es decir, se observan incrementos en la temperatura y en la humedad entre las épocas de secas y lluvias lo cual se reflejó en un aumento en el rendimiento. El aumento de biomasa en la zona y su relación con el incremento de la humedad, así como los resultados obtenidos en las localidades nos indica la gran importancia del agua en las plantas, por lo que se puede considerar que una cantidad limitada o excesiva de agua constituye un factor inductor de situaciones adversas o estresantes.

Se ha observado que durante la época de lluvias la disponibilidad de agua en las plantas aumenta y debido a sus propiedades polares, tiene gran influencia en la estructura y la estabilidad de moléculas tales como proteínas, polisacáridos y otras (Kirkham, 2005). Una lista de los procesos que son regulados por el volumen celular y la hidrodinámica como el crecimiento y proliferación, exocitosis, endocitosis, cambios en la forma celular, señalización de hormonas, metabolismo, excitabilidad, migración celular, obtención de nutrientes, filtración de desechos, necrosis y apoptosis (Wehner et al., 2003; Zonia y Munnik, 2007)

Por otro lado, la temperatura también es otro factor que causa estrés hídrico en las plantas, lo cual afecta la producción de metabolitos porque un incremento en la temperatura aumenta la evapotranspiración lo que lleva a la pérdida de agua. El estrés ocasionado por temperatura es uno de los principales factores que limitan la fotosíntesis de muchas especies de plantas, la supresión del crecimiento está relacionada con cambios en los procesos fisiológicos incluyendo las relaciones hídricas (Morales *et al.*, 2006).

El cuadro anterior también nos muestra los Tr de los compuestos que se presentaron en Sierra Papacal en época de secas, es similar al observado la localidad de Oxcutzcab. Los compuestos polares observados en los perfiles cromatográficos por HPLC presentan un aumento en la producción en la época de lluvias, también observamos una mayor producción de compuestos de baja polaridad en la época de secas. Estos nos indica que los compuestos de mediana y baja polaridad muestran relacionarse a la tolerancia al estrés por temperatura. Los perfiles cromatográficos por CG-EM muestran un aumento notable en la producción de compuestos de baja y media polaridad, destacándose el Tr de 25.92 min el cual ha sido reportado en otras localidades en la época de secas mientras que en la época de lluvias encontramos un aumento en la producción en el rango de 10 a 20 min.

El análisis de resultados obtenidos en este estudio confirma que el agua es un recurso indispensable para todas las funciones de las plantas, una adecuada humedad en el suelo proporciona buen desarrollo de éstas y mayor ganancia de biomasa, mientras que la

deficiencia de agua repercute en la alteración de procesos fisiológicos y disminución del rendimiento (Moreno, 2009; Salisbury y Ross 2000).

En el cuadro 2.6 se observan los compuestos presentes en las muestras Hx identificados por CG-EM en las distintas épocas y sitios de colecta. Con los resultados obtenidos podemos analizar más a fondo como esta especie responde a los estímulos externos ocasionados por el estrés abióticos en distintas épocas. Este cuadro nos permite observar qué compuestos están más relacionados con la resistencia a cambios térmicos o de humedad.

Cuadro 2.6 Componentes de extracto Hx de las muestras colectadas en distintas regiones de Yucatán durante la época de secas, identificados por GC-MS

Sitio de Colecta	Tiempo de Retención (min) de Ex. Hx	Componentes identificados por espectroscopia	Sitio de Colecta	Tiempo de Retención (min) de Ex. Hx	Componentes identificados por espectroscopia	Sitio de Colecta	Tiempo de Retención (min) de Ex. Hx	Componentes identificados por espectroscopia
Oxcutzcab	10.93	Bicyclo-heptano, 2,6,6-trimetil	Sierra Papacal	10.92	Ciclopentaneo	Yaxcabá	10.91	Bicyclo-heptano, 2,6,6-trimetil
	21.46	ácido 1-Pyrrolidinebutanoico		11.99	ácido Hexadecanoico		14.05	ácido 9,12,15-Octadecatrienoico
	21.65	2'-hidroxi-3'-isopropilisobuti rofenonato		14.05	ácido 9,12,15-Octadecatrienoico		14.22	Fitol
	23.79	Vitamina E		14.22	Fitol		21.65	1-Pyrrolidinebutanoic acido
	10.92	Bicyclo-heptano, 2,6,6-trimetil		14.35	Metil estarato		25.29	Sitosterol
	21.46	ácido 1-Pyrrolidinebutanoico		21.46	ácido 1-Pyrrolidinebutanoico		26.40	Vitamina E
	21.65	Silane, diethylpentadeciloxi(1-phe nilpropoxi		21.64	Silano, diethylpentadeciloxi		16.79	Bicyclo-heptano, 2,6,6-trimetil
	10.96	Fitol		23.78	Vitamina E		20.56	Fitol
	14.25	Fitol		10.11	4-O-Methylmannosa		27.45	1-Pyrrolidinebutanoic acido
	21.50	ácido 1-Pyrrolidinebutanoico		12.52	ácido Hexadecanoico		27.33	1-Pyrrolidinebutanoic acido
	21.69	Silane, diethylpentadeciloxi(1-phe nilpropoxi		19.91	1H-Indole		29.16	Vitamina E
	23.81	Vitamina E		14.05	ácido 9,12,15-Octadecatrienoico		30.99	Sitoesterol
	25.32	Sitosterol		23.30	Stigmasterol		16.79	Bicyclo-heptano, 2,6,6-trimetil

En este trabajo se observó que el rendimiento varía en relación a las condiciones ambientales de la localidad aunque también ha mostrado que también provoca variaciones en la producción de compuestos y su concentración, tal es el caso del compuesto con Tr en un rango de 10.91 y 10.93 min identificado como 2,6,6-trimetilbicyclo-heptano, un alcano de cadena ramificado identificados como uno de los principales componentes de las ceras (Leide *et al.*, 2011), las cuales forman parte de la cutícula que utiliza la planta protegerse de la pérdida de agua y la acumulación de agua durante la época de lluvias (Tofolla *et al.*, 2013).

Por otro lado, están los ácidos carboxílicos como el ácido hexadecanoico con un Tr de 11.99 min y el ácido 9,12,15-octadecatrienoico con un Tr de 14.05 min, reportados con propiedades reguladoras del crecimiento o bioestimulantes (Stutte, 1990). Otro compuesto que se presenta continuamente en los tres sitios de colecta es la vitamina E con Tr en el rango de los 23.78 y 29.16min. El alfa-tocoferol, uno de los componentes de la vitamina E, es un potente antioxidante debido a la capacidad de su anillo heterocíclico cromanol de donar el hidrogeno fenólico a los radicales lipídicos (Kamal- Eldin y Appelvisq 1996), también juega un papel importante en la tolerancia al estrés. En plantas resistentes a la sequía se produce un aumento neto de los niveles de este, mientras que en plantas sensibles se produce un aumento inicial seguido de una pérdida neta (Munné-Bosch 2002).

Un análisis más profundo de los resultados indico que, aunque evidentemente los rendimientos aumentaron drásticamente de la época de secas a la época de lluvias lo cual muestra que la humedad está directamente relacionada con el aumento de la producción de biomasa aérea también se puede observar que la cantidad de compuestos que se producen está relacionada directamente al estrés que las condiciones ambientales pueden generar en dicha especie. La diferencia de producción en las localidades podría deberse a que algunas plantas destinan una mayor proporción de fotosintatos a la producción de raíces, aumentando de esta manera la capacidad de absorción de agua, de modo de mantener la turgencia de las hojas frente a la mayor evapotranspiración a la que se ven sometidas las plántulas (Lencinas *et al.*, 2007) y viceversa, cuando las plantas tienen suficiente disponibilidad de agua los fotosintatos se destinan a la producción de

biomasa aérea para incrementar la captación de luz e incrementar la tasa de fotosíntesis. Esto no solo se refleja en la variación del rendimiento, si no, en los compuestos que se producen como respuesta a los estímulos del ambiente.

Esto refuerza la hipótesis del presente trabajo, de que el rendimiento y la producción de compuestos puede verse afectado por cambios en la temperatura y humedad que pueden conducir a diferencias en las características fotosintéticas (Lusk y del Pozo 2002, Martínez Pastur *et al.*, 2007), aumentando la evapotranspiración y provocando cambios en la anatomía de las hojas, y, en consecuencia, en el crecimiento de las plantas (Tognetti *et al.* 1998; Lériada Acosta *et al.* 2003).

CAPÍTULO III. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN BIODIRIGIDA DE LOS COMPONENTES CON ACTIVIDAD ANTI-HEMAGLUTININA PRESENTES EN EXTRACTOS DE HOJA DE *Caesalpinnia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm

3.1 INTRODUCCIÓN

La HA y la NA son los antígenos de superficie de membrana, que participan en la patogenicidad viral y determinan los diferentes subtipos de virus. La HA es la glicoproteína de superficie más abundante en forma de trímero; reconoce receptores específicos de la mucosa respiratoria, permitiendo la adsorción del virus a la célula. (Vivian 2009). Esta es muy importante para el proceso de infección del virus debido a que permite la adsorción viral a receptores celulares que contienen ácido siálico, siendo incorporado a la célula en una vesícula endoplasmática por endocitosis. En la actualidad, se conocen 18 subtipos de HA cuyas variaciones radican en el tipo de aminoácido en los sitios de la proteína. Debido a que la HA es la llave de entrada a la célula huésped, el estudio de moléculas tanto naturales como sintéticas que causen su inhibición es de suma importancia.

Para evaluar el efecto de inhibición sobre la HA el virus de manera indirecta, se emplean los ensayos de hemaglutinación en donde se explora la capacidad del virus de influenza para aglutinar eritrocitos de pavo, pollo o humanos, lo que permite la selección de compuestos activos, sugiriendo un posible mecanismo de acción a nivel de entrada viral. Ejemplo de ello es el caso de un extracto de *Punica granatum* L (granada) sobre el virus de la influenza (Peña *et al.*, 2015). Estudios de hemaglutinación se han sido utilizado anteriormente para evaluar la prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002 (Piñeyro *et al.*, 2010). Diversos grupos de investigación se han enfocado en el aislamiento e identificación de compuestos obtenidos de diversas fuentes (naturales) y sintéticas con actividad anti-HA. *Caesalpinnia yucatanensis* ha demostrado poseer compuestos con actividad anti-HA. En trabajos realizados por el grupo, May-May (2013) y Cetina-Montejo (2014) determinaron la actividad antiviral a nivel cotratamiento de extractos de hojas y corteza del tallo de ésta especie.

En el presente capítulo se discuten los resultados de la actividad anti-HA de extractos de hojas de *C. yucatanensis* obtenidos durante cada fraccionamiento biodirigido partiendo del extracto de ACE. Esto permitió llegar hasta la purificación y elucidación estructural de uno de los ingredientes activos presentes en extractos de hojas de *C. yucatanensis*

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Materiales y reactivos

En el desarrollo del trabajo experimental se emplearon disolventes grado técnico destilados en el laboratorio. Las hojas fueron molidas empleando una licuadora industrial. La eliminación del disolvente del extracto metanólico se realizó en un evaporador rotatorio Büchi R-151. El curso de la separación cromatográfica se siguió mediante cromatografía en capa delgada (CCD), que se llevó a cabo en placas de aluminio impregnadas con gel de sílice 60F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor (Merck). Se emplearon como eluyentes diferentes mezclas de hexano (Hx), acetato de etilo (AcOEt), acetona (An), metanol (CH₃OH), y diclorometano (CH₂Cl₂) según se requirió en cada caso para separar los compuestos presentes en las fracciones. La visualización de los compuestos presentes en la placa se realizó mediante detección ultravioleta empleando una lámpara Mineralight UVGL-25 que emite luz ultravioleta a 254 y 366 nm y por detección química empleando el reactivo de ácido fosfomolibdico (ver Anexo I). Las alícuotas colectadas en cada fraccionamiento se reunieron de acuerdo a la similitud de las manchas visualizadas en las placas cromatográficas. Las columnas cromatográficas de permeación en gel se empacaron con Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). Para las columnas cromatográficas de CLV se empleó gel de sílice grado TLC. Los análisis de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C) uni y bidimensionales, homo y heteronucleares se realizaron en un espectrómetro Varian-Agilent. AR Premium Compac 600 MHz (Santa Clara, USA) con sonda de líquidos 1H-19F/15N-31P 5-mm PGF. Software Vnmrj 4.2. expresando los desplazamientos químicos en partes por millón. Para la disolución de la muestra se empleó cloroformo deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz. Los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent technologies modelo 6890N Network GC system, acoplado a un detector de masas Agilent Technologies modelo 5975B inter MSD

controlado por una computadora HP. Se usó como método una columna no polar Ultra 1 (100 % dimetilpolisiloxano, 25 m x 0.321 D, 0.52 μm de grosor de la película) y como programa de temperatura $T_1 = 120\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos, un gradiente $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a $T_2 = 300\text{ }^\circ\text{C}$ y permanecer a esta temperatura por 10 minutos. Se empleó helio como gas acarreador a un flujo de 1.2 mL/min.

3.2.2 Colecta del material vegetal

El material vegetal se colectó en tres sitios de la península de Yucatán: Oxkutzcab, Sierra Papacal y Yaxcabá como se indica en la sección 2.2.2 del capítulo II

3.2.3 Procesamiento del material vegetal

El material vegetal obtenido fue secado a 40°C durante tres días en un secador ubicado en las instalaciones del CICY. El material seco se molió en una licuadora industrial para disminuir el tamaño de partícula para después ser pesado.

3.2.3 Fraccionamiento

El material seco y molido fue extraído a temperatura ambiente dejándolo reposar con metanol durante 24 horas (se realizó 3 repeticiones sucesivas a cada individuo). Al término de cada extracción, se filtró y concentró a presión reducida en un rotaevaporador a $40\text{ }^\circ\text{C}$. El material molido seco (3.06 kg) fue extraído con MeOH hasta obtener 76.5 g de extracto MeOH.

3.2.4 Partición líquido-líquido de extracto MeOH

38.1 g de extracto MeOH fueron sometidos a una extracción líquido-líquido empleando 168 mL de hexano y 56 mL de ACN: MeOH. La fase Hx se separó empleando un embudo de separación y la fase orgánica ACN:MeOH fue sometida a una segunda extracción con Hx (mL). El proceso se repitió 3 veces y las fracciones fueron secadas en rotaevaporador y transferidas a viales para ser preservadas en refrigeración. Se obtuvieron 11.6 g de extracto Hx y 26.5g de extracto de ACN:MeOH.

3.2.5 Fraccionamiento por CLV del extracto ACN:MeOH

El extracto de ACN:MeOH (26.5 g) se fraccionó por medio de cromatografía líquida al vacío (CLV) con una fase estacionaria de sílica gel (13 cm de ancho x 5 cm de alto) y un sistema de gradiente de Hx-acetona. Se obtuvieron 10 fracciones (figura 3.1) que fueron denominadas CYV-1 a CYV-10. Las fracciones CYV-5 a CYV-7 fueron seleccionadas con base a su actividad antiviral y fueron reunidas para su posterior fraccionamiento biodirigido.

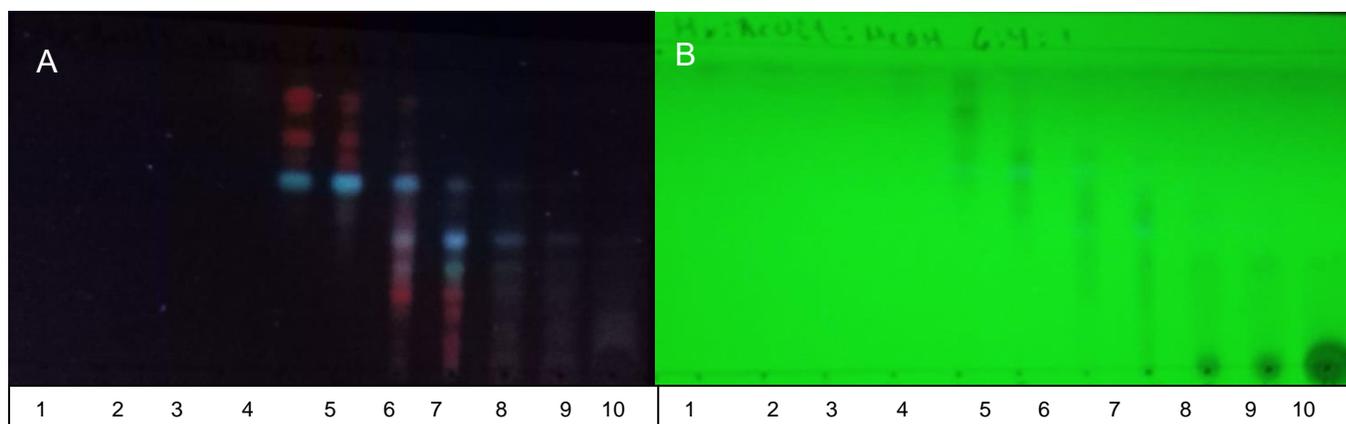


Figura 3.1 Placas cromatográficas de las 10 fracciones obtenidas por CLV vistas en UV a 365 (A) y 254 (B) nm en la cual se observa la presencia de componentes de distinta polaridad. Las fracciones 1 a 6 contienen los componentes de menor polaridad, siendo la 7 a 9 los de mediana polaridad, y la 10 la más polar. Se aprecian bandas de color rojo indicativo de la presencia de clorofila, así como compuestos con fluorescencia azul bajo inspección UV (A).

3.2.6 Cromatografía por permeación en gel (Sephadex LH 20) de CYV-567

La fracción activa denominada “CYV-567” formada por la reunión de las fracciones CYV-5 a CYV-7 fue sometida a una cromatografía de permeación en gel (100 mg) en una columna de 30 cm de altura y 1.5 cm de diámetro, utilizando Sephadex como fase estacionaria y un sistema de hexano: diclorometano: metanol 8:1:1 para la separación por tamaño de partícula. Se obtuvieron 86 fracciones de 2 ml cada una que fueron reunidas de acuerdo a su similitud en CCD dando como resultado 24 fracciones finales. Las

fracciones reunidas (Fracciones A-R) fueron monitoreadas por CCD con un sistema de Hx:Ac 8:2. (Figura 3.2)

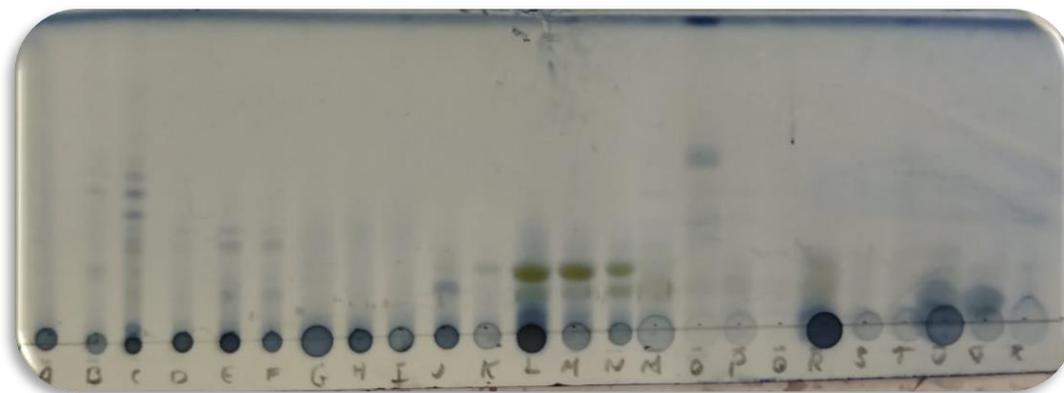


Figura 3.2 Placa cromatográfica de las 24 fracciones (A-X) revelada con ácido fosfomolibdico. Las fracciones se aprecian como bandas de coloración azul oscuro y para el caso de las fracciones L, M y N, como bandas de color amarillo que sugieren la presencia de flavonoides

3.2.7 Cromatografía por permeación en gel (Sephadex LH 20) de la subfracción STM

La fracción STM (constituida por las subfracciones M y N de la sección 3.2.6), fue sometida a una cromatografía(13mg) en una columna de 20 cm de altura y 1 cm de diámetro, utilizando Sephadex LH 20 como fase estacionaria y un sistema de metanol 100% para la separación por tamaño de partícula. Se obtuvieron 86 fracciones de entre 0.6 y 12.4 mg cada una. Las fracciones reunidas fueron monitoreadas por CCD con un sistema de Hx:Ac 8:2. La fracción mostró la presencia de cristales, constituida por un compuesto puro . Dicha fracción denominada ahora como CCG-4851 fue la seleccionada para los estudios espectroscópicos

3.2.8 Datos espectroscópicos y espectrométricos de 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ (ppm): 12.55 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.43(s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.874 (s, 3H), 3.872 (s, 3H)

RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz,) δ (ppm): 178.79 (C-1), 165.59 (C-2), 156.71 (C-3), 155.30 (C-4), 152.00 (C-5), (C-6), 149.17 (C-7), 125.92 (C-8), 108.52 (C-9), 105.01 (C-10), 97.92 (C-11), 92.15 (C-12), 65.81 (C-13), 61.09, (OCH₃), 60.30 (OCH₃), 56.05 (OCH₃), 55.08 (OCH₃), 15.23 (C-14).

CG-EM m/z [M+1+]= 374.2 uma

3.2.9 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA)

La cepa del virus de influenza fuero proporcionada por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, siendo la cepa A/Yucatán/Indre. Se realizó el ensayo de IHA para evaluar si las fracciones de *C. yucatanensis* inhiben la actividad de hemaglutinación. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos (fondo U). Cada fracción se diluyó en PBS (concentraciones de 100 a 12.5 µg/mL), mezclado con 4 unidades de virus (cepa AH1N1 2370) e incubado durante 1 h a 4 ° C. Luego, se agregaron 50 µL de una suspensión de glóbulos rojos de pava al 1% (RBC) y se incubaron durante 1 h a 4 ° C. Se incluyeron los siguientes controles: Control viral, control negativo, control del compuesto.

3.2.10 Porcentaje de inhibición de la HA

Para obtener el porcentaje de inhibición de HA de los bioensayos se sometieron las muestras a un lector de placas xMark BIO RAD a una longitud de onda de 700 nm para medir la absorbancia de las reacciones biológicas y así cuantificar la actividad inhibitoria. Los datos generados por el equipo fueron analizados mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ IHA} = ((\text{DO}_F - \text{DO}_V) / (\text{DO}_E - \text{DO}_V)) * 100$$

Donde:

DO_F = Densidad óptica de las fracciones

DO_V = Densidad óptica del virus

DO_E = Densidad óptica de los eritrocitos

Los datos finales fueron usados para la construcción de una gráfica de barras de las fracciones con mayor actividad inhibitoria.

3. RESULTADOS

3.1 Rendimientos de extractos crudos obtenidos para el aislamiento biodirigido

A partir de 3.06 Kg de material molido seco de *C. yucatanensis* se obtuvo 76.5 g de extracto MeOH. El extracto MeOH fue particionado con Hx y ACN:MeOH en una proporción de 3:1:1 En el cuadro 3.1 se observan los rendimientos obtenidos a partir de 38.1g de extracto MeOH de hojas de *C. yucatanensis*, en donde la fracción de ACE/MeOH obtuvo el doble de rendimiento respecto a la fracción de baja polaridad.

Cuadro 3.1 Resultados de la partición masiva de la muestra Hx:ACE:MeOH 3:1:1

Extracto MeOH	Fracción (g)	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
38.1 g	ACE	26.5	69.81
	Hx	11.6	30.44

3.3.2 Evaluación de las fracciones obtenidas de la CLV de la partición de ACE

La actividad anti-hemaglutinina de las fracciones de CLV fueron evaluadas en el ensayo de IHA a concentraciones de 100, 50, 25, y 12 µg/mL. Este ensayo se realizó con la cepa A/Mexico/INDRE797/10 (H1N1pdm09) resistente a oseltamivir. Los resultados se observan en la Cuadro 3.2

Cuadro 3.2 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación de las fracciones de CLV

Inhibición de la Hemaglutinación de Eritrocitos										
µg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	-	±	-	±	±	+	±	-	-	-
50	-	-	-	±	±	+	±	-	-	-
25	-	±	-	-	±	±	±	-	±	-
12.5	-	-	-	-	-	±	+	-	-	±

Como se observa en el cuadro 3.2 después de un periodo de incubación de 30 min con el virus, fracciones y eritrocitos, las fracciones 5, 6 y 7 fueron las que mostraron actividad inhibitoria de la HA viral, es decir, fueron capaces de unirse a la proteína viral HA impidiendo que esta se uniera a los receptores de ácido sialico de los eritrocitos y pudieran precipitarse por lo cual observaríamos un punto rojo en el fondo del pocillo que indicaría un resultado positivo (+) caso contrario es la ausencia de un precipitado de los eritrocitos en el pocillo lo cual significaría que el compuesto no se une a la proteína del

virus lo cual indicaría un resultado negativo (-). También se presentan pocillos en donde el precipitado de eritrocitos se da de forma parcial (\pm) lo que nos indica que el compuesto no puede inhibir totalmente al virus a dicha concentración.

En la columna E, que corresponde a la fracción 5, a una concentración de 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$ se observó actividad inhibitoria de la HA parcial (\pm) mientras que en la columna "F" que corresponde a la sexta fracción se observa actividad inhibitoria (+) a 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$ mientras que a 25 observamos actividad inhibitoria parcial (\pm) mientras que a 12.5 $\mu\text{g/mL}$ no se observó actividad (-) por último, en la columna "G" que corresponde a la séptima fracción se observa actividad parcial (\pm) a 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$ y una nula (-) actividad a 12.5 $\mu\text{g/mL}$

Basados en el bioensayo de inhibición de la hemaglutinación se seleccionaron las muestras que presentaron mejor actividad y se unificaron en la fracción activa F-567 para continuar los procesos de fraccionamiento basados en otras técnicas cromatográficas. En la figura 3.3 se observa la placa revelada con ácido fosfomolibdico en donde se aprecia la presencia de múltiples bandas, también observamos una vista a 254nm en donde se presenta una banda que presenta una fluorescencia en azul en la fracción 6 y por ultimo una vista a 365nm en donde observamos 3 bandas que florecen en color azul, siendo más intensa en la fracción 6, a la misma altura en las tres fracciones y una serie de bandas rojas indicando la presencia de clorofilas en la muestra.

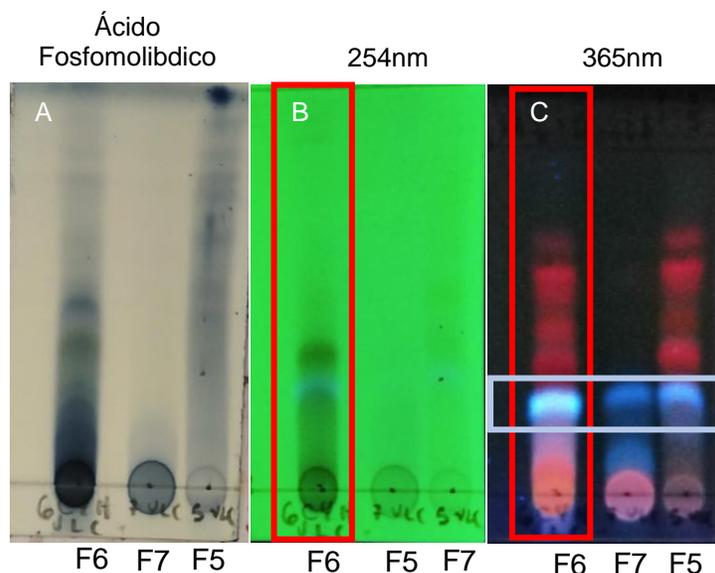


Figura 3.3 Placas cromatográficas de la cromatografía líquida al vacío de las fracciones 5,6 y 7 vistas en UV a 365, 254 nm y vistas con ácido fosfomolibdico en la cual se observan la presencia de 3 componentes principales, bandas con fluorescencia azul y bandas de color rojo indicativo de presencia de clorofilas.

3.3.3 Evaluación de fracciones obtenidas de F567 por columna de permeación en gel (Sephadex LH-20)

La muestra activa F-567 al ser fraccionada por una cromatografía por columna de sephadex resulto en 24 sub-fracciones, estas fueron evaluadas por el bioensayo de hemaglutinación mostrando resultados positivos para las subfracciones A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L Y M. (Figura 3.6)

En la figura 3.4 observamos actividad inhibitoria en las fracciones B, C, J, K, L y M siendo la fracción J la que presento actividad inhibitoria (+) a las cuatro concentraciones (100, 50, 25 y 12.5 µg/mL), para la fracción B observamos actividad inhibitoria (+) a 50, 25 y 12.5 µg/mL. Para la fracción C resultados positivos a 25 y 12.5 µg/mL y actividad parcial a 50 µg/mL. La fracción K muestra resultados positivos a 100 y 50 µg/mL y resultados parciales a 25 µg/mL y por ultimo las fracciones L y M presentan resultados positivos (+) a 100 y 50 µg/mL convirtiéndolas en las mejores opciones para continuar con el fraccionamiento.

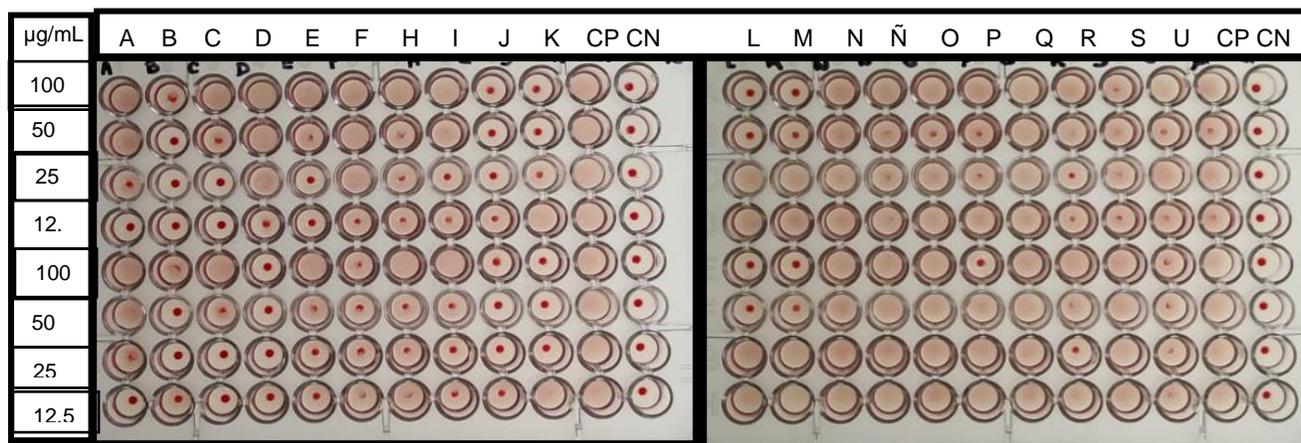


Figura 3.4 Placas del ensayo de hemaglutinación de las sub-fracciones de CY-567

CV= control viral, únicamente virus y células

CN= control negativo= Glóbulos rojos

3.3.4 Evaluación de la fracción CCG-4851 por columna de permeación en gel (Sephadex LH-20)

La muestra activa CCG-4851 al ser fraccionada por una cromatografía por columna de Sephadex se evaluó por el bioensayo su actividad inhibitoria, obteniendo resultados positivos a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.5)

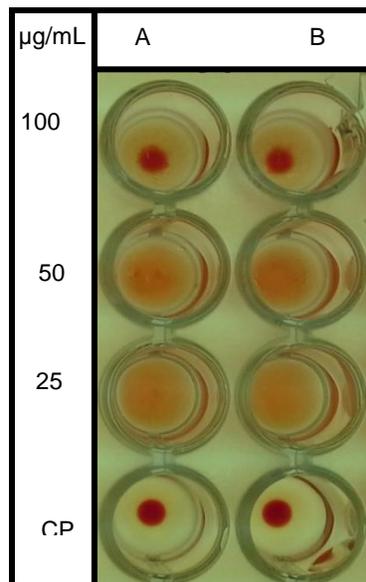


Figura 3.5 Placa del ensayo de hemaglutinación de las sub-fracciones de CCG-4851

CN= control negativo= Glóbulos rojos

3.3.5 Caracterización del componente activo :5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxy-4h-cromen-4-ona)

En el espectro de RMN- H^1 del componente activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxy-4h-cromen-4-ona) se observan 4 señales de metoxilos con un desplazamiento (δ) a 4 ppm, 3.93 ppm, 3.872 ppm y 3.874 ppm, respectivamente. Además, se observó que uno de los singuletes corresponde a un protón quelatado que aparece desplazado a campo bajo (12.56 ppm) lo cual indica su posible interacción con un átomo de oxígeno. Los otros singuletes a campo más alto indican los carbonos aromáticos (δ 7.34 ppm, 7.33 ppm, 6.44 ppm, 6.36 ppm y 5.88 ppm) (figura 3.6)

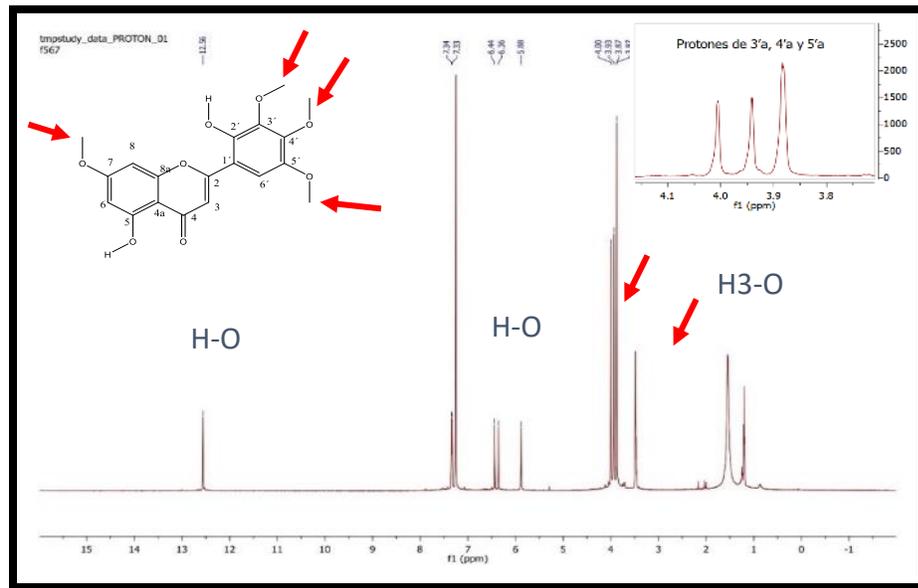


Figura 3.6 Espectro de RMN-H¹ del compuesto activo con la estructura de 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) indicando las señales de los protones oxigenados

Con el espectro de RMN-C¹³ se confirmó la presencia de carbonos unidos a oxígeno que presentaron desplazamiento (δ) 61.09 ppm, 60.3 ppm, 56.05 ppm y 55.8 ppm (Figura 3.7)

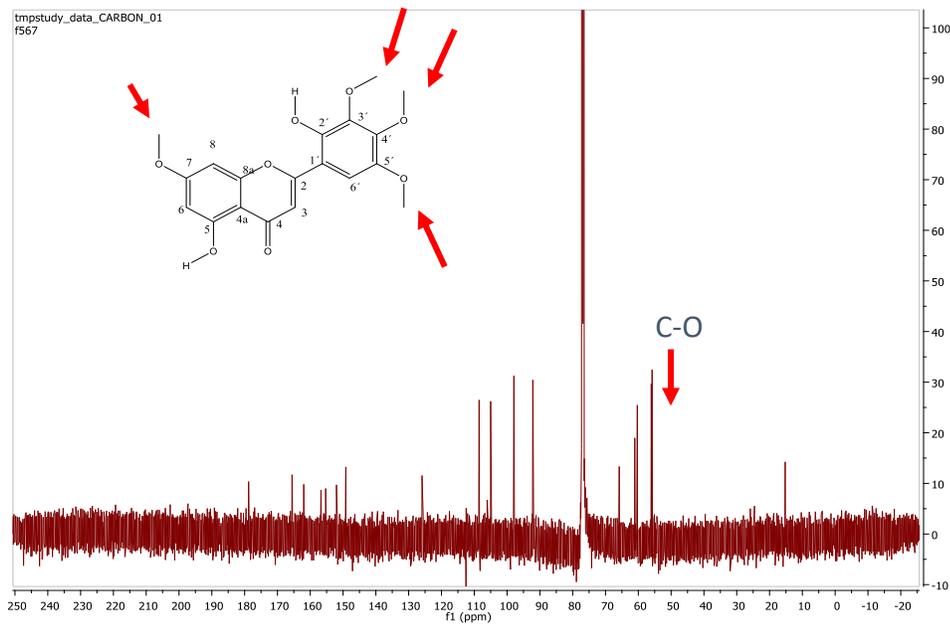


Figura 3.7 Espectro de RMN-C¹³ del compuesto activo con la estructura de 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) indicando las señales de los carbonos oxigenados

Con el espectro de HSQC se asignaron algunos de los protones unidos directamente a carbono, como el protón H-3 (7.32) a C3 (108.52) que es un metino y los protones unidos a oxígeno protón 7 (3.872) a C7 (55.8) (figura 3.8 y cuadro 3.2)

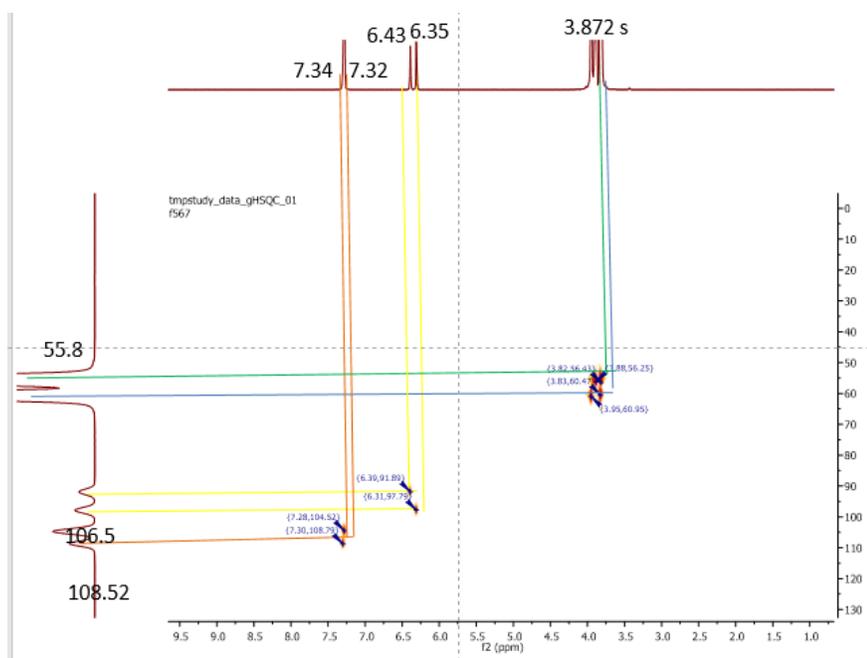


Figura 3.8 Ampliación del espectro de HSQC del compuesto activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) indicando la relación directa entre protones y carbonos

Las correlaciones encontradas fueron observadas entre los protones vinílicos H-3(7.34) con el carbono 2(125.92) y el carbono 1'(148.90); el protón H-6 (6.35) que correlaciona a dos enlaces con el C7 (165.59) y a tres enlaces con el C8 (92.15) también se observa una

correlación del protón H-5 (12.55) que es el protón de alcohol con el C5 a dos enlaces y a 3 enlaces con el C4a y a su vez con el C6 corroborando su ubicación en el anillo.

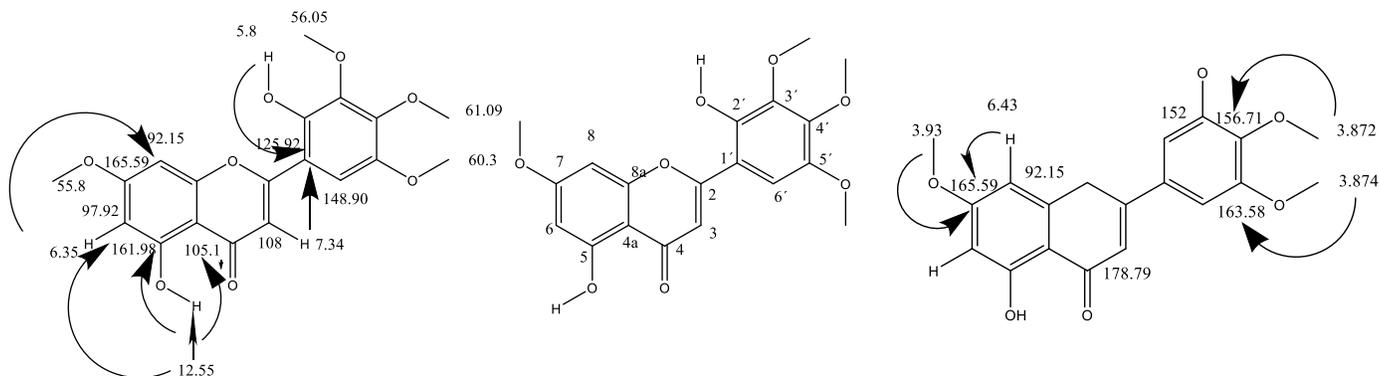


Figura 3.9 Correlaciones establecidas por el estudio de HMBC del compuesto activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Por otro lado, el grupo metoxilo fue posicionado en C4' (156.71) debido a que sus protones H-4' (3.872) presentaron correlaciones con C3' (152), C-5 (163.58) y C-9 (83.73); también, se observó una correlación entre el protón H-7 (3.93) con C-7 (165.59) a dos enlaces, al C6(92.72) y C8(92.15) a tres enlaces (figura 3.9)

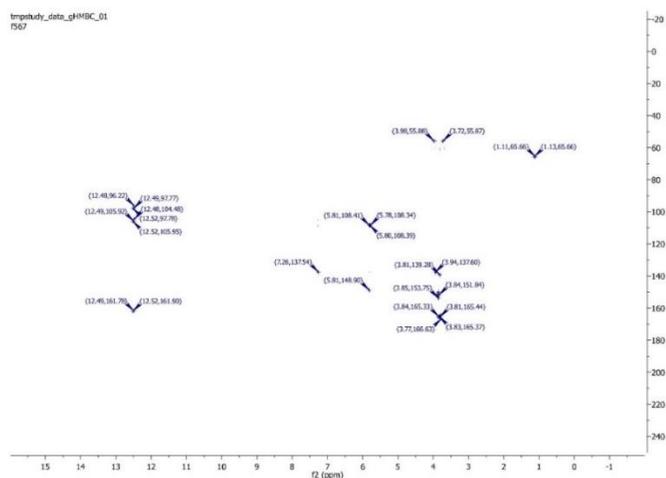


Figura 3.10 Ampliación del espectro de HMBC del compuesto activo 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) indicando la correlación entre protones y carbonos.

El análisis de todos los espectros RMNH¹, RMNC¹³(figuras 3.8 y 3.9) junto a los espectros de RMN de doble dimensión hizo posible determinar que la muestra CCG-4851 presentan la siguiente estructura (Figura 3.11)

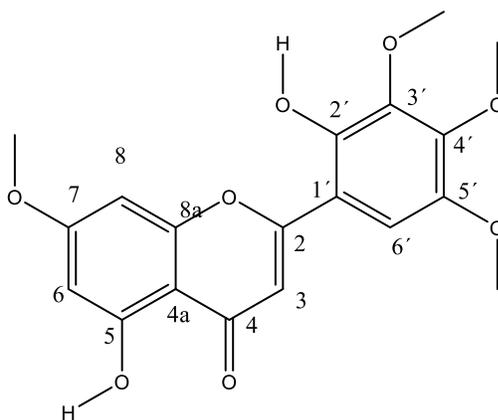


Figura 3.11 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

3.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de hemaglutinación, de las fracciones de CLV contra la proteína HA del virus, presentaron actividad biológica en las fracciones 4, 5, 6 y 7 (Figura 3.12), mostrando resultados prometedores para continuar con el fraccionamiento como se observa en la (figura 3.13) en donde las fracciones 5 y 6 fueron las que mejores resultados arrojaron

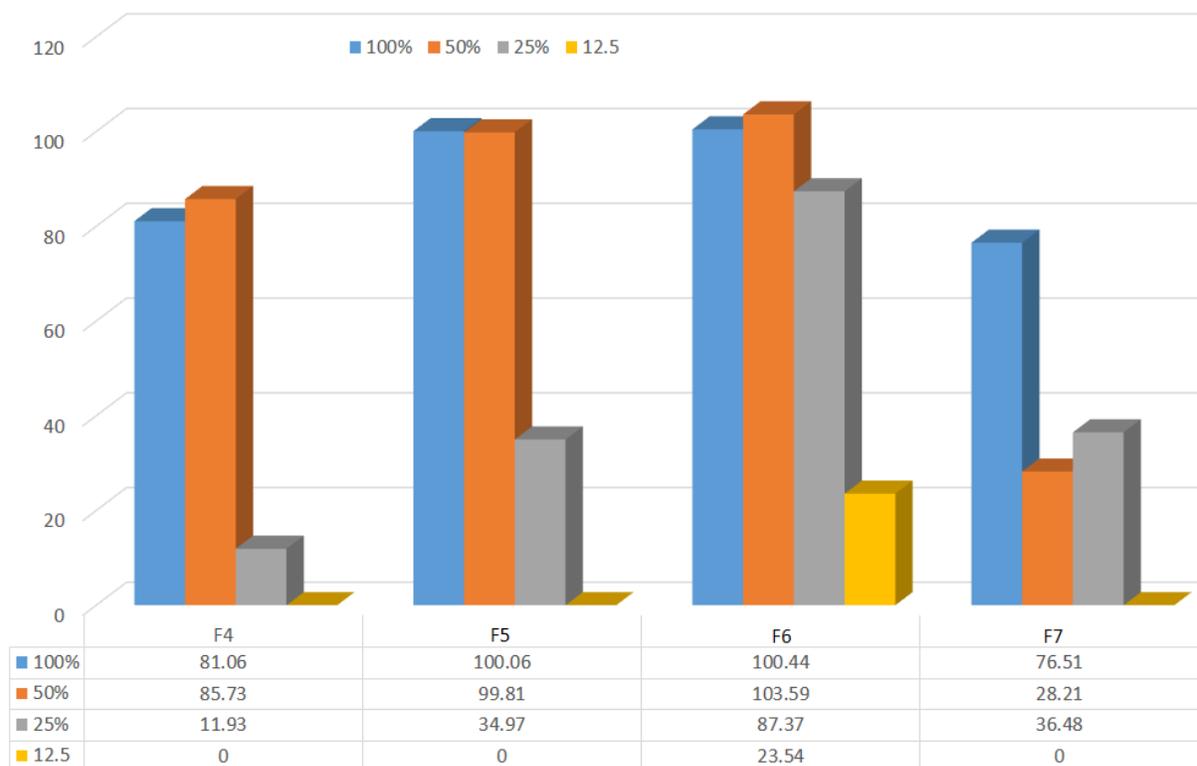


Figura 3.12 Porcentajes de inhibición de las fracciones 4, 5, 6 y 7 a las distintas concentraciones (100, 50, 25 y 12.55 µg/mL)

Los mejores resultados, de actividad biológica obtenidos del fraccionamiento por tamaño en columna de sephadex fueron para la fracción “J” a las cuatro concentraciones evaluadas (100, 50, 25 y 12.5 µg/mL). (Figura 3.13), sin embargo, se observó en la fracción L y M presentaban alta actividad a 100 y 50 µg/mL de concentración.

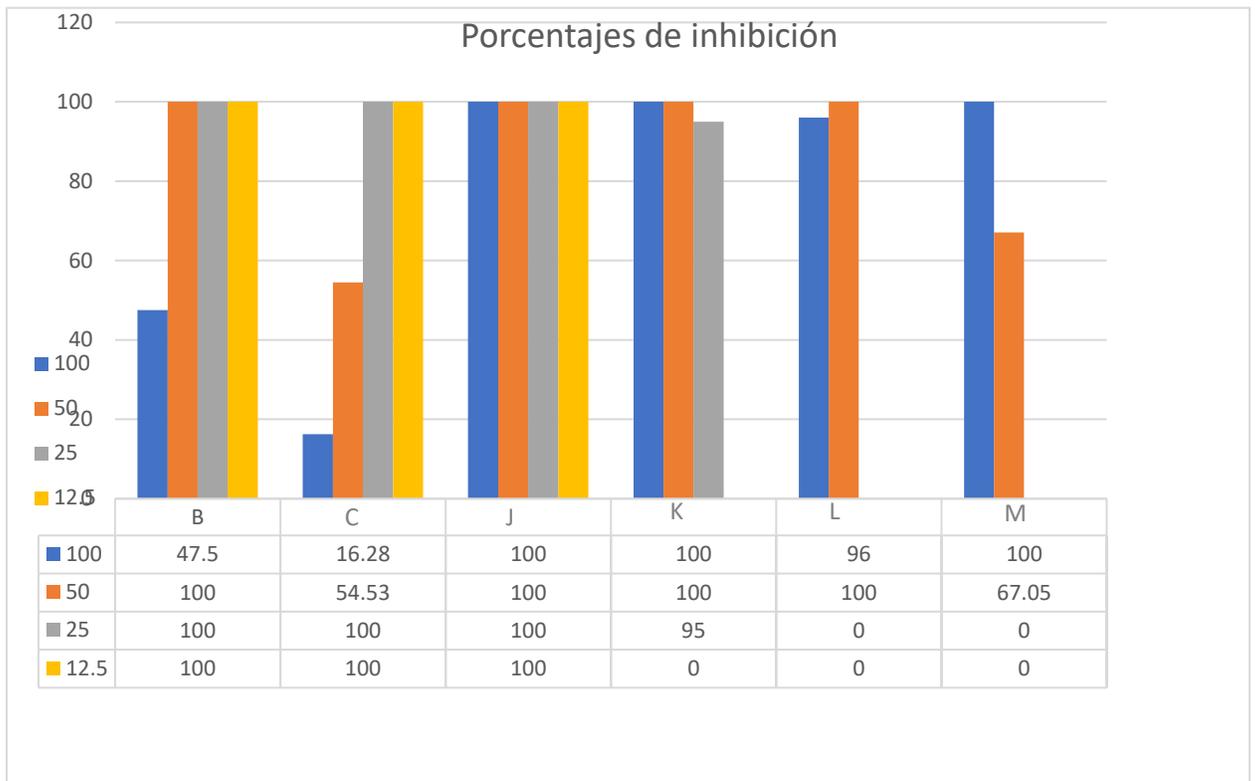


Figura 3.13 Porcentajes de inhibición de las fracciones B, C, J, K, L y M a las distintas concentraciones (100, 50, 25 y 12.5 µg/mL)

Como resultado del monitoreo de CCD pudo observarse en la placa una pigmentación amarillenta en las fracciones L y M así como cristales en ambas muestras (Figura 3.14), razón por la cual se consideró como la mejor opción para continuar el proceso de purificación.

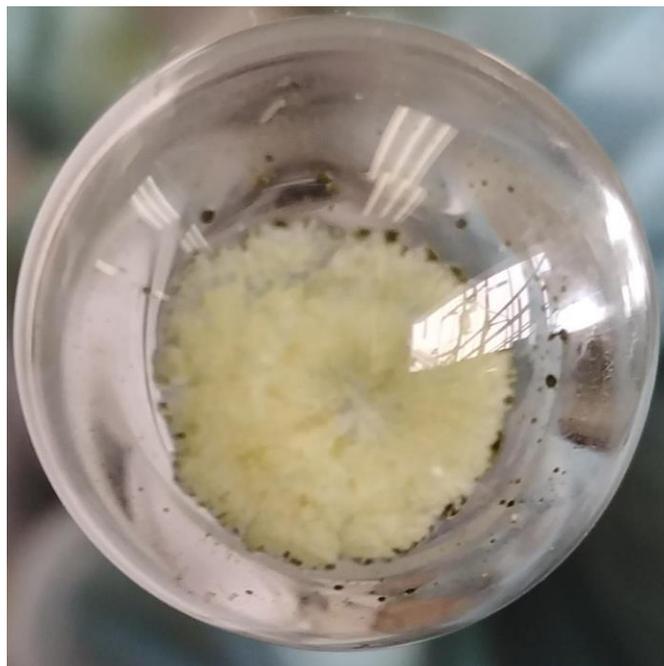


Figura 3.14 Cristales presentes en la muestra "M"

3.4.1 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Se obtuvo como un polvo amarillo, con una fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_8$ ($M^+ = 374.2$) y un peso molecular de 374.2 una de acuerdo al análisis por CG/EM y datos espectrométricos. Los datos espectroscópicos de RMN 1H (600 MHz en $CDCl_3$) y RMN ^{13}C (100 MHz en $CDCl_3$) muestran un perfil característico para una flavona metoxilada (Kongkum *et al* 2012)

Otros nombres: 5,2'-dihidroxi, 3',4',5',7-tetrametoxi flavona

Cuadro 3.3 Comparación de los desplazamientos químicos de R-MN ¹H y RMN ¹³C con lo reportado por Kongkum N. *et al.*, 2012

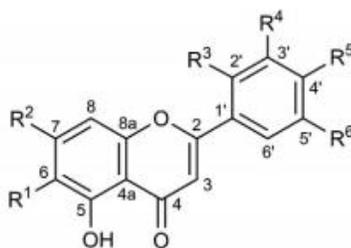
Posición	Experimental (CDCl ₃)		Kongkum <i>et al</i> 2012 (DMSO)	
	R-MN ¹ H	RMN ¹³ C	R-MN ¹ H	RMN ¹³ C
	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
2		161.98	-	161.4
3	7.34	108.52	7.10 s	108.8
4		178.79		182
4 ^a	-	105.1	-	104.6
5		159.9	-	161
6	6.35 s	97.92	6.37 d	98
7		165.59		165.2
8	6.43	92.15	6.82 d	92.7
8 ^a			-	157.4
1'		125.92	-	111.7
2'		155.3	-	145.4
3'		152	-	141.8
4'		156.71	-	145.9
5'		163.58	-	145.8
6'	7.326	106.5	7.26 d	106.5
3'OMe	3.99 s	56.05	3.84 s	56.6
2'-OH	5.88	-	9.87 s	-----
5-OH	12.55 s	-	12.89 s	-
7OMe	3.93 s	55.8	3.86 s	56.1
4'OMe	3.874 s	61.09	3.86 s	60.6
5'OMe	3.872 s	60.3	3.78 s	61.1

El género *Caesalpinia* ha sido muy estudiado en cuanto a su actividad biológica. Estudios anteriores han demostrado actividad biológica en dicho género tal como lo registra Kumar *et al.* en el 2010 en *C. pulcherrima* con una actividad anticonvulsiva, de la cual fue aislada la quercetina responsable de la actividad antiviral en una serie de virus de herpes y adenovirus (Chiang *et al.*, 2003). *C. latisiliqua* es otra especie que muestra relación en la actividad antiviral con su fitoquímica (presencia de flavonoides, fenoles y estilbenos) (Oh *et al.*, 2020). Kumar en el 2013 evaluó el extracto etanólico de las hojas de *C. pulcherrima* con potencial actividad anti fertilidad. En el caso de *C. yucatanensis* no se han reportado aislamientos de compuestos por lo que su fitoquímica es desconocida hasta ahora que se realizó el primer aislamiento biodirigido. El compuesto 5-hidroxi-2-(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) fue aislado por primera vez en 2012 reportado con el nombre de 5,2'-dihidroxi-7,3',4',5'-tetramethoxiflavona (Kongkum *et al.*, 2012) en la especie *Gardenia carinata* perteneciente a la familia de las Rubiaceae, familia que cuenta con más de 80 especies ampliamente distribuidas en los bosques tropicales del mundo. Cabe señalar que no se encontró ningún otro reporte de aislamientos de este compuesto desde esa fecha por lo que lo convierte en el primer reporte para la especie *Caesalpinia yucatanensis* y el segundo reporte de la flavona desde 2012. En investigaciones anteriores de las especies del género *Gardenia* revelaron que estas plantas son ricas en flavonoides y varios de ellos exhibieron actividades citotóxicas y anti-VIH-1 (Nuanyai *et al.*, 2011) (Tuchinda *et al.*, 2004) .

En el cuadro 3.4 se observan los resultados del ensayo de citotoxicidad de todos los compuestos incluyendo el compuesto 1 (5-hidroxi-2-(2-hidroxi-3,4,5-trimethoxyphenil)-7-methoxy-4H-chromen-4-one) aislados de *G. carinata* siendo la flavona 2 la que presentó la mayor actividad ($EC_{50} = 3.4 \mu\text{M}$ y $IS = 12.7$). Se reportó las flavonas 1 y 6 como muy activas (82.2% y 88.1% de inhibición a $200 \mu\text{g/mL}$ con valores de IC_{50} de 205.5 y $291.2 \mu\text{M}$ respectivamente) contra Transcriptasa inversa del VIH. Estos antecedentes del compuesto 5-hidroxi-2-(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) relacionados a su potencial biológico contra el virus del VIH sumado a los resultados de los bioensayos como un potencial inhibidor de la HA nos sugieren que este compuesto es una alternativa para tomar en cuenta para estudios futuros de evaluación de éste tipo de compuestos contra el virus de la influenza A(H1N1).

Cuadro 3.4. Actividad Anti-VIH-1 de las flavonas presentes en la especie *Gardenia carinata* (Kongkum et al., 2012)

Compuestos	Ensayos citotóxicos				Ensayos VIH 1 RT		
	IC50	EC50	SI	Actividad	% Inhibición at 200 µg/mL	IC50 (µM)	
1	412	162.8	2.5	A	82.2	204.5	
2	43.2	3.4	12.7	A	0.83	ND	
3	61.6	24.6	2.5	A	1.4	ND	
5	560.9	308.3	1.8	A	37.7	ND	
6	105.7	36.6	2.9	A	88.1	291.2	



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe
2	H	OMe	OH	OMe	OMe	OH
3	OMe	OH	OH	OMe	OMe	OH
4	OMe	OMe	OH	OMe	OMe	OH
5	OMe	OMe	H	OH	OMe	OMe
6	OMe	OH	H	OH	OMe	OH

Figura 3.15 Flavonas con actividad Anti-VIH-1 presentes en la especie *Gardenia carinata*
(Kongkum et al 2012)

Las flavonas tetrametoxiladas ya han sido aisladas en otras especies de plantas aromáticas de la familia Lamiaceae. Se trata de plantas perennes, que pueden ser arbustos, como en el caso de *Thymus vulgaris* el cual es un pequeño arbusto (10-40 cm), erecto o a veces decumbente, con la base de los tallos leñosa (sufrútice), los superiores rojizos y con pelos cortos curvados (retrorsos). Para esta especie, de propiedades medicinales, se han reportado aislamientos de compuestos fenólicos entre ellos flavonas di-, tri- y tetrametoxiladas sustituidas. Por su alto contenido en compuestos fenólicos esta especie se ha empleado para tratar afecciones del aparato respiratorio como tosferina, laringitis, bronquitis, asma, etc., también en gastritis, dispepsia, diarreas y como antihelmíntico sobre parásitos intestinales. Igualmente, el aceite esencial obtenido por destilación de las partes aéreas de la planta y diversos extractos han mostrado su eficacia en casos de dolor de garganta, amigdalitis, enfermedades en las encías e infecciones de la cavidad bucal, reumatismo y artritis, debido a sus propiedades antisépticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antitusígenas, expectorantes y antioxidantes (Caarretero y Ortega 2017).

CAPÍTULO IV. MONITOREO POR ESPECTROMETRÍA DE GASES/MASAS DE LA PRESENCIA DE 5-HIDROXI-2(2-HIDROXI-3,4,5-TRIMETOXIFENIL)-7-METOXI-4H-CROMEN-4-ONA) EN EXTRACTOS DE HOJAS DE *Caesalpinia yucatanensis* (Britton & Rose) Greenm COLECTADAS EN TRES LOCALIDADES DEL ESTADO DE YUCATÁN.

4.1 INTRODUCCIÓN

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora (Valdés y Balbín, 2000). Según la definición en el marco ecológico propuesta por Strassburger, Noll, Schenk y Schimper (1994), estos compuestos son sustancias ecológicamente eficaces, frente a compuestos primarios que serían sustancias fisiológicamente eficaces. Los compuestos que derivan de este tipo de metabolismo se pueden clasificar de varias formas. Los metabolitos secundarios (MS) de las plantas son una variedad útil de productos naturales no solo para la planta, sino que también poseen gran valor comercial por los distintos usos que se les atribuyen. Los MS se utilizan cada vez más en la medicina como tratamientos alternativos a los medicamentos sintéticos y como aditivos alimentarios con fines terapéuticos, aromáticos y culinarios. Diversos factores genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales pueden influir en la biosíntesis y la acumulación de metabolitos (Li *et al.*, 2018). La síntesis y acumulación de componentes fitoquímicos depende críticamente de las condiciones ambientales. Para la mayoría de las plantas, los factores o variables externas (luz, temperatura, agua del suelo, fertilidad y salinidad del suelo) pueden afectar significativamente algunos procesos asociados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas, incluso su capacidad para sintetizar metabolitos secundarios, lo que eventualmente conduce al cambio general de perfiles fitoquímicos que juegan un papel estratégico en la producción de sustancias bioactivas (Verma *et al.*, 2015; Ferrandino *et al.*, 2013).

En particular, para las plantas medicinales, las condiciones ambientales son capaces de redirigir el metabolismo para regular en consecuencia la producción de componentes activos. Debido a que las plantas tienen una composición química compleja y variable, el tipo y la cantidad de metabolitos secundarios, así como los efectos biológicos a menudo se determinaron de acuerdo con el cambio del ambiente (Li Yang *et al.*, 2018). Condiciones muy variables como la luz pueden afectar en gran medida la biosíntesis de metabolitos secundarios de una planta algunas de esas variaciones clave son el fotoperiodo, la intensidad y la dirección (Carvalho *et al.*, 2011). Así mismo la temperatura es un factor importante de variación en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Por ejemplo, la composición de compuestos fenólicos (delfinidina-3- O - glucósido, delfinidina-3- O- rutinósido y miricetina-3- O- glucósido) en tres cultivares de la especie *Ribes nigrum* demostró correlaciones positivas entre su producción y temperatura ambiental (Zheng *et al.*, 2012). Otro factor a considerar para la biosíntesis de metabolitos secundarios es el estrés hídrico debido a que pueden regular el crecimiento morfológico y el desarrollo de las plantas, y alterar sus propiedades bioquímicas (Zobayed *et al.*, 2007).

En el presente capítulo se describe los resultados de la variabilidad espacio-temporal de 5-hidroxi-7-metoxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4H-cromen-4-ona de *C. yucatanensis* en extractos de especies de *C. yucatanensis* colectados en tres sitios del estado de Yucatán empleando CG/EM.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Colecta y obtención del material vegetal

La distribución de *Caesalpinia yucatanensis* fue establecida basada en los datos de colecta proporcionados por el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán(CICY). Un mapa de distribución de dicha especie se aprecia en la Figura 4.1.

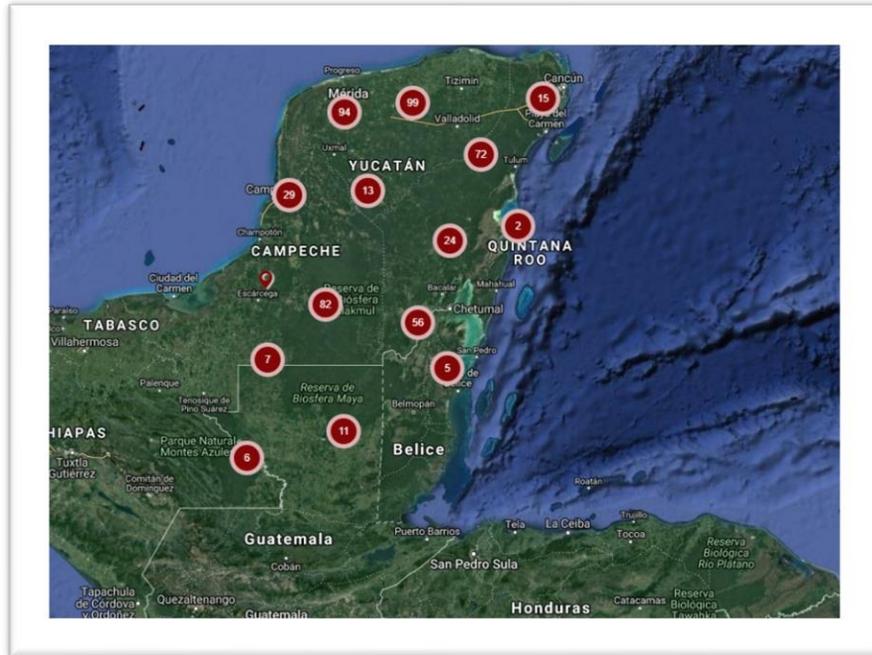


Figura 4.1 Distribución de *Caesalpinia yucatanensis* en la península de Yucatán, los lugares de colecta y número de individuos colectados en cada área (Conabio,2018).

Este estudio se realizó en Yucatán, México (19 ° 30 'y 21 ° 35'N, 90 ° 24'W). El clima es cálido-húmedo (Aw) con una temperatura media anual de 26 ° C (rango mensual promedio: 16.2 ° C-35.6 ° C), y una precipitación media anual que varía de <500 mm en el extremo noroeste del estado hasta a 1.200 mm en el extremo sureste. Se seleccionaron tres sitios de estudio, que exhiben condiciones ambientales notablemente diferentes (Figura 4.2)

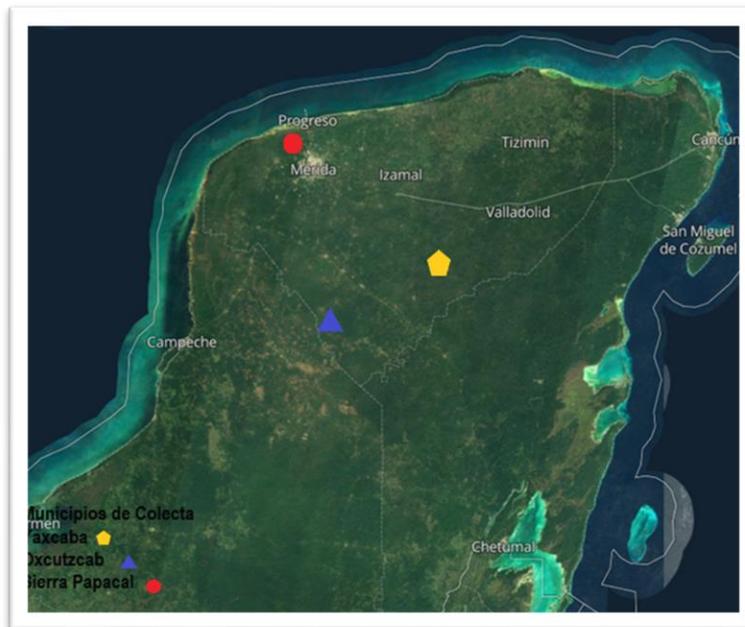


Figura 4.2 Mapa de los municipios de la península de Yucatán donde se realizaron las colectas de los individuos de *Caesalpinia yucatanensis*

El municipio de Oxkutzcab se localiza en la región sur del Estado, ocupando una superficie de 512.23 Km² situándose entre las coordenadas 20°21´ latitud norte y 89°22´ longitud oeste, posee una altitud sobre el nivel del mar de 33 metros. (INEGI 2010) El clima en toda la región es cálido-subhúmedo, presenta una temperatura media anual de 26.3°C con lluvias en los meses de mayo y junio. Cuando se interrumpen se presenta la sequía de medio verano. Tiene una precipitación pluvial media anual de 84.2 milímetros. La humedad relativa en el mes de marzo es del 66% y en el mes de diciembre es del 89%. La vegetación en el municipio se clasifica como selva mediana subcaducifolia con vegetación secundaria. La composición del suelo corresponde al tipo regosol que se encuentra en toda la región.

El municipio de Yaxcabá localizado en la región central-sur del estado de Yucatán, México. Las coordenadas geográficas son 20° 19´ y 20° 49´ latitud norte y 80° 36´y 88° 56´ longitud oeste, con una altitud promedio de 29 metros sobre el nivel del mar. La

temperatura media anual es de 26° C, con una precipitación pluvial media anual de 1,118 mm, sujeta a variaciones por la presencia de huracanes (Rodríguez *et al.*2019). El clima que predomina es cálido subhúmedo (Aw) con lluvias en verano, donde la humedad va disminuyendo de sur a norte (García 2004) con temperaturas record en el mes de mayo y las más bajas en enero. La lluvia anual es 1111mm, con una humedad relativa anual de 89% (INEGI 2010; CONAGUA 2016). Los tipos de suelos característicos del municipio son Cambisoles. Calcisoles y en baja proporción Luvisoles (García y Sosa 2013). La vegetación es un bosque tropical subdesiduo en diferentes etapas de sucesión (flores *et al.* 2010) (Rosado-Aguilar *et al.*,2017)

La localidad de Sierra Papacal se encuentra localizado en las coordenadas 21° 7' 19.92" latitud norte, 89° 43' 41.16" latitud oeste, a una altitud promedio de 9 metros sobre el nivel del mar. En Sierra Papacal el tipo de clima es semiárido cálido, temperatura media anual mayor de 22 ° C, temperatura del mes más frío mayor de 18 ° C. Lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal del 5% al 10.2% del total anual. La precipitación media aproximada es de 679 mm (CLIMATE-DATA). El tipo de vegetación es selva baja caducifolia. El tipo de suelo del área de colecta es litosol (SICA).

En cada sitio se colectaron tres especies adultas. Estas colectas se realizaron en los meses de noviembre-diciembre, y junio-agosto.

4.2.2 Procesamiento de las plantas

El material vegetal obtenido fue secado a 40°C durante tres días en un secador ubicado en las instalaciones del CICY. El material seco fue molido en una licuadora industrial para disminuir el tamaño de partícula para después ser pesado.

4.2.3 Extracción y fraccionamiento

El material seco y molido fue extraído a temperatura ambiente dejándolo reposar con metanol durante 24 horas (se realizó 3 repeticiones sucesivas a cada individuo). Al término de cada extracción, se filtró y concentro a presión reducida en un rotaevaporador a 40 °C.

4.2.4 Partición del extracto metanólico de *C. yucatanensis*

Los extractos metanólicos obtenidos de cada individuo, en ambas épocas (secas y lluvias) y diferente zona (Oxkutzcab, Sierra Papacal y Yaxcabá), fueron particionados con Hx-ACN-MeOH 3:1:1, utilizando 1g de cada muestra. Los rendimientos se observan en el cuadro XX de la sección 2.3.1 del capítulo II.

4.2.5 Análisis de los perfiles cromatográficos por CG/EM de las colectas de *C. yucatanensis* (extractos de ACN:MeOH)

Los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent technologies modelo 6890N Network GC system, acoplado a un detector de masas Agilent Technologies modelo 5975B inter MSD controlado por una computadora HP. Se usó como método una columna no polar Ultra 1 (100 % dimetilpolisiloxano, 25 m x 0.321 D, 0.52 µm de grosor de la película) y como programa de temperatura: inicial de 220 °C durante 2 min hasta llegar a 280 °C durante 8 min, la velocidad de flujo del disolvente de 1.2 mL/min. Se preparó una solución al 5% de la muestra y se inyectó al CG-EM 1 µL.

4.3 RESULTADOS

Utilizando el compuesto 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) se obtuvo su patrón de fragmentación por CG/EM y se localizó su Tr en un rango de 13.85 hasta 13.91 min que coincide con la señal del patrón de fragmentación másico y ion molecular de 374.2 una correspondiente a la flavona en cuestión como se observa en la Figura 4.3

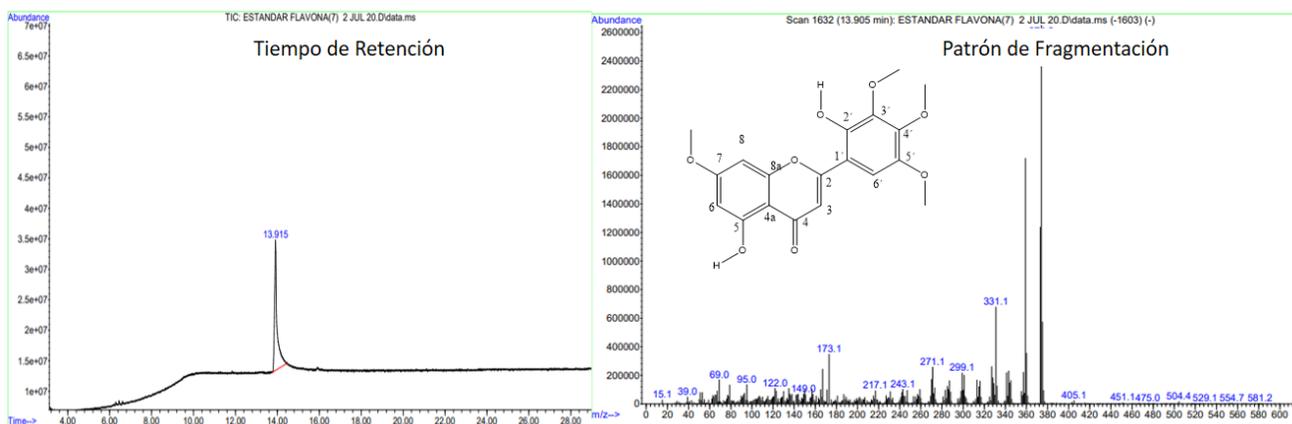


Figura 4.3 Tiempo de retención y patrón de fragmentación de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona)

Utilizando la flavona como estándar se pudo ubicar la presencia de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) en las diferentes colectas realizadas durante ambas épocas, así como la concentración en la que se encuentra presente en cada individuo.

En la figura 4.4 se observa la comparación de los perfiles cromatográficos por CG-EM de los individuos de Oxcutzcab durante la época de secas. En esta imagen podemos ver la presencia de 2 compuestos mayoritarios, presentes en los tres individuos, que se observan en el rango de los 3.47 y 3.58 min acompañados de otros compuestos minoritarios, sin embargo, no se observa algún pico que indique la presencia de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) en alguno de los individuos colectados en dicha localidad. En esta misma localidad se registró la temperatura más baja durante la temporada de secas (23.7°C) y una humedad de 81.71%, sin embargo, no se observó presencia del compuesto lo que indica que las condiciones del área no fueron adecuadas para la producción de la flavona.

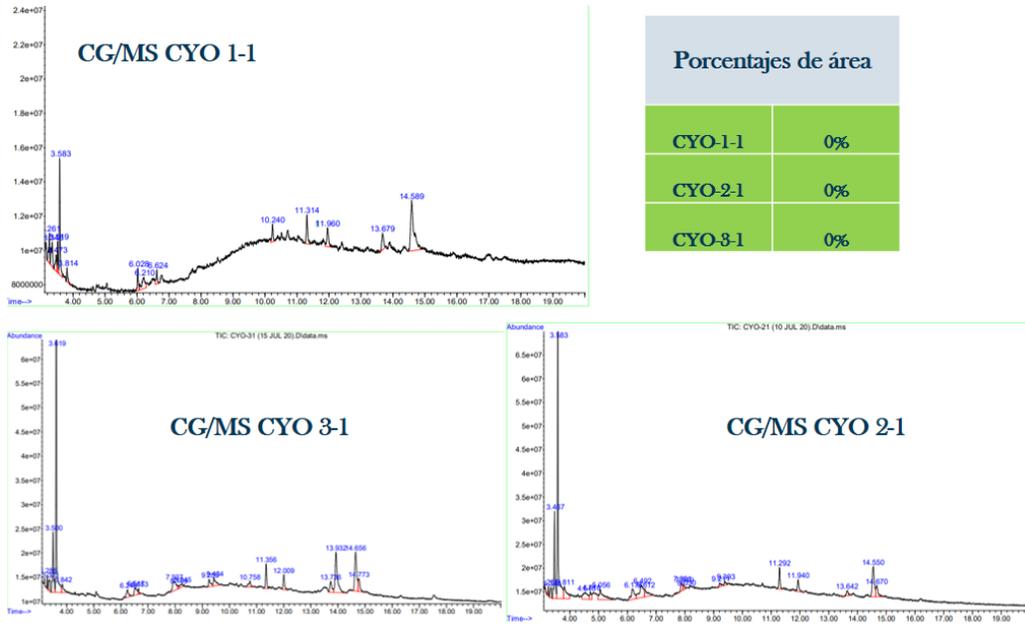


Figura 4.4 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía de gases.

En la figura 4.5 se presenta la comparación de los perfiles cromatográficos de los individuos de Sierra Papacal durante la época de secas. Se puede observar la presencia de 2 picos mayoritarios con Tr de 3.47 min y 3.58 min, respectivamente, en los tres individuos y la presencia de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) en los tres individuos; sin embargo, se observan diferencias en el porcentaje de área entre los individuos. En el individuo 1 se encontró un porcentaje de 6.30% de la flavona, en el individuo 2 un porcentaje de 10.01% y finalmente un 6.99% en el individuo 3. Cabe señalar que esta localidad presentó la menor humedad registrada (77%) y la temperatura más alta en la época de secas (33°C) además de que el individuo 2 se encontraba expuesto a una mayor radiación solar en comparación a los otros dos individuos.

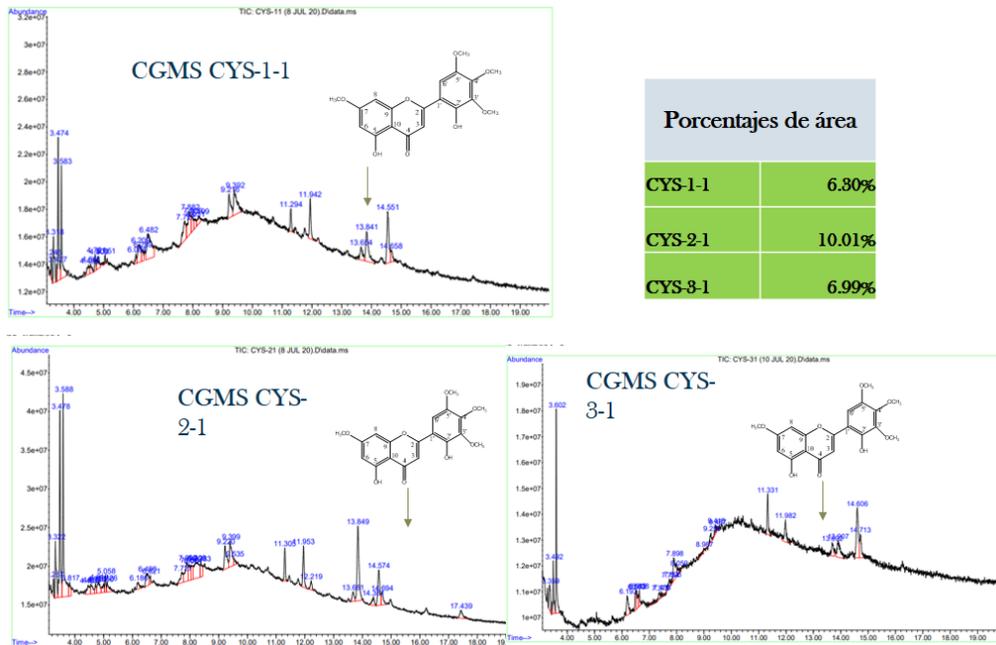


Figura 4.5 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía de gases

En la figura 4.6 se aprecia la comparación de los perfiles cromatográficos de los individuos de Yaxcabá durante la época de secas. Se observa la presencia de 2 picos mayoritarios con Tr de 3.45 min y 3.50 min en los tres individuos y la presencia de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) en los tres individuos; sin embargo, se observan diferencias en el porcentaje de área entre los individuos. En el individuo 1 se encontró un porcentaje de 1.19% de la flavona, en el individuo 2 un porcentaje de 4.44% y finalmente un porcentaje de 1.26% en el individuo 3. Las condiciones ambientales en la localidad de Yaxcabá presentaron el mayor porcentaje de humedad (83.5%) y temperaturas arriba de los 30°C, sin embargo, las condiciones no fueron las adecuadas para una mayor producción del compuesto, como lo indican los datos obtenidos.

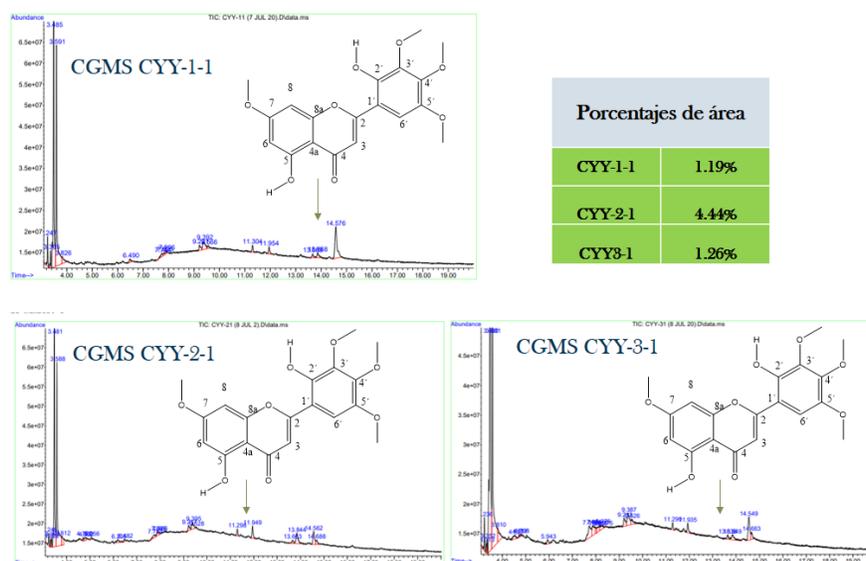


Figura 4.6 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía de gases

En la figura 4.7 se observa la comparación de los perfiles cromatográficos por CG-EM de los individuos de Oxcutzcab durante la época de lluvias. Se aprecia la presencia de compuestos mayoritarios, presentes en los tres individuos, que se observan en el rango de los 3.47 min y 3.50 min acompañados de otros compuestos minoritarios, sin embargo, no se observa la presencia de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona en el individuo 1, mientras que en el individuo 2 se registró un porcentaje de área de 3.50% para el compuesto y por último en el individuo 3 se registró un porcentaje de 1.42%. Durante la época de lluvias, en esta localidad, se registró la temperatura más alta durante la temporada de lluvias (34.9°C) y un aumento en la humedad hasta 93.37%, sin embargo, no se observó presencia del compuesto en el individuo 1, mientras que en los individuos 2 y 3 el porcentaje no superó los 3.50%, estos resultados sugieren que las condiciones abióticas no son las adecuadas para una mayor producción del compuesto activo.

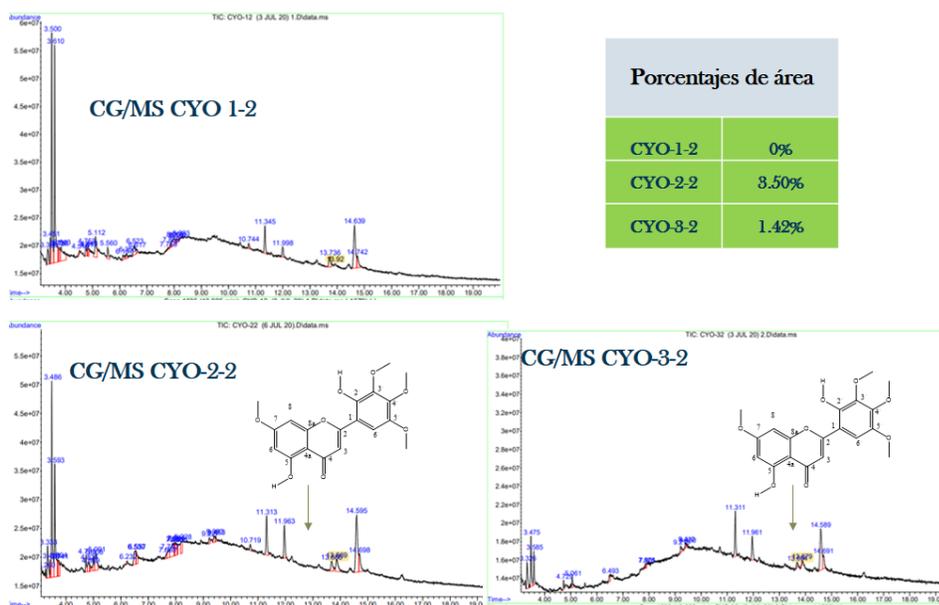


Figura 4.7 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía de gases

La figura 4.8 presenta la comparación de los perfiles cromatográficos por CG-EM de los individuos de Sierra Papacal durante la época de lluvias. Se puede observar un incremento de compuestos mayoritarios de mediana polaridad en el individuo 1 en comparación a los individuos colectados durante la época de secas, sin embargo, no se registró presencia del compuesto activo, a diferencia del individuo 2 en el que observamos la presencia de compuestos minoritarios de mediana polaridad y un porcentaje de área del 1.85% del compuesto con actividad inhibitoria. Finalmente se observa la presencia de compuestos minoritarios de mediana polaridad en el individuo 3 pero no se registró presencia de la falvona de interés. Durante la época de lluvias, en esta localidad, se registró una temperatura de 34°C y un aumento en la humedad hasta los 94.6%, convirtiéndolo en el sitio más húmedo en la época de lluvias, estos cambios en las condiciones se reflejaron en una disminución notable en el porcentaje de área, estos resultados sugieren que las variaciones de humedad y temperatura no favorecieron la producción del compuesto 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) en este sitio.

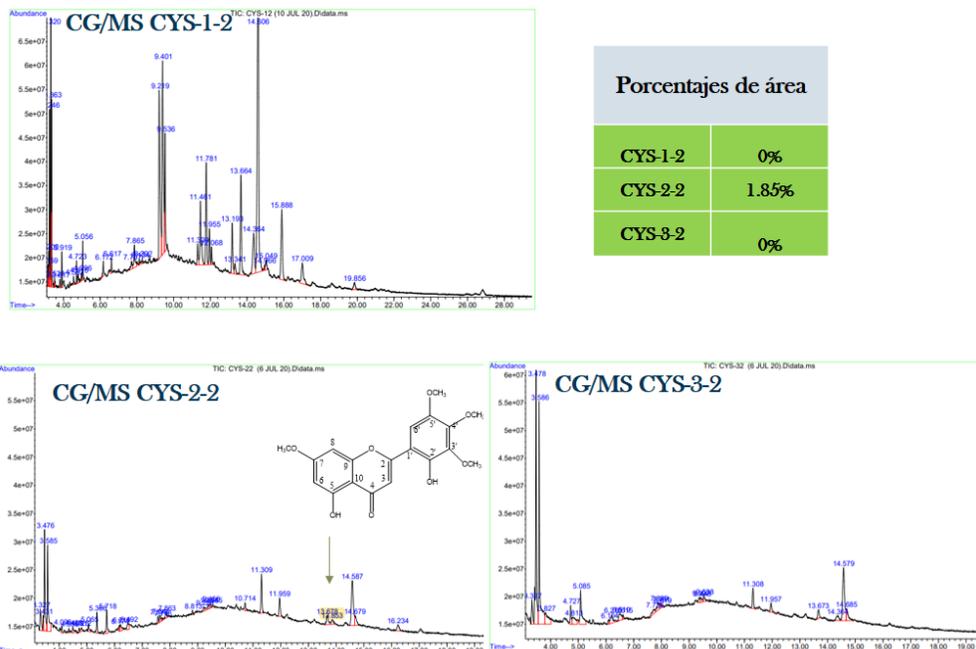


Figura 4.9 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía de gases

La figura 4.10 presenta la comparación de los perfiles cromatográficos por CG-EM de los individuos de Yaxcabá durante la época de lluvias. Se observa un incremento de compuestos mayoritarios de mediana polaridad en el individuo 1 en comparación a los individuos colectados durante la época de secas, sin embargo, no se registró presencia del compuesto 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona en este sitio a diferencia del individuo 2 en el que observamos la presencia de compuestos minoritarios de mediana polaridad y un porcentaje de área del 2.10% del compuesto con actividad inhibitoria. Finalmente se observa la presencia de compuestos minoritarios de mediana polaridad en el individuo 3 y una presencia de la flavona activa con un porcentaj de área de 1.95%. Durante la época de lluvias, en esta localidad, se registró la temperatura más elevada de la temporada de 35°C y un aumento en la humedad hasta los 93.49%, estos resultados indican que el aumento de humedad y temperatura no favorecieron la producción del compuesto 5-hidroxi-

2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) en este sitio debido a que observamos una disminución en la producción.

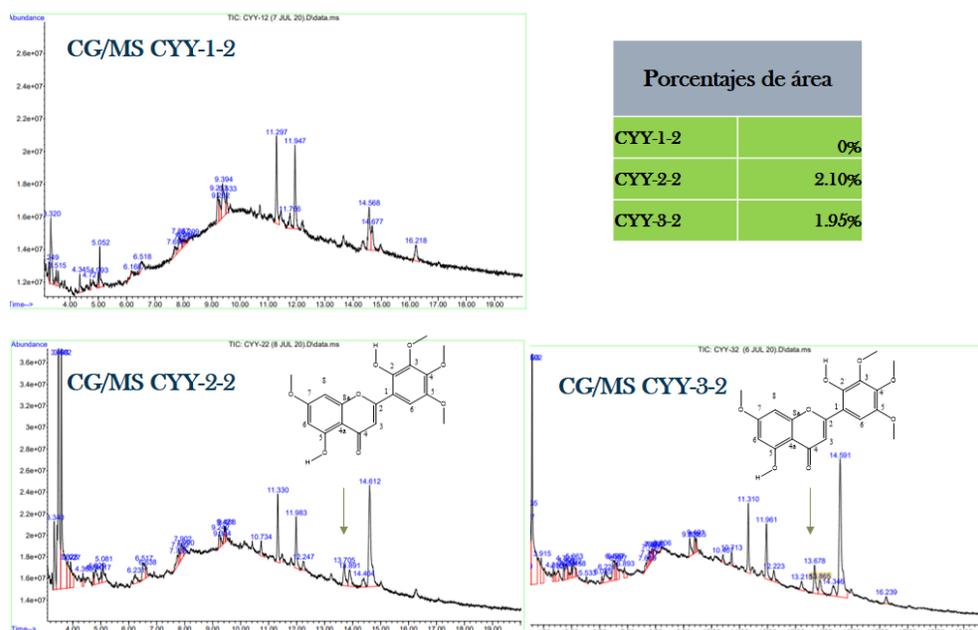


Figura 4.10 Comparación de los perfiles cromatógrafos y porcentaje de área de los individuos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía de gases

En el cuadro 4.1 observamos la comparación del porcentaje de Área del 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) obtenidos por CG-EM en cada localidad durante ambas épocas. Los resultados del monitoreo de la flavona activa en las distintas colectas evidenciaron que existen variaciones notables de concentración entre individuos. Estas variaciones son más notorias entre individuos de distintas localidades, lo que sugiere, que las condiciones ambientales están modificando la producción de dicho compuesto.

Cuadro 4.1 Porcentajes de Área del 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) obtenidos por CG-EM.

Individuo	Oxkutzcab (Secas)		Sierra Papacal (Secas)		Yaxcabá (Secas)		Oxkutzcab (Lluvias)		Sierra Papacal (Lluvias)		Yaxcabá (Lluvias)	
	CYO-1-1	0%	CYS-1-1	6.30%	CYY-1-1	1.19%	CYO-1-2	0%	CYS-1-2	0%	CYY-1-2	0%
2	CYO-2-1	0%	CYS-2-1	10.01 %	CYY-2-1	4.44%	CYO-2-2	3.50%	CYS-2-2	1.85 %	CYY-2-2	2.10%
3	CYO-3-1	0%	CYS-3-1	6.99%	CYY3-1	1.26%	CYO-3-2	1.42%	CYS-3-2	0%	CYY-3-2	1.95%

Como se puede observar en el cuadro 4.1 en la localidad de Oxkutzcab durante la temporada de secas no se presentó el compuesto lo que sugiere, según estos resultados, que las temperaturas menores a los 30°C no son favorables para la producción de dicho compuesto mientras que en la en la temporada de lluvias se presentó en una concentración máxima de 3.5%, es decir, que las variaciones en las condiciones abióticas mejoraron la producción en esta localidad. Por otro lado, se observó un aumento en la humedad en la época de lluvias, en comparación a la época de secas, esto sugiere que debe existir un equilibrio entre ambos factores para incrementar la producción.

4.4 DISCUSION

En este trabajo se observó que los compuestos presentes en *C. yucatanensis*, incluyendo el compuesto activo, tiene una fuerte relación a las variaciones registradas en los factores abióticos. Esto concuerda con lo dicho por Lériada Acosta (2003), que los factores climáticos, como fisiológicos de la planta, rangos de temperatura, luz, precipitaciones intervienen directamente en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas y que estos factores no se comportan por igual para todas, lo cual se refleja en la producción de compuestos. Estos resultados sugieren que la época del año en que se realizaron las colectas modifican la presencia de los metabolitos debido a que la producción está

fuertemente ligada a la época del año que se realice la colecta, tal es el caso de otras especies como *Brugmansia candida* Pers. (campana) en la que el follaje cosechado en la época invernal (enero) era más rico en alcaloides tropánicos que el recogido en el verano (julio) e igualmente al recolectado en horas de la mañana en comparación con las horas de la tarde (Acosta *et al.*, 1989). Este fenómeno podemos observarlo en múltiples ejemplos de la literatura como sucede con *Matricaria recutita* L. (manzanilla) cuyos estudios demostraron que en las flores cosechadas entre las 9 y 11 a.m. eran mayores los porcentajes de aceite esencial en comparación con las recogidas en la tarde; se observa que en ambos casos hay una influencia marcada de la temperatura y la luz (Acosta, 1995)

En el Cuadro 4.2 se indica un resumen de las condiciones ambientales en cada sitio de colecta durante ambas épocas y los tiempos de retención de los compuestos que se presentan en mayor cantidad, así como el monitoreo de la presencia del compuesto 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona. Este cuadro nos permite relacionar la producción de compuesto de interés con las condiciones ambientales que se presentan en cada sitio de colecta. Con base al análisis de los resultados de los perfiles de CG-EM de los extractos de ACE/MeOH y su relación con las condiciones ambientales observados en el cuadro XX de cada sitio podemos deducir que las condiciones medio ambientales donde crecen las plantas, esencialmente el clima, ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos. La luz, temperatura y precipitaciones fundamentalmente tienen un efecto marcado sobre la composición química en las plantas (Fluck,1955)

Cuadro 4.2 Resumen de las Condiciones ambientales de cada sitio, componentes mayoritarios y porcentaje de área observados por CG-EM

No. Muestra	Sitio de Colecta	Época de colecta	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Tiempo de Retención (min) y porcentaje de área de componentes de Ex. AcN/MeoH
1	Oxcutzcab	Secas	23.7	81.71	Tr 3.583 (16.420%), 14.58(27.746%)
2					Tr 3.58 (34.702%)
3					Tr 3.61 (31.442%), 13.93(12.877%), 14.65(10.580%)
1	Oxcutzcab	Lluvia	34.9	93.37	Tr 3.50(21.863%), 3.61 (23.686%), 14.63 (10.441%)
2					Tr 3.48 (17.258%),3.59(11.944%), 13.86 (3.50%) 14.59 (12.565%)
3					Tr 3.47 (11.534%), 11.31 (15.069%), 13.87 (1.42%)
1	Sierra Papacal	Secas	33.0	77	Tr3.47(10.580%), 3.58(8.956%),13.84 (6.30%) 14.55(8.069%)
2					Tr 3.47(11.349%) 3.58(13.734%), 13.84 (10%)
3					Tr 13.60(18.566%) 14.60 (13.056%) 13.90 (6.993%)
1	Sierra Papacal	Lluvia	34.0	94.6	Tr. 9.40 (10.279%), 14.60 (24.133%)
2					Tr 3.47 (14.514%), 3.58(14.063%), 13.85 (1.85), 14.58 (15.520%)
3					Tr 3.47 (24.211%), 3.58 (24.211%), 14.57 (11.816%)
1	Yaxcabá	Secas	30.0	83.4	Tr 3.48 (39.211%), 3.59 (29.251%), 13.86 (1.19%)14.57 (10.785%)
2					Tr 3.48 (34.938%), 3.58(30.540%) 13.84(4.44%)
3					Tr 3.48 (47.172%) 3.58 (25.691%) 13.84 (1.26%)
1	Yaxcabá	Lluvia	35	93.49	Tr 3.32 (9.603%), 11.29 (11.982%), 11.94 (11.933%), 14.56 (9.233%)
2					Tr 3.49 (29.380%), 3.60 (16.218%) 13.89 (2.100%), 14.61 (12.096%)
3					Tr 3.49 (29.691%), 3.59 (15.821%), 13.86 (1.95%) 14.59 (13.547%)

El análisis de los datos obtenidos nos muestra en la localidad de Oxcutzcab en la época de secas la presencia de compuestos mayoritarios en el rango de los 3.47 min y 3.61min que también se encuentran presentes en la época de lluvias, es decir, que son compuestos que utiliza la planta en ambas épocas y por lo tanto su producción no se ve

modificada por las variaciones temporales; sin embargo, no se observan señales que indiquen la presencia del compuesto 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona en esta época, a diferencia de la época de lluvias en donde los cambios en los factores abióticos estimularon la producción del compuesto en bajas cantidades. Esto nos sugiere que las bajas temperaturas no son óptimas para la producción de la flavona identificada, este caso es similar al reportado en las especies como *Matricaria recutita* L.(manzanilla), *Calendula officinalis* L. (caléndula), *Mentha piperita* L.(toronjil de menta) entre otras, que demandan épocas específica de siembra o plantación porque requieren determinadas condiciones climáticas (más bajas temperaturas e intensidad solar), en tanto que numerosas especies tienen otras exigencias climáticas (más bajas temperaturas e intensidad solar y deben plantarse en la primavera (marzo-abril) porque su follaje desaparece en la temporada invernal y han alcanzado la madurez necesaria para ser recolectadas (Acosta 1995).

En la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas observamos la presencia de compuestos en el rango de 3.47 min y 3.61 min en los tres individuos además identificamos los porcentajes de área más altos registrados. En este sitio se reportó la temperatura más alta durante secas y la temperatura más baja provocando un estrés por sequía disminuyendo la absorción de agua y los potenciales hídricos en las plantas, lo que influye negativamente en varios procesos fisiológicos y puede alterar la biosíntesis de MS (Ashrafia et al., 2018). En Sierra Papacal durante la época de lluvias observamos una disminución en la producción de la flavona activa a pesar de un ligero aumento en la temperatura (34°C), esto puede deberse a un incremento de la humedad (94.6%) que está afectando negativamente en la producción de dicho compuesto causando un ambiente menos favorable para la producción en mayores cantidades.

En la localidad de Yaxcabá nuevamente observamos la presencia de compuestos mayoritarios en un rango de 3.47 min y 3.61 min lo que nos habla de que ambos compuestos son útiles para la planta durante todo el año, independientemente de las condiciones abióticas de su ambiente. Por otro lado, en esta localidad durante la época de secas observamos la presencia en cantidades bajas de la flavona activa, lo cual se repite en la época de lluvias, es decir que las condiciones de alta humedad no favorecen la

producción de dicho compuesto según los resultados que podemos observar en este trabajo.

Los resultados de este trabajo muestran una mayor producción de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona en los individuos de la localidad de Sierra Papacal durante la época de secas presentando temperaturas de 33°C y 77% de humedad, es decir, que el estrés por sequía causa un incremento notable en la producción de dicho compuesto lo que concuerda con lo reportado en la literatura sobre la influencia de este tipo de estrés sobre la biosíntesis de MS (Li et al., 2020)

En el cuadro 4.3 se aprecian los componentes que se registraron del extracto de ACE/MeOH de las muestras colectadas en distintas regiones de Yucatán durante la época de secas y la época de lluvias, identificados por el equipo de CG-EM. Los resultados que se obtuvieron nos permitieron relacionar la presencia de dichos componentes con las condiciones abióticas de cada localidad y entender como esta especie responde a cambios en su entorno.

Cuadro 4.3 Componentes presentes en el extracto de ACN/MeOH de las muestras colectadas en distintas regiones de Yucatán durante la época de secas y la época de lluvias, identificados por GC-EM

Sitio y época de colecta	Tempos de retención (min)	Componentes con porcentajes de certeza superiores al 90%	Abundancia (%)	Sitio y época de colecta	Tempos de retención (min)	Componentes con porcentajes de certeza superiores al 90%	Abundancia (%)	Sitio y época de colecta	Tempos de retención (min)	Componentes con porcentajes de certeza superiores al 90%	Abundancia (%)
Oxcutzcab lluvias	3.58	Ácido octadecanoico	11.26%	Sierra lluvias	3.2	Metil éster de Ácido 10,13 octadecadienoico	0.68	Yaxcaba lluvias	3.49	Ácido 9,12,15 octadecatrienoico	31.82
	3.46	Ácido 9,12,15 octadecatrienoico	9.82%		3.24	Metil éster de Ácido 9,12,15 octadecatrienoico	4.24		3.6	Ácido octadecanoico	11.68
	3.33	fitol	4.16%		11.95	Vitamina E	1.45		11.98	Vitamina E	4.68
	11.96	Vitamina E	4.21%		3.59	Ácido octadecanoico	17.83		3.42	Ácido 9,12 octadecadienoico	3.94
Oxcutzca secas	12	Metil éster del ácido hexadecanoico	2.18%	Sierra secas	11.99	Metil éster del ácido hexadecanoico	6.78	Yaxcaba secas	14.59	γ -sitosterol	16.65
	14.06	Metil éster de Ácido 9,12,15 octadecatrienoico	1.38		13.97	Metil éster de Ácido 9,12 octadecadienoico	1.78		17.72	Metil éster del ácido pentadecanoico	0.97
	14.35	Metil estearato	1.9		14.06	Metil éster de Ácido 9,12,15 octadecatrienoico	9.35		14.35	Metil estearato	0.70
	21.83	eicosano	1.33		14.35	Metil estearato	6.71		25.61	pentadecanal	0.65
	23.81	Vitamina E	24.68		21.82	eicosano	2.2		29.17	Vitamina E	12.85
	20.57	fitol	4.5		25.3	sitosterol	10.05		30.99	sitosterol	12.35
	30.38	estigmasterol	3.44								

En la sección de resultados del capítulo 4 se indicaron los Tr de ciertos compuestos que se presentaban de manera continua en las colectas, es decir, que sin importar la época o el lugar se presentaban en mayor o menor cantidad. Tres de estos compuestos son el ácido octadecanoico (Tr=3.58 min) también conocido como ácido esteárico, el ácido 9,12,15 octadecatrienoico (Tr=3.46 min) y el ácido hexadecanoico (Tr=12min); éstos ácidos grasos han sido identificados como componentes de los aceites esenciales con actividad larvicida y anti- *Trypanosoma cruzi* en plantas (Leyva *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010). Por otra parte, el componente con tiempo Tr de 3.3min indicó la presencia de fitol, observado mayormente en la localidad de Oxcutzcab. Cabe señalar que este compuesto

ha sido reportado con actividad antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* (Mohamed *et al.*, 1998).

Otro compuesto interesante identificado es la vitamina E, que se presentó en los tres sitios de colecta, aunque se presentó en mayor cantidad en las localidades de Sierra Papacal y Yaxcabá. Los componentes de la vitamina E (tocoferoles) son producidos en los cloroplastos, poseen actividad antioxidante, son solubles en lípidos que son sintetizados por plantas y otros organismos oxigenados fotosintéticos. y su función es estabilizar los ácidos grasos poliinsaturados dentro de las bicapas lipídicas protegiéndolos del ataque de lipoxigenasa (Shintani y DellaPenna, 1998).

El sitosterol (Tr= 30.38 min) y el stigmasterol (Tr=30.99 min) son compuestos que se han presentado repetidamente en las colectas en los distintos sitios, aunque en cantidades diferentes; sin embargo, su continua presencia sugiere que son compuestos que cumplen funciones importantes, independientes a la época, como mencionan estudios previos que sugieren su participación en las actividades de señalización esenciales para el desarrollo de la planta y la compensación del estrés abiótico (Aboobucker y Suza 2019). La presencia de estos compuestos nos habla de una especie sometida a un continuo estrés ya que como podemos ver se presentan en todos los sitios de colecta.

CAPITULO V DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo con base en los bioensayos de hemaglutinación fue posible confirmar la actividad biológica de los compuestos de *C. yucatanensis*, anteriormente estudiada por Cetina Montejó y May May (2013-2014) y aislar esos compuestos de forma biodirigida, con base en esto se realizó el primer estudio fitoquímico de extracto de acetonitrilo-metanol de las hojas de *C.yucatanensis*. La fracción polar resultante fue purificada hasta obtener un flavonoide nunca antes reportado para esta especie, 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona, una flavona tetrametoxilada. Dicho compuesto fue elucidado mediante la comparación de los datos espectroscópicos con lo reportado en la literatura para este compuesto (Kongkum N *et al.*, 2012)

Con base al rendimiento de los extractos de acetonitrilo- metanol fue posible observar que un aumento en la humedad incrementaba el rendimiento foliar de los individuos, esto fue evidente al comparar los espectros de las tres localidades durante ambas épocas, y con los datos proporcionados por los espectros de HPLC no fue posible ver que ciertos metabolitos están estrechamente relacionados a la humedad del ambiente, sin embargo, utilizando la flavona aislada de *C. yucatanensis* como marcador nos fue posible ubicarla en las colectas realizadas en las tres localidades del estado de Yucatán durante época de secas (noviembre-diciembre) y época de lluvias (julio-agosto), los espectros que se obtuvieron por CGM presentaron resultados que contrastaban con los obtenidos por los espectros de HPLC ya que contrario a lo que se pensaba inicialmente, los resultados indican la producción de la flavona aislada no está relacionada directamente con la humedad del área, incluso se sugiere que la humedad afecta negativamente la producción de este metabolito, ya que observamos que la mayor producción se encuentra en el área con menor humedad mientras que cuando la humedad aumenta la concentración disminuye.

Otro factor que se estudió en este trabajo es la temperatura y este es un factor que juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios, influye grandemente en el crecimiento acelerado y en el equilibrio entre el proceso de fotosíntesis y respiratorio y por consiguiente en la producción de los principios activos. En este trabajo podemos observar que la producción de dicho metabolito se relaciona con altas temperaturas superiores a los 30° C, sin embargo, este nos es un factor determinante ya que podemos observar que las tres localidades presentan altas temperaturas.

Por último, en relación a la producción de la flavona de interés, estos resultados confirman la influencia de un tercer factor actuando de manera sinérgica a la temperatura para la producción de esta flavona, éste tercer factor parece ser la radiación solar debido a que la luz, está estrechamente relacionada con la temperatura y varía con la estación del año y la hora del día. La luz favorece el crecimiento de los tejidos jóvenes (WO, 1950). En este trabajo identificamos que el individuo dos de Sierra Papacal presentaba la mayor producción de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona con 10.01% de concentración con condiciones de 33° y un porcentaje de humedad del 77%, siendo así el área y la época más áridas, ésta se encontraba expuesto a un mayor estrés por radiación solar lo que se confirma con lo dicho por Martínez-Flores en el 2002 que la producción de flavonoides se relaciona con la necesidad de proteger al organismo de la luz ultravioleta. Finalmente se puede argumentar que se ha podido demostrar cómo la humedad y la temperatura están relacionadas con la producción del tejido foliar y que el rendimiento de *C. yucatanensis* está relacionado directamente con la humedad, mientras que la producción de la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona) está relacionada con otros factores. En este trabajo se sugiere que la producción de la flavona podría estar relacionada a un tercer factor, no evaluado en este estudio, relacionado con la temperatura como lo es la luz.

VI CONCLUSIONES

Se aisló e identificó por primera vez en las hojas de *C.yucatanensis* la flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona del extracto de ACN/MeOH como uno de los componentes responsables de la actividad anti-hemaglutinante del virus de influenza A a una concentración de 100 µg/mL, y se realizó el primer estudio fitoquímico de la especie.

Se determinó que la humedad es un factor determinante en la producción de biomasa en ésta especie ya que se obtuvieron los mejores rendimientos en peso seco o extracto de especies colectadas en época de lluvias que de secas.

Se sugiere que, para la producción de la flavona activa, un tercer factor podría estar influyendo en el incremento del compuesto, siendo éste la radiación solar.

Se sugiere a la localidad de Sierra Papacal en época de secas, como el sitio para la colecta y obtención de cantidades mayoritarias de este compuesto activo.

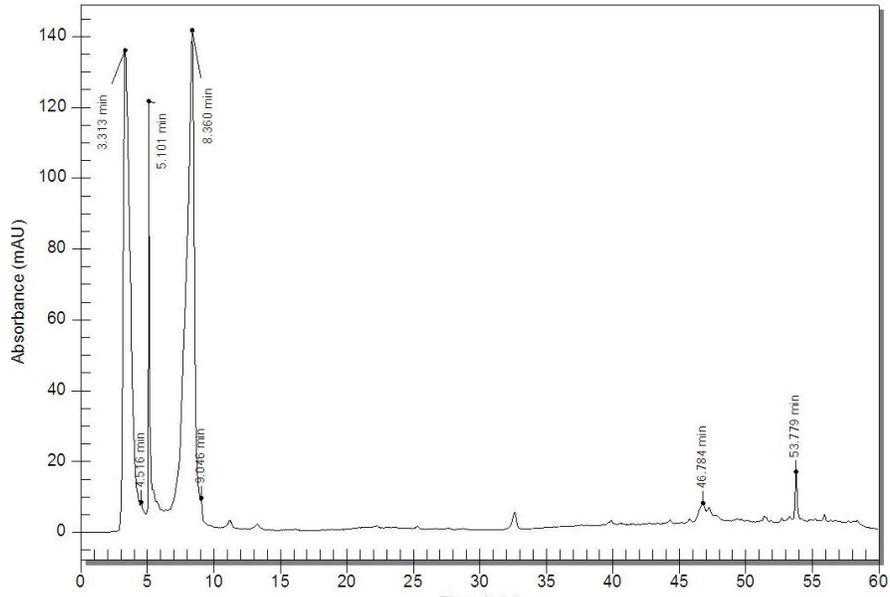
PERSPECTIVAS

La flavona 5-hidroxi-2(2-hidroxi-3,4,5-trimetoxifenil)-7-metoxi-4h-cromen-4-ona debe ser aislada nuevamente y evaluada con bioensayos de hemaglutinación y determinar si se le pueden realizar modificaciones estructurales relacionadas con la actividad citotóxica y su eficacia contra el virus de la influenza A(H1N1), mediante distintas reacciones químicas.

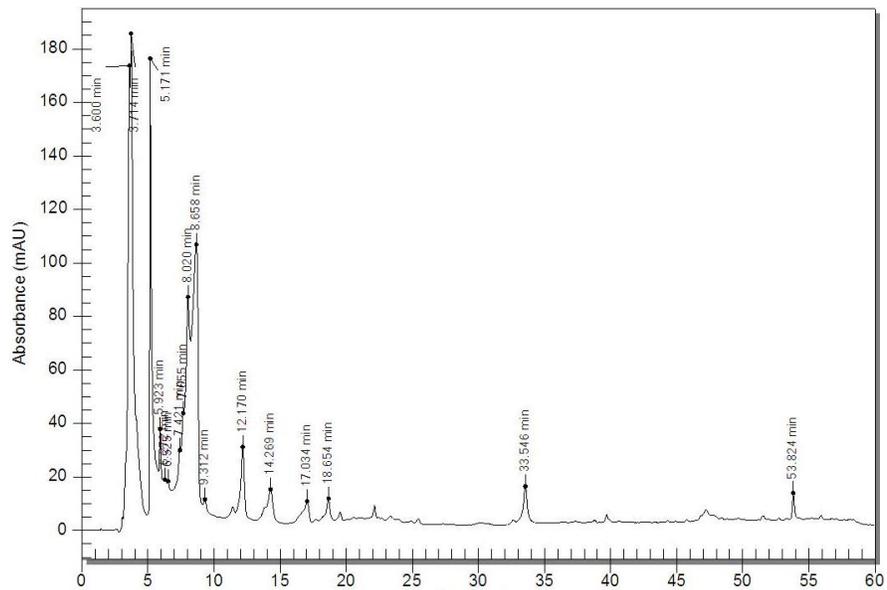
Realizar estudios de los factores de radiación solar y suelo para determinar si se encuentran relacionados con la producción de la flavona activa en los mismos sitios de colecta.

Realizar un estudio estadístico de los factores climáticos que nos permita definir las condiciones óptimas relacionadas con una mayor producción de los metabolitos con actividad antiviral.

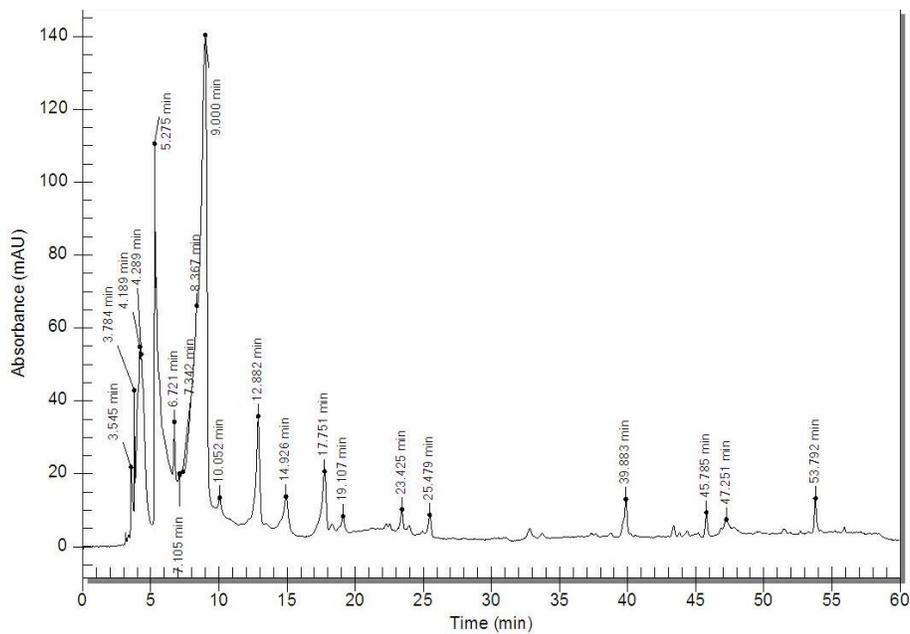
ANEXOS



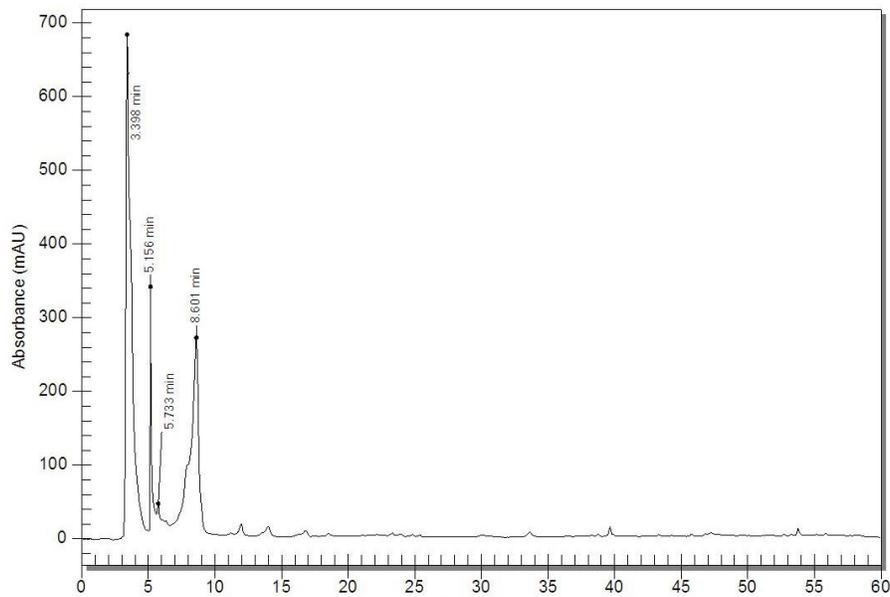
Anexo 1 Perfil cromatográficos de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía por HPLC



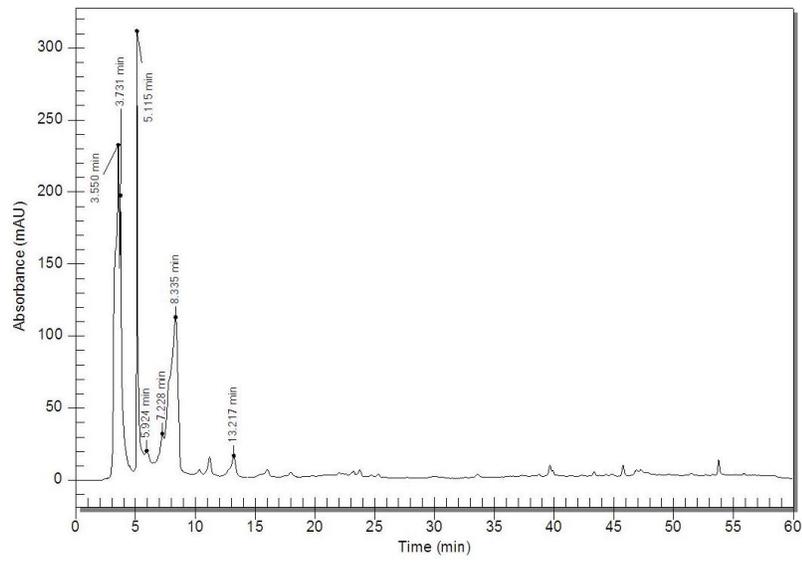
Anexo 2 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía por HPLC



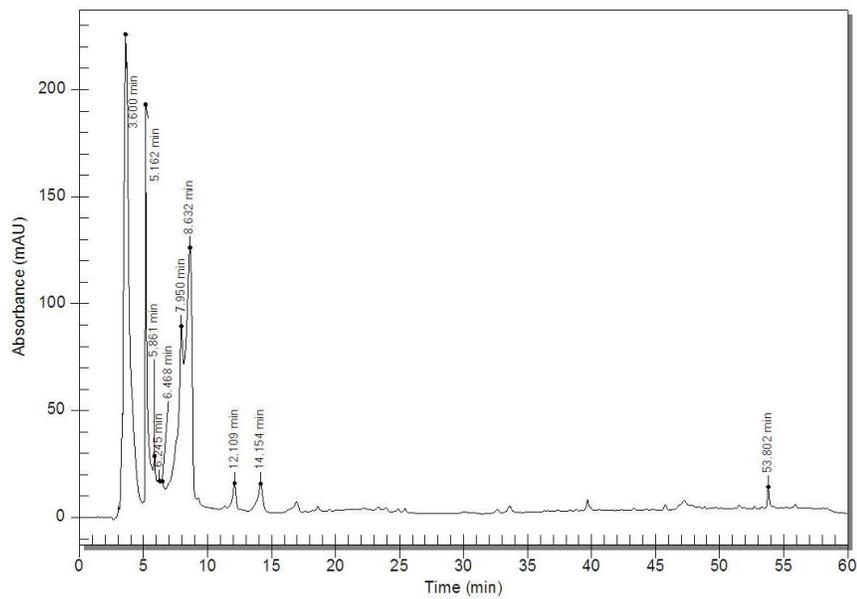
Anexo 3 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía por HPLC



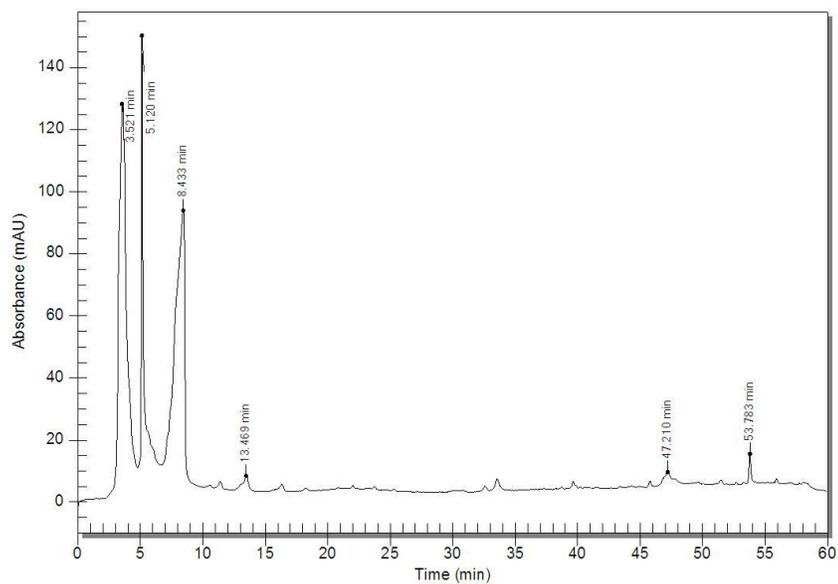
Anexo 4 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía por HPLC



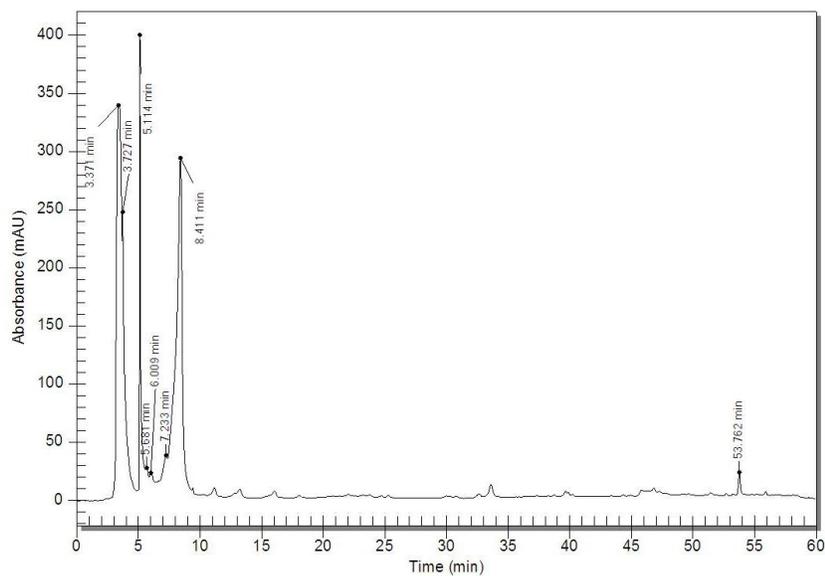
Anexo 5 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía por HPLC



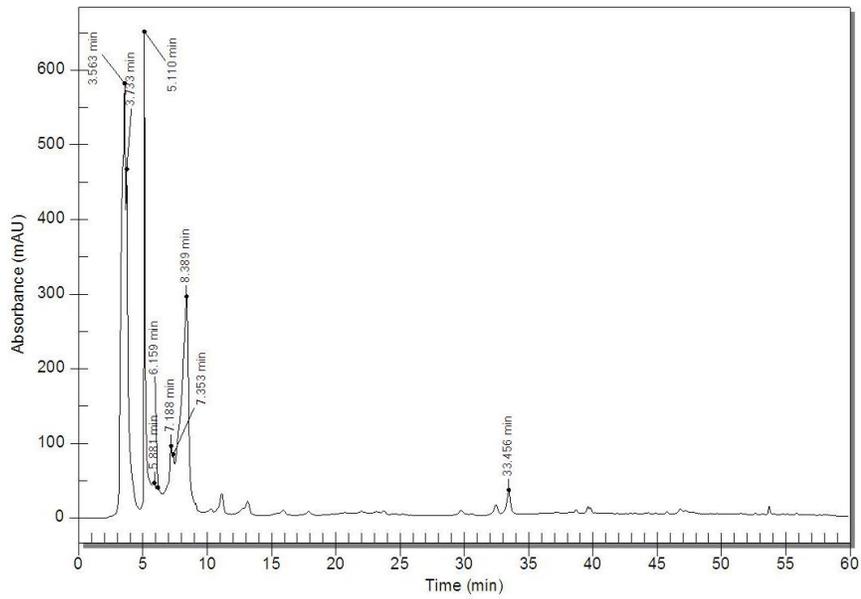
Anexo 6 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía por HPLC



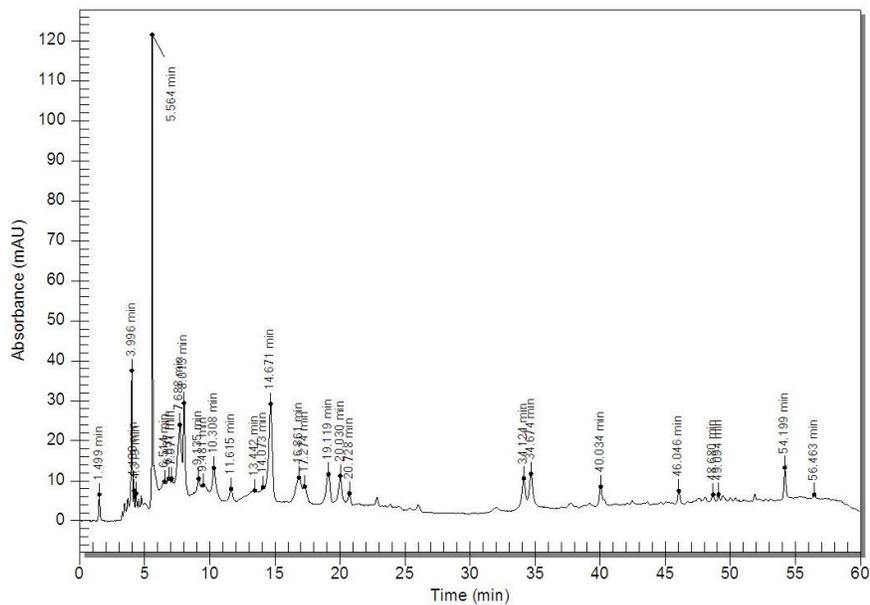
Anexo 7 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía por HPLC.



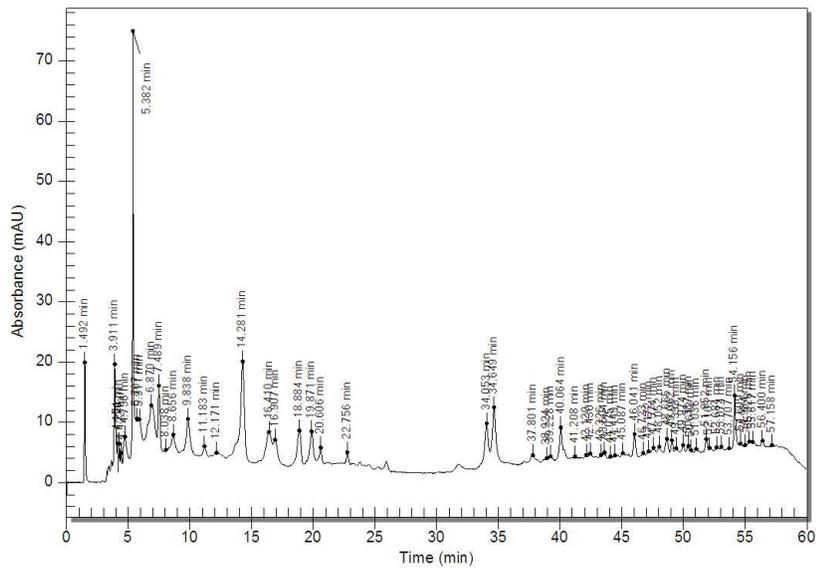
Anexo 8 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía por HPLC.



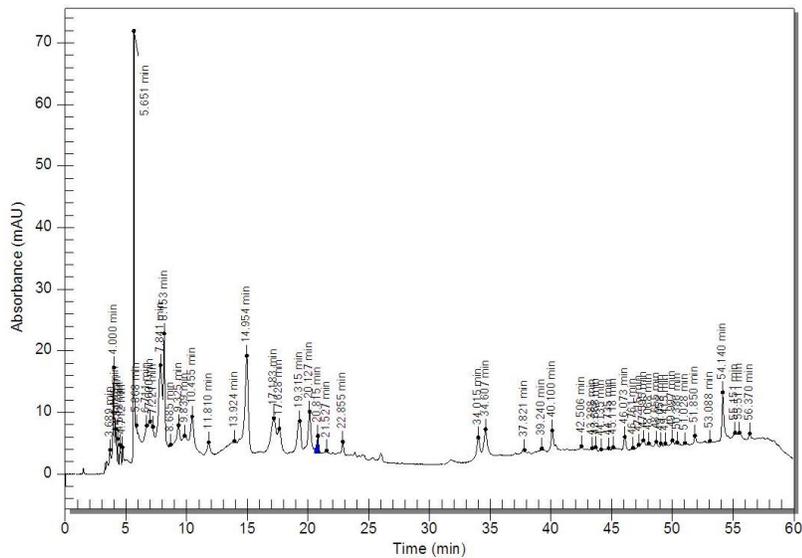
Anexo 9 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía por HPLC.



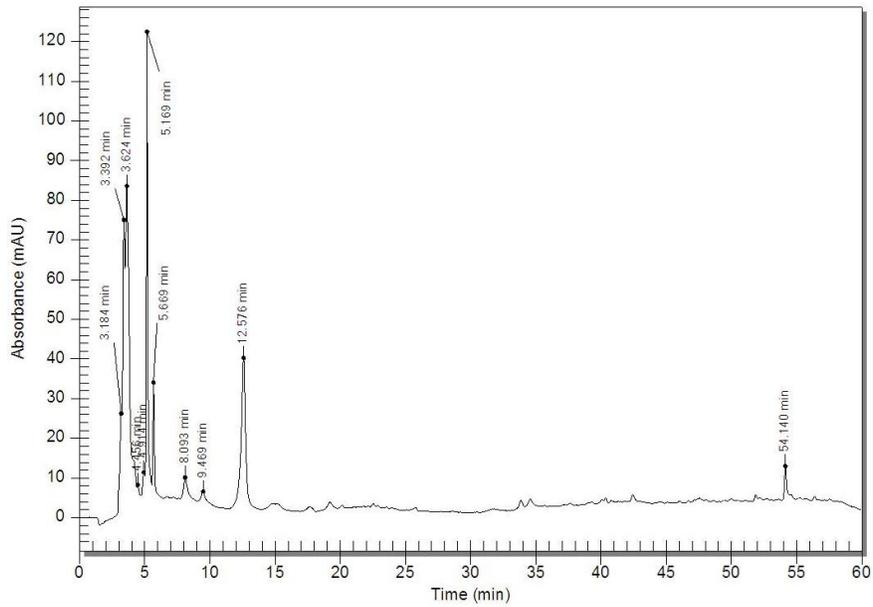
Anexo 10 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC.



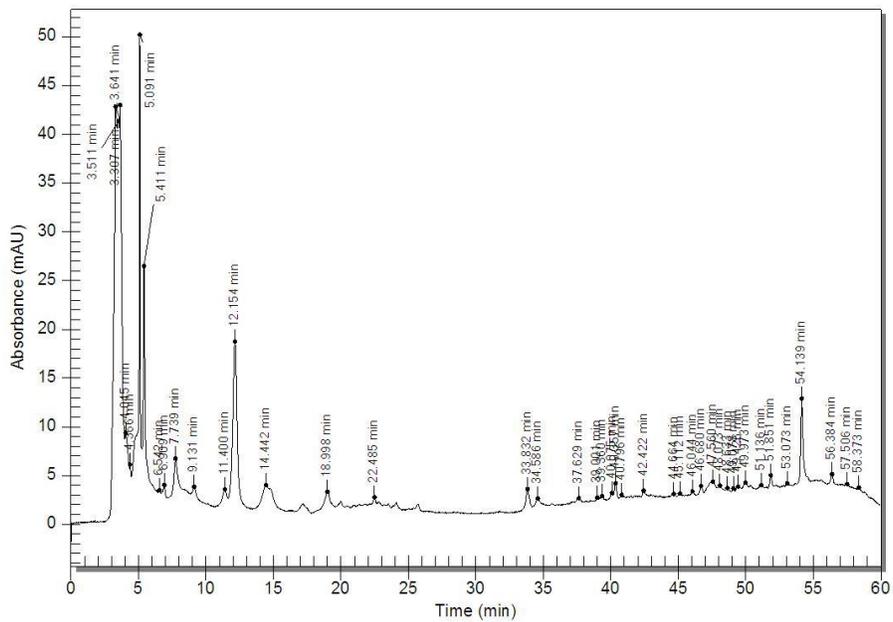
Anexo 11 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC



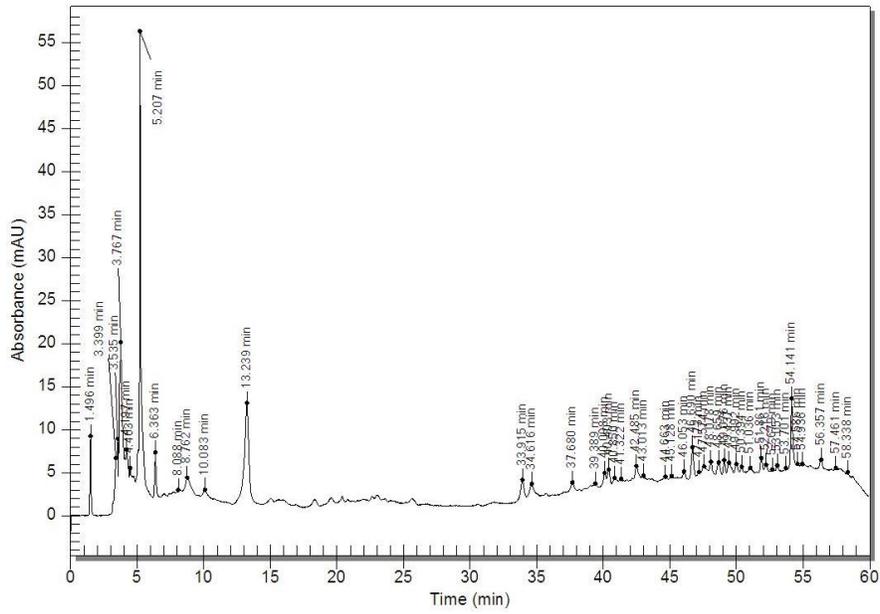
Anexo 12 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC



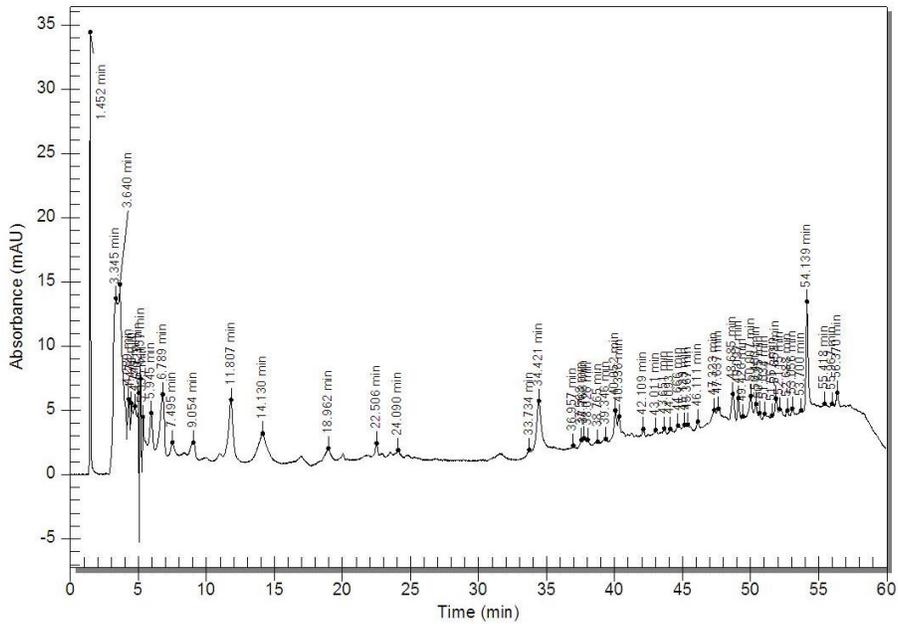
Anexo 13 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC.



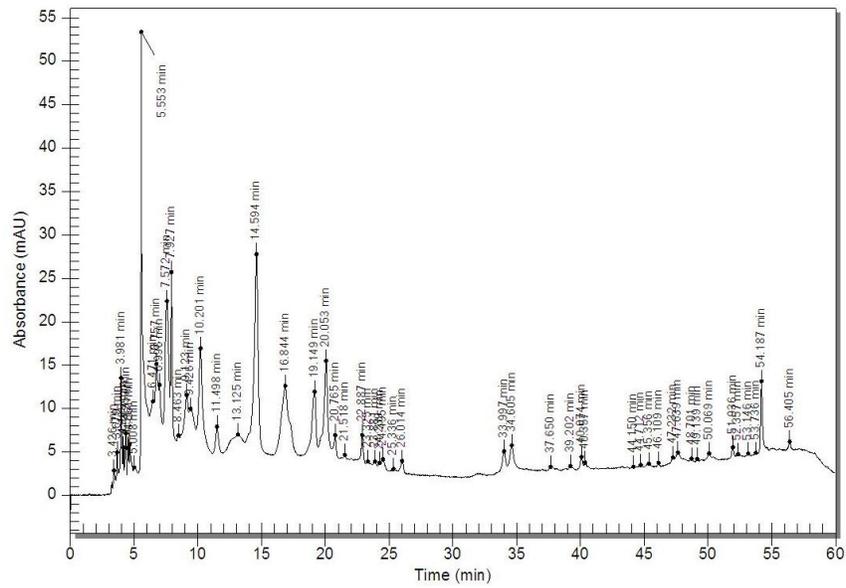
Anexo 14 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC.



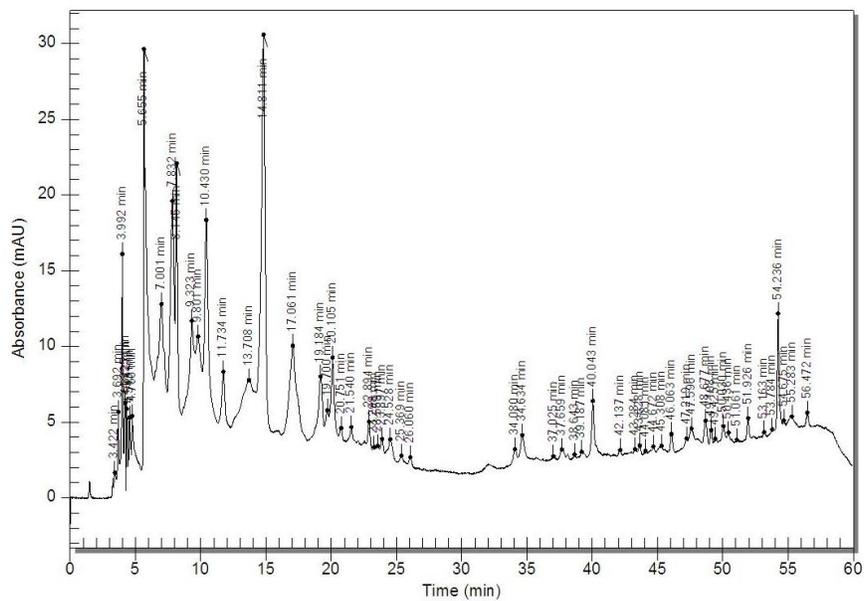
Anexo 15 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC



Anexo 16 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC



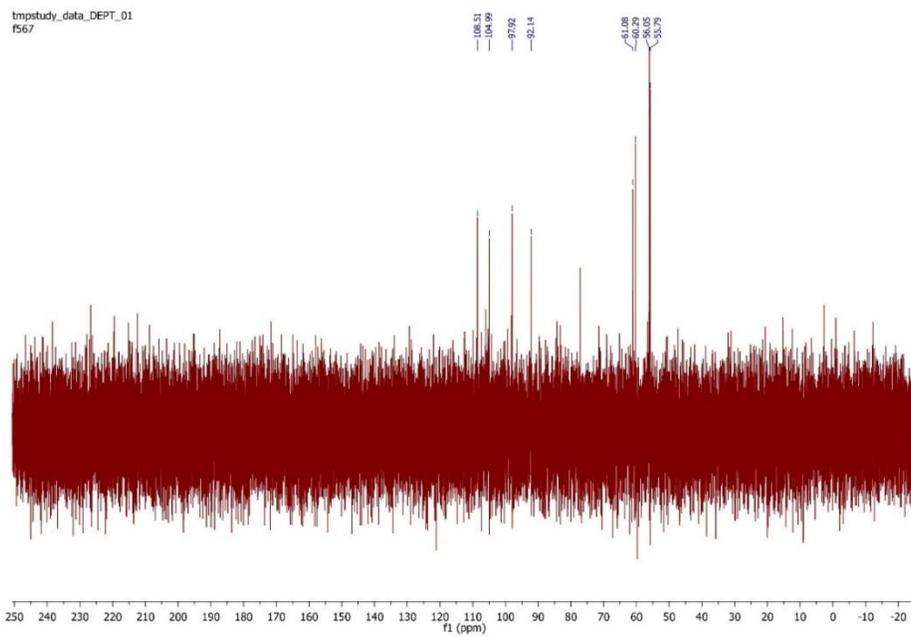
Anexo 17 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC



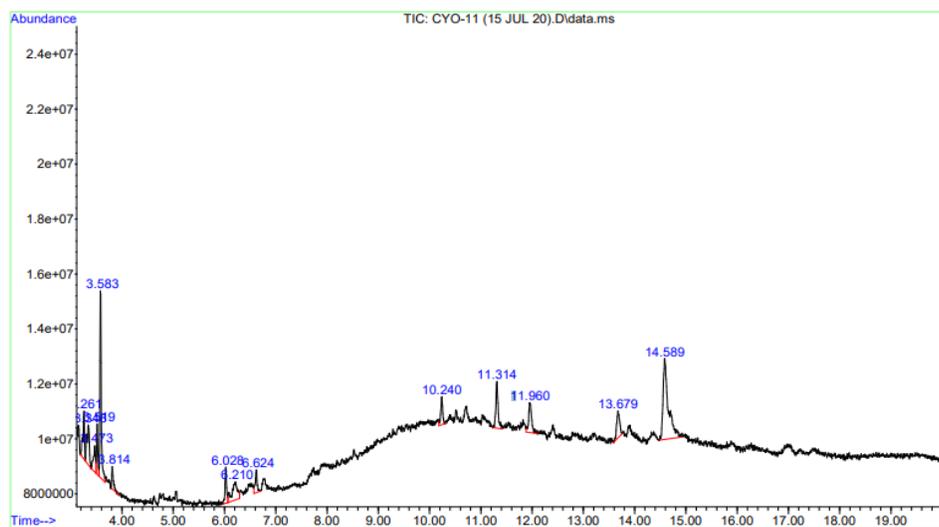
Anexo 18 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía por HPLC.

Rendimientos		
Fracción	Peso (mg)	Porcentaje %
1	0.018	0.06792453
2	0.021	0.07924528
3	0.0174	0.06566038
4	0.008	0.03018868
5	0.22	0.83018868
6	0.3	1.13207547
7	0.125	0.47169811
8	0.84	3.16981132
9	0.275	1.03773585
10	1.033	3.89811321

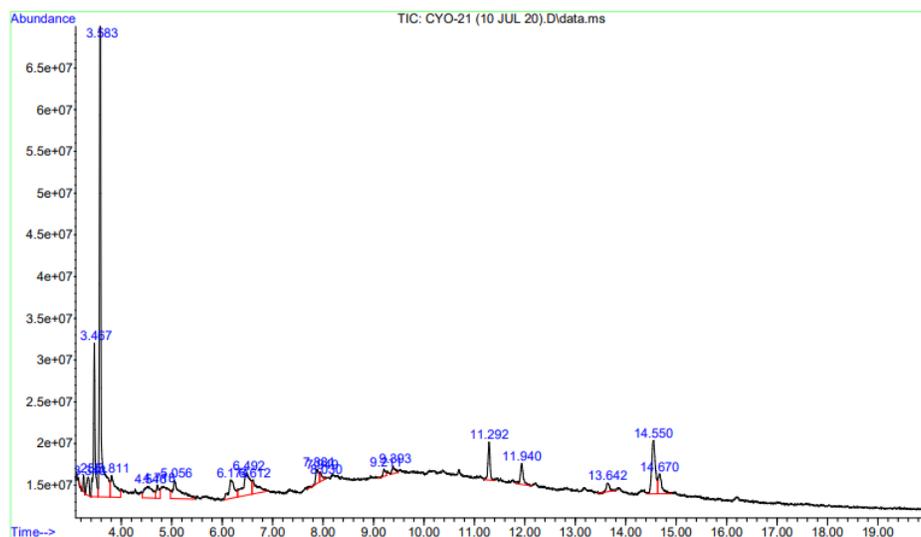
Anexo 19 Rendimientos de las fracciones de VLC del extracto de ACN de *Caesalpinia yucatanensis*



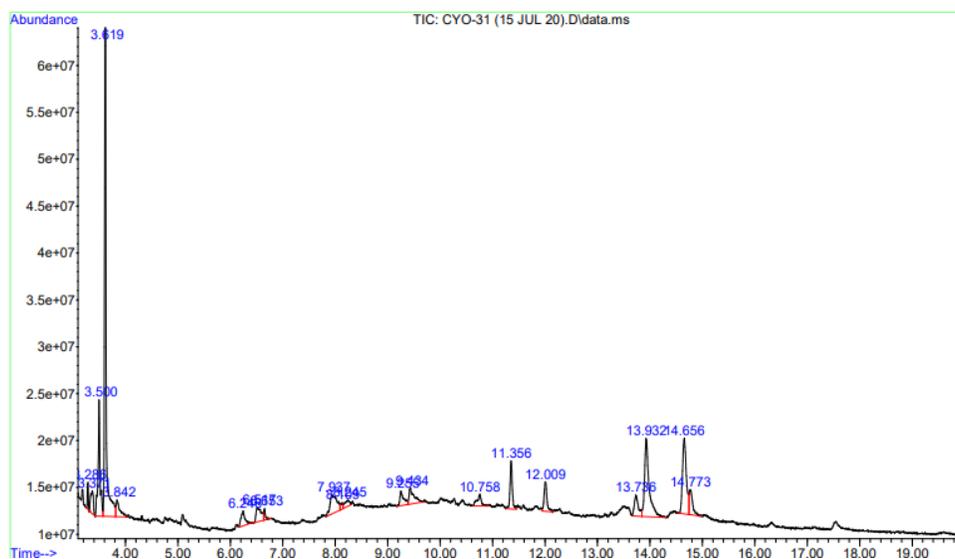
Anexo 20 DEPT de la fracción CCG-4851



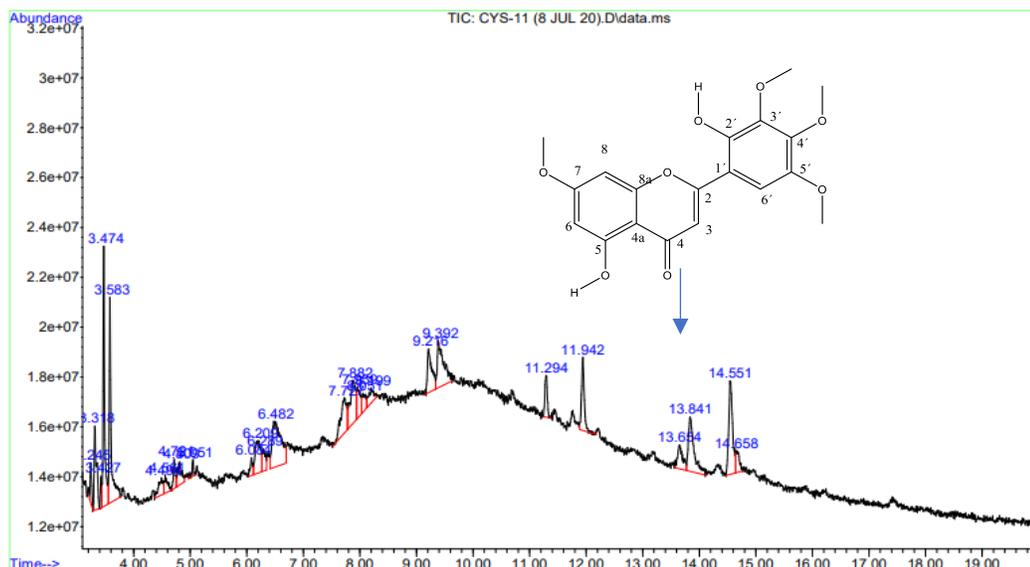
Anexo 21 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía de gases



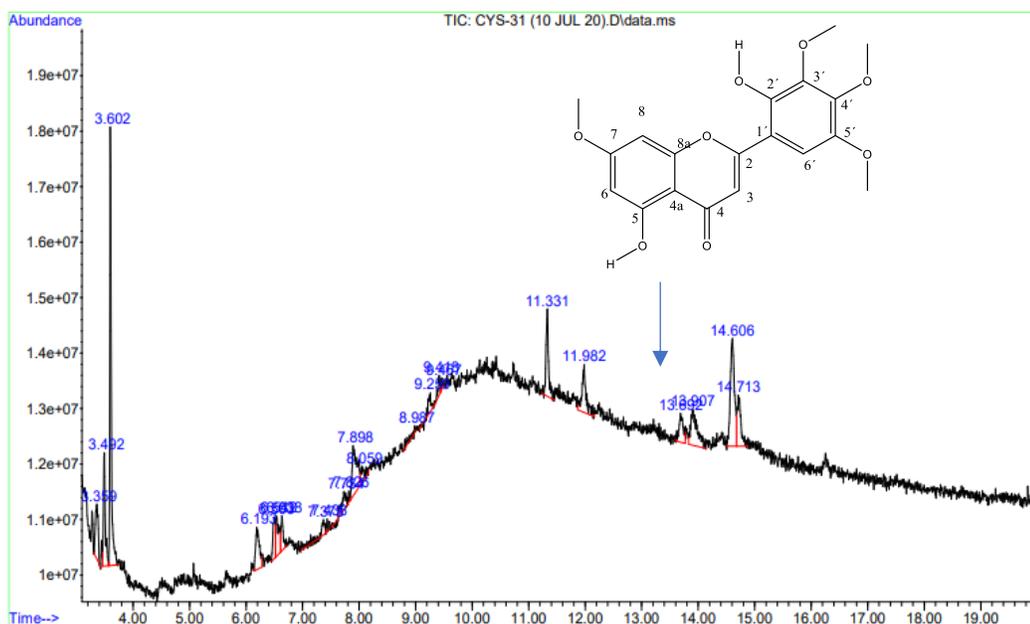
Anexo 22 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía de gases



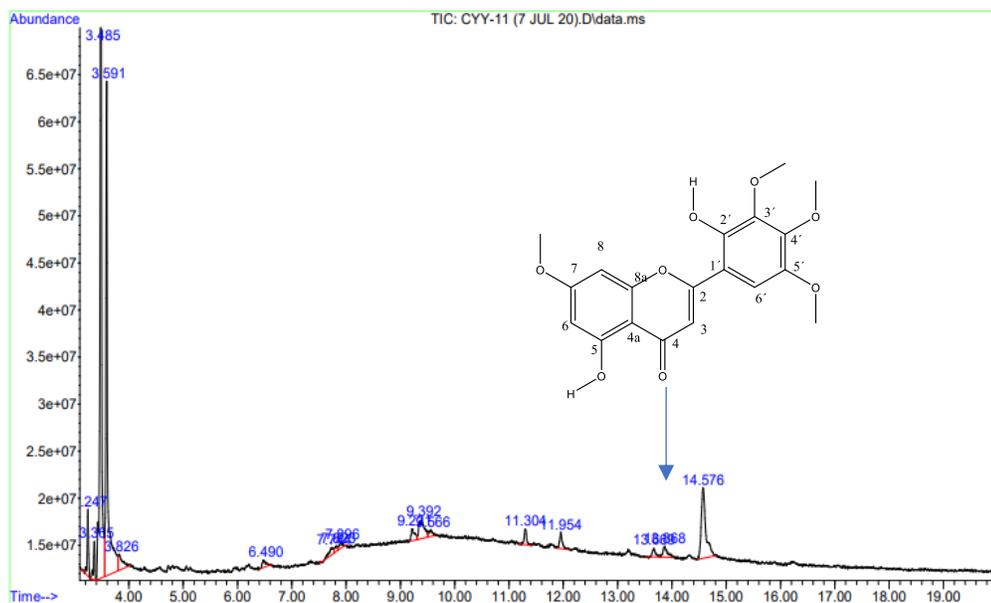
Anexo 23 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de secas por cromatografía de gases



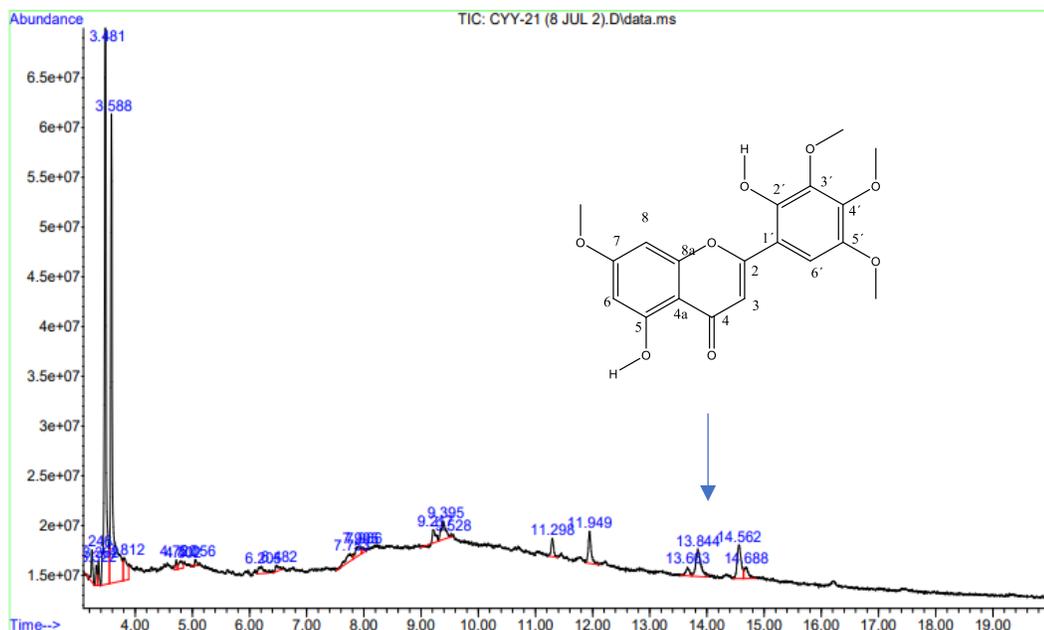
Anexo 24 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía de gases



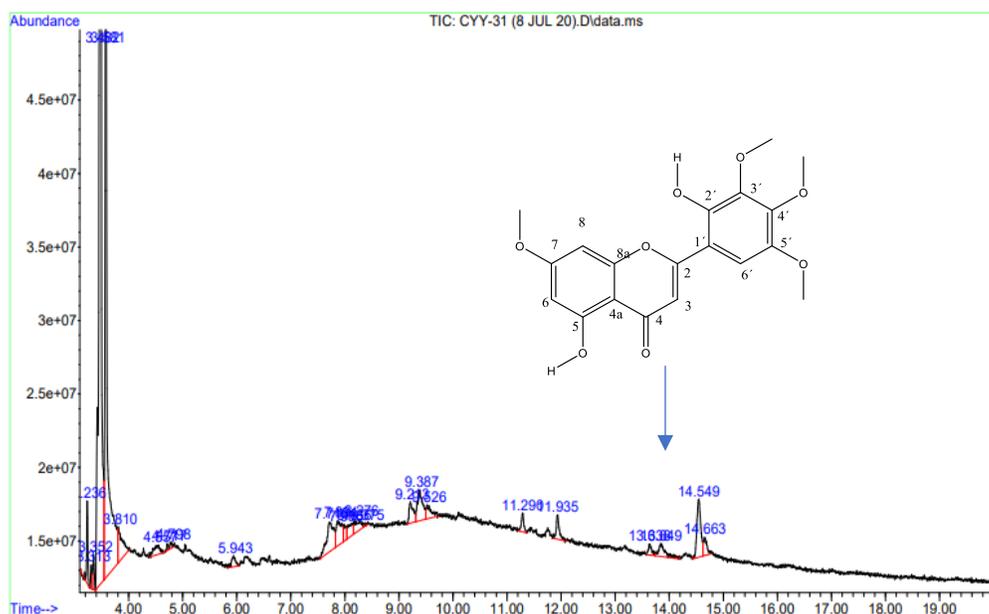
Anexo 25 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de secas por cromatografía de gases



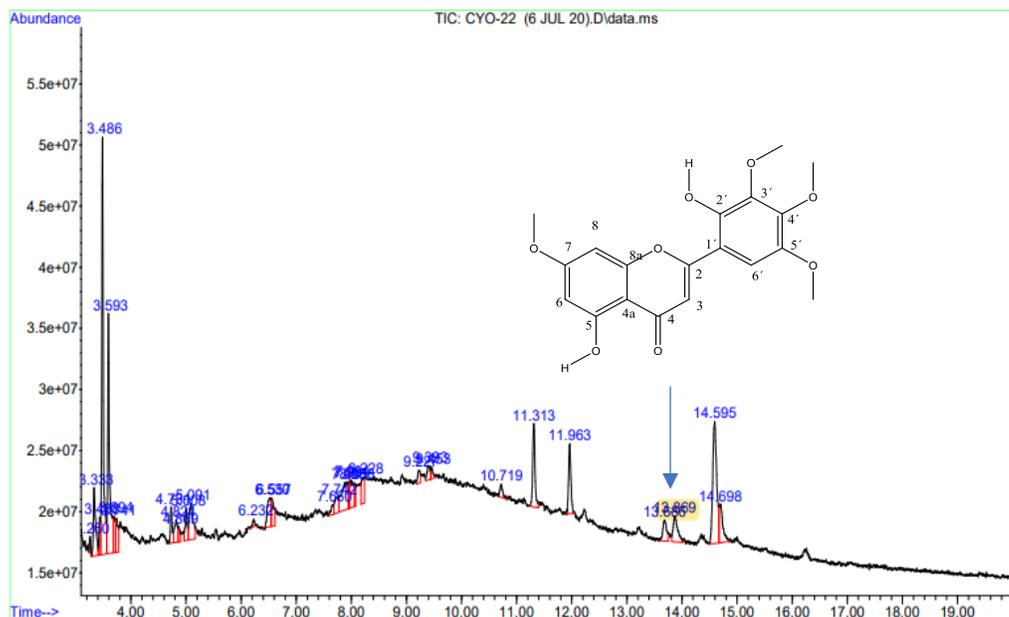
Anexo 26 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía de gases

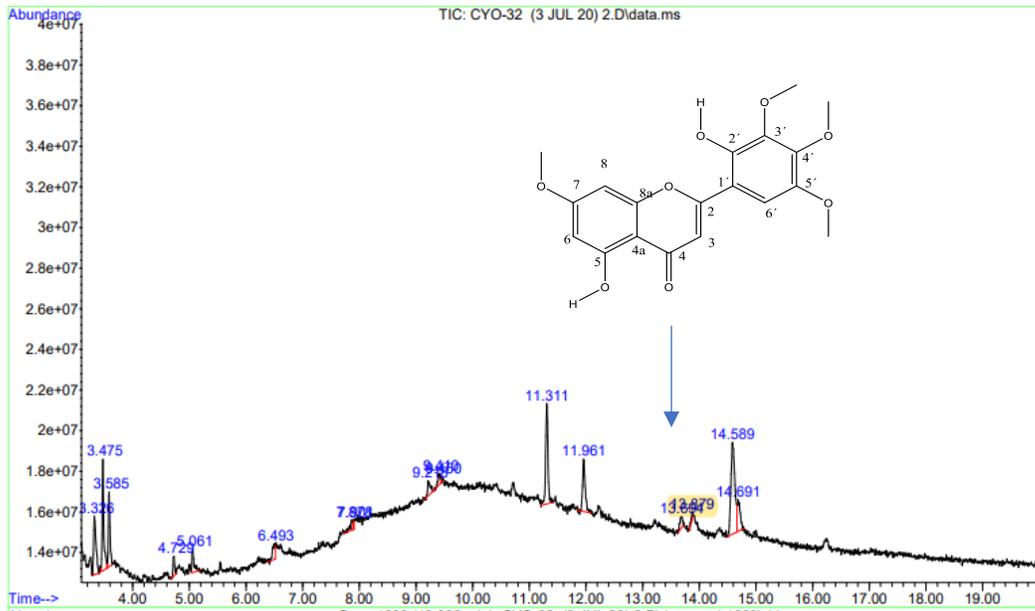


Anexo 27 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía de gases

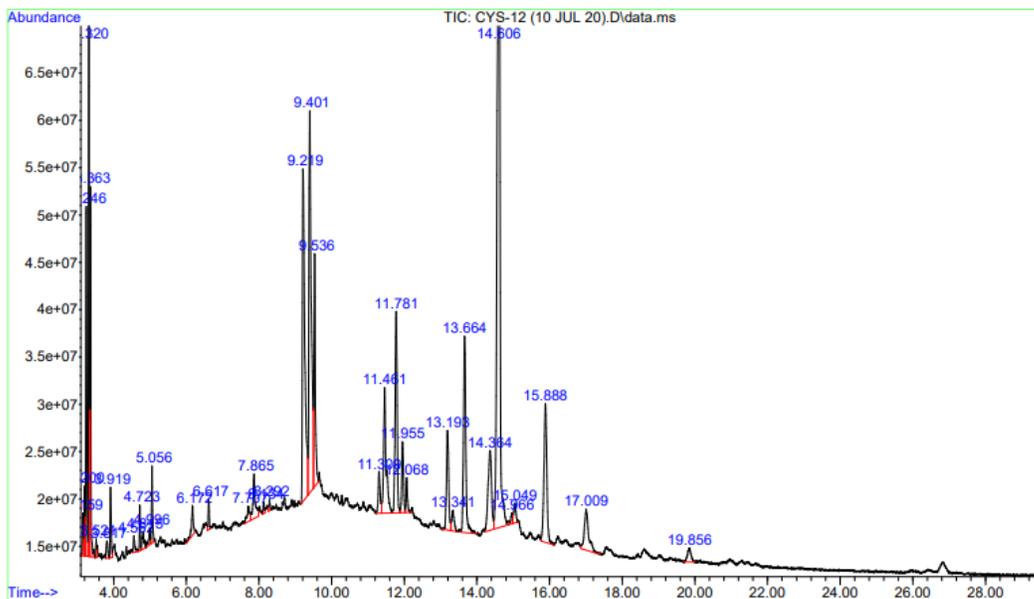


Anexo 28 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de secas por cromatografía de gases

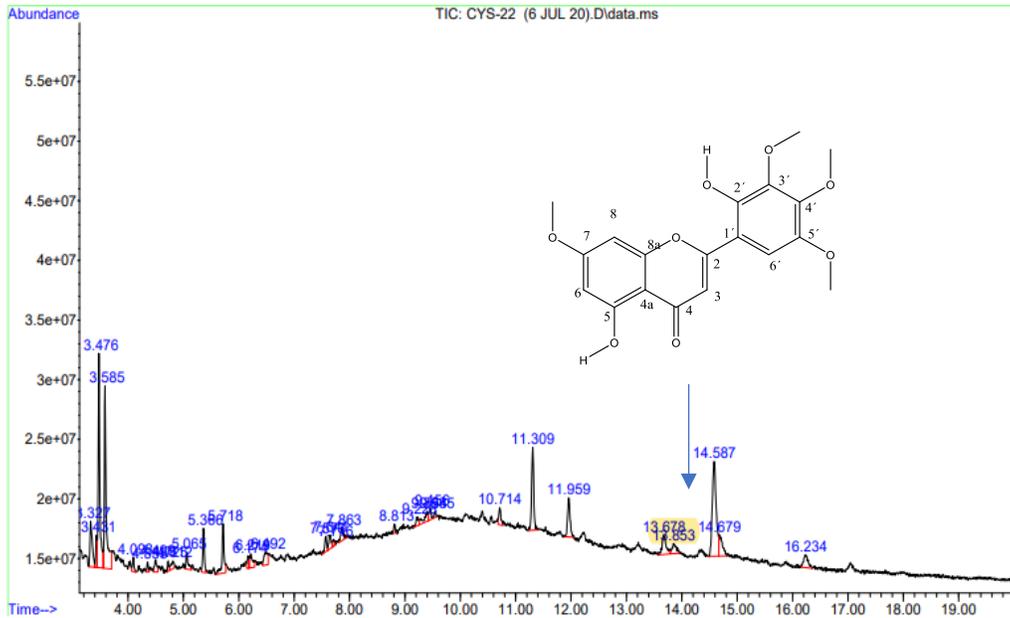




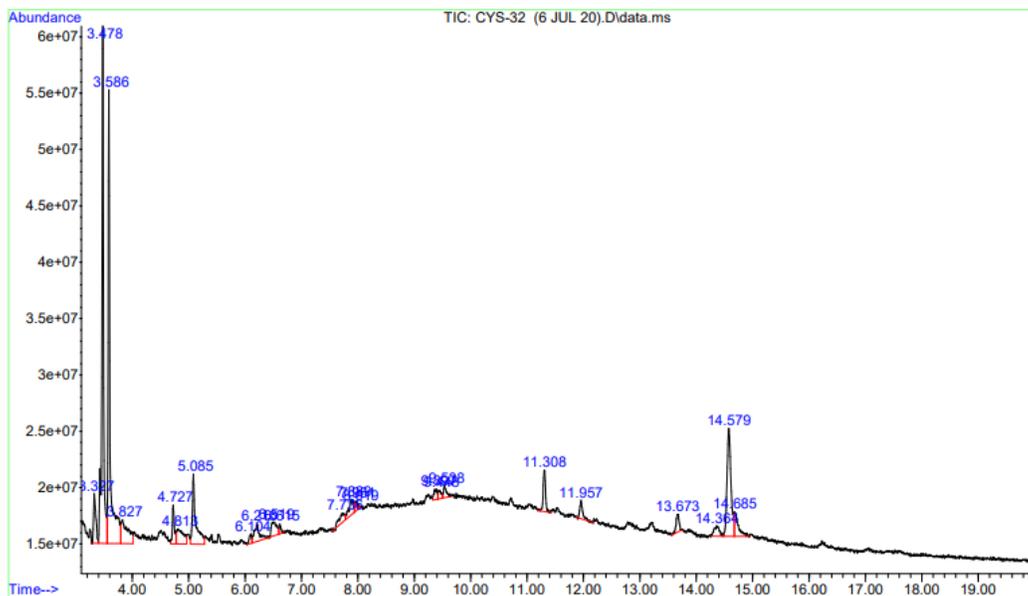
Anexo 30 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Oxkutzcab durante la época de lluvias por cromatografía de gases



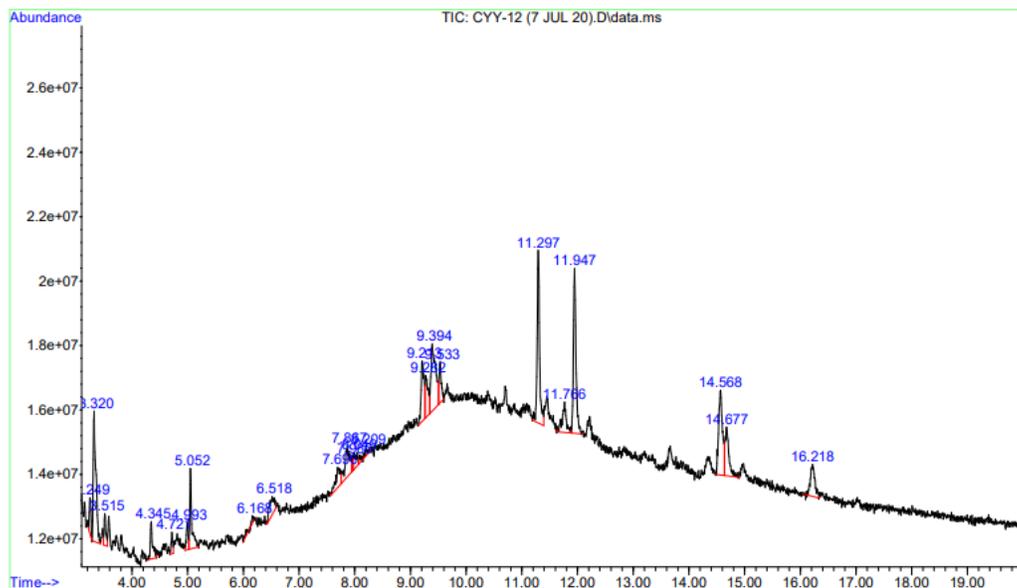
Anexo 31 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía de gases



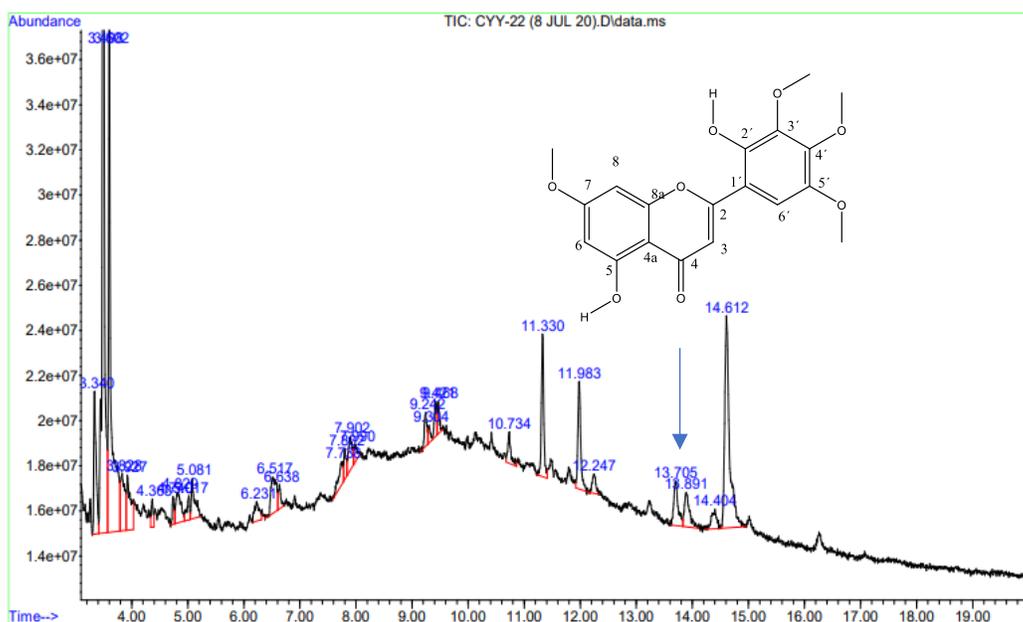
Anexo 32 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía de gases



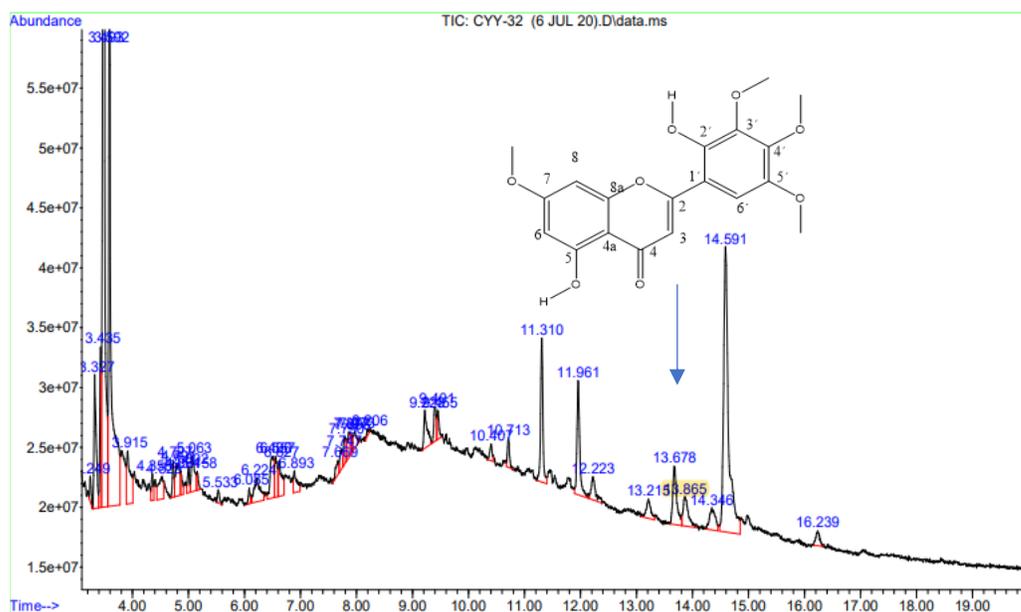
Anexo 33 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Sierra Papacal durante la época de lluvias por cromatografía de gases



Anexo 34 Perfil cromatográfico de la muestra uno de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía de gases



Anexo 35 Perfil cromatográfico de la muestra dos de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía de gases



Anexo 36 Perfil cromatográfico de la muestra tres de *C. yucatanensis* del municipio de Yaxcabá durante la época de lluvias por cromatografía de gases

BIBLIOGRAFÍA

1. Aboobucker Siddique I., Suza Walter P. (2019) ¿Why Do Plants Convert Sitosterol to Stigmasterol? *Frontiers in Plant Science*. Volume 10 pages 354
2. Acosta de la Luz, Lérica. (2003). Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(1)
3. Acosta L. (1995) Proporciónese salud. *Rev cubana Plant Med*. La Habana: Editorial Científico-Técnica;227.
4. Acosta L. (1995) Una planta medicinal, la Campana La Habana: Editorial Científico-Técnica; p.32.
5. Acosta L., Triana J., Jiménez L.E, Granda M., Fuentes V., Fernández A., et al. (1989) Variación en los contenidos de aceite esencial y (-)-alfa-bisabolol en la manzanilla (*Matricaria recutita*). I. Cosecha a diferentes horas del día. *Rev Plant Med*; 9:15-24.
6. Arceo-Medina, G. N, Rosado-Aguilar, J. A, Rodríguez-Vivas RI, et al. (2016) Acción sinérgica y antagónica de ácidos grasos, sulfuros y estilbeno contra garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes al acaricida. *Parasitología veterinaria*. 228: 121-125.
7. Ashrafia et al., 2018 M. Ashrafia , MR Azimi-Moqadama , P. Moradib , E. MohseniFarda , F. Shekaria , M. Kompany-Zareh Efecto del estrés por sequía sobre los ajustes de metabolitos en tomillos sensibles y tolerantes a la sequía *Plant Physiol. Biochem.* , 132 (2018) , págs.391 - 399
8. Ávalos García A., Pérez-Urria Carril E., (2009) Metabolismo secundario de plantas., *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal.119-145

9. Azhar N., Hussain B., Ashraf Y.M., Abbasim K.Y. (2011) El estrés hídrico mediados por cambios en el crecimiento, la fisiología y los metabolitos secundarios de desi ajwain (*Trachyspermum ammi*) Pak. J. Bot. , 43 (9) (2011) , pp. 15 – 19
10. Balaguera, H.E., Alvarez, H. J.G., Rodríguez, J. D. (2008). Effect of the water deficit on the transplant of tomato seedlings (*Solanun lycopersicum* L.). *Agronomía Colombiana*. 26 (2):246-255.
11. Baldim Zanin J.L., Bianca A. de Carvalho, Salles Martineli P., Henrique dos Santos M., Henrique G. Lago J., Sartorelli P., Cláudio Viegas, Jr. and Marisi G. Soares. (2012) The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics.. *Journal Molecules* 17, 7887-7902
12. Barquero A. (2007) Plantas Sanadoras: pasado, presente y futuro. *Revista Quimica Viva*. Volumen 2
13. Batubara I, Mitsunaga T, Ohashi H (2010) Brazilin de la madera de *Caesalpinia sappan* como agente antiacné. *J Wood Sci* 56 (1): 77–81
14. Borges et al., 2017 CV Borges , IO Minatel , HA Gomez-Gomez , GPP Lima Plantas medicinales: influencia de factores ambientales en el contenido de metabolitos secundarios. *Plantas medicinales y desafíos ambientales* (2017) , págs. 259 – 277
15. Borges-Argáez R. *Chan-Balan R., Cetina-Montejo L., Ayora-Talavera G. , Sansores-Peraza P., Gómez-Carballo J., Cáceres-Farfán M. .(2019) In vitro evaluación de antraquinonas de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) de raíz y varios derivados contra cepas del virus de la influenza. *Cultivos y Productos Indust*. Volume 132, Pages 468-475
16. Callohuari R, Sandoval Vegas M, Huamán Gutiérrez O. (2017). Efecto gastroprotector y capacidad antioxidante del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* 'tara', en animales de experimentación. *An Fac med*. ;78(1):61-6.
17. Cañigueral S., Dellacassa E., Bandoni A. I., (2003) Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Acta Farm. Bonaerense* 22 (3): 265-78

18. Carrada, T. (2010) Avances recientes en el diagnóstico, epidemiología y prevención de la influenza. Revisión crítica. *Rev Mex Patol Clin (en línea)*, 57,4-53
19. Carrasco L. (2006) Almendral J. Virus patógenos, Helice: España, pp. 378-381, 388
20. Carretero E.M, Ortega T (2017) Plantas medicinales con actividad expectorante: Tomillos. . Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Vol. 41, Nº. 405, 2017, págs. 692-697
21. Carrillo Rosario T.,Moreno G. (2007) The importance of medicinal plants in health care in three small villages of the Santa Ana county at Trujillo state, Venezuela. *Revista de la facultad de farmacia de Trujillo Venezuela*. 21-28
22. Carvalho RF, Takaki M., Azevedo R.A (2010) Pigmentos vegetales: las muchas caras de la percepción de la luz. *Acta Physiol. Planta*. 33: 241–248
23. Castañeda D.M. (2012) Agallotannin rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complement Altern Med*. 12:38.
24. Castro A. J., Domínguez F., Ruiz A.J.,Campos N., Zapata J.R., Carranza C., Maldonado J.J. (2017) Medicinal Plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for Humans: The Other Side of the Coin. *Hindawi*. 1-28.
25. Cheng L., M. Han , LM Yang , L. Yang , Z. Sun , T. Zhang
Cambios en las características fisiológicas y el metabolismo de la biosíntesis de baicalina de *Scutellaria baicalensis* Georgi bajo estrés por sequía
Ind. Cultivos Prod. , 122 (2018) , págs. 473 - 482
26. Chiang L.C; Chiang W.; Liu M.C; Lin C.C. (2003) Actividades antivirales in vitro de *Caesalpinia pulcherrima* y sus flavonoides relacionados. República de China. *J Antimicrob Chemother.*; 52 (2)
27. Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B.
28. Davies, W.J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:55-77.

29. DYQ Hong , AJ Lau , CL Yeo , XK Liu , CR Yang , HL Koh , Y. Hong
Diversidad genética y variación del contenido de saponina en raíces de *Panax notoginseng* de una sola explotación (2005)
J. Agric. Food Chem. , 53 (22) , págs.8460 - 8467
30. Estell et al., 2016 RE Estell , EL Fredrickson , DK James Efecto de la intensidad y longitud de onda de la luz sobre la concentración de metabolitos secundarios vegetales en las hojas de *Flourensia cernua* Biochem. Syst. Ecol. , 65 (2016) , pp. 108 – 114
31. Fang , CMAQ Yang , L. Yang , X. Chen Genómica grandiosa para metabolitos secundarios vegetales diversificados Plant Divers. Resour. , 33 (2011) , pp. 53 - 64
32. Ferrandino A., Lovisolo C. (2013) Efectos del estrés abiótico en la vid (*Vitis vinifera* L.): Centrarse en las consecuencias mediadas por el ácido abscísico sobre el metabolismo secundario y la calidad de las bayas. Reinar. Exp. Larva del moscardón. 103 : 138-147.
33. Figueiredo et al., 2008 AC Figueiredo , JG Barroso , LG Pedro , JJC Scheffer Factores que afectan la producción de metabolitos secundarios en plantas: componentes volátiles y aceites esenciales Flavor Fragrance J. , 23 (4) (2008) , págs. 213 – 226
34. Flores S, Durán R, Ortíz J (2010) Comunidades vegetales terrestres. En: Durán R, Méndez M (eds) Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, Yucatán, págs. 125–129
35. Fluck H. (1955) The influence of climate o the active principles in medicinal plants. J Pharm Pharmacol.7(6):361-83.
36. García E. (2004). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. México: Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 970-32-1010-4
37. García GG, Sosa EJ (2013) Ordenamiento territorial del estado de Yucatán. Visión 2030. Ed. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, págs. 13–28
38. Gasson p.;Warner, K.;Lewis, G. Wood (2009) Anatomy of *Caesalpinia* ss *Coulteria*, *Erythoestemon*, *Guilandina*, *Libidibia*, *Mezoneuron*, *Poncionela*, *Pomaria* and *Tara*.(Leguminosae, Caesolpinioidae, Caesalpinieae). LAWA J.(en línea),30,247-

39. Ibarra-Manriquez¹ C. *, Jose Luis Villasenor², Rafael Duran³ and Jorge Meave⁴. (2002). Biogeographical analysis of the tree flora of the Yucatan Peninsula. *Journal of Biogeography*, 29, 17-29
40. Isla V., Gomes A. B., Grace K. C. da Silva, G. Carvalho Ribeiro Rodrigues, C. Marques de Melo, H. Sátiro Xavier, I. (2011) Antonia de Souza. Phytochemical screening and evaluation of acute toxicity of crude etanolic extract of *Caesalpinia echinata* Lam. *Rev. Bras. Farm.* 92(3): 219-222, 2011
41. Jaafar H., MH Ibrahim , FNF Mohamad
Impacto de la capacidad de agua del campo del suelo en metabolitos secundarios, fenilalanina amoniaco liasa (PAL), maliondialdehído (MDA) y respuestas fotosintéticas de kacip fatimah de Malasia (*Labisia pumila* Benth)
Moléculas , 17 (6) (2012) , págs. 7305 - 7322
42. K.L. Kaul, K.A. Mangold, H. Du, K.M. Pesavento, J. Nawrocki, J.A. Nowak (2010), Influenza a subtyping: seasonal H1N1, H3N2, and the appearance of novel H1N1 *J. Mol. Diagnostics.*, 12 pp. 664-669
43. Karine da Silva Y., Silva Lucena dos Santos E.R., Da Silva E.M, Benaia Gonçalves de Franca Barros, Cleidiane Silva Vieira de Souza, Arruda Lima S.M, Scanoni Maia C., Antônia de Souza I. (2018) Atividades farmacológicas de *caesalpinia echinata*. *Anais do Congresso Nacional de Biólogos - Vol. 8: Congrebio*
44. Kirkham, M.B. (2005). *Principles of soil and plant water relations*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands
45. Kongkum N., Tuchinda P., Pohmakotr M., Reutrakul V., Piyachaturawat P., Jariyawat S., Suksen K., Yoosook C, Kasisit J., Napaswad C. (2012) DNA topoisomerase II α inhibitory and anti-HIV-1 flavones from leaves and twigs of *Gardenia carinata*. *Fitoterapia*. Volume 83. Pages 368-372
46. Kumar S., Singh j., Baghotia A. et al., (2013) "Potencial antifertilidad del extracto etanólico de *Caesalpinia pulcherrima* Linn. hojas ", *Asian Pacific Journal of Reproduction* , vol. 2, no. 2, págs. 90–92,

47. Leide J, U Hildebrandt, G Vogg, M Riederer (2011) The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *J. Plant Physiol.* 168:871-877.
48. Lencinas, M. V., Martínez P. G., Moretto A., Gallo, E., & Busso, C. (2007) Producción diferencial de biomasa en plántulas de *Nothofagus pumilio* bajo gradientes de luz y humedad del suelo. *Bosque (Valdivia)*, 28(3), 241-248.
49. Levitt, J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, NY
50. Li Y., DX Kong , HL Liang , H. Wu Contenido de alcaloides y composición de aceite esencial de *Mahonia breviflora* cultivada bajo diferentes ambientes de luz. *J. Appl. Larva del moscardón. Alimentos Qual.* , 91 (2018) , págs.171 - 179
51. Li Q., S. Lei , K. Du , L. Li , X. Pang , Z. Wang , M. Wei , S. Fu , L. Hu , L. Xu El análisis transcriptómico basado en RNA-seq descubre las vías de biosíntesis del ácido α -linolénico y del ácido jasmónico que responden a la aclimatación al frío en *Camellia japonica*
52. Li K., W. Huang , GL Wang , ZJ Wu , J. Zhuang Análisis del perfil de expresión de genes relacionados con el ácido ascórbico en respuesta al estrés por temperatura en la planta del té, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze *Genet. Mol. Res.* , 15 (2016) , pp. 1 - 10
53. Lusk Ch, A del Pozo. (2002). Survival and growth of seedlings of 12 Chilean rainforest trees in two light environments: Gas exchange and biomass distribution correlates. *Aust. Ecol.* 27:173-182.
54. MitreandN M., Camacho, (2013) Plantas Medicinales de la Cuenca Hidrografica del Canal de Panama, Editora Sibauste, Panamá, Panamá vol. 6
55. Mabberley DJ Mabberley's (2008) Plant-Book Un diccionario portátil de plantas, sus clasificaciones y usos. Prensa de la Universidad de Cambridge; Cambridge, Reino Unido
56. Manjarrez Zavala M.E., Gabina Arenas L., (1999) Virus influenza: Enigma del pasado y del presente., *Rev. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México.*290-299

57. Martínez Aguilar Y., Soto Rodríguez F., Almeida Saavedra M., Hermosilla Espinosa R., Martínez Yero O. (2012) Secondary metabolites and in vitro antibacterial activity of extracts from *Anacardium occidentale* L. (Cashew tree) leaves., *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(4): 320-329
58. Martinez Flores, S., Gonzales Gallego, J., Culebras, M., & Tuñón, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 271,272
59. Méndez-Espinoza, Claudia, & Vallejo Reyna, Miguel Ángel. (2019). Mecanismos de respuesta al estrés abiótico: hacia una perspectiva de las especies forestales. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56), 33-64.
60. Méndez-González M, R Durán-García, R Borges-Argáez, Peraza-Sánchez SR, Dorantes-Euan A, Tapia-Muñoz JL, et al. (2012) Flora medicinal de los mayas peninsulares. 1ª ed. Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC, Fordecyt-Conacyt, Fomix, Pronatura Península de Yucatán Mérida, Yucatán, México;
61. Méndez-González, Martha E., Torres-Avilez, Wendy M., Dorantes-Euán, Alfredo, & Durán-García, Rafael. (2014). Jardines medicinales en Yucatán: una alternativa para la conservación de la flora medicinal de los mayas. *Revista fitotecnia mexicana*
62. Mohamed S.Rajab Cantrell, Charles L. Franzblau, Scott G. Fischer, Nikolaus H. (1998) Antimycobacterial Activity of (E)-Phytol and Derivatives: A Preliminary Structure-Activity Study *Planta Med* Vol 64: pages 2-4
63. Morales D., Rodriguez P., Dell' Amico J. A., Torrecillas A., Sanchez-Blanco M. J. (2006). Efecto de altas temperaturas en algunas variables del crecimiento y el intercambio gaseoso de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. CV. Amalia). *Cultivos tropicales*. Vol. 27. No.1. pag. 45-48
64. Moreno, F.L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*. 27(02): 179-191
65. Munné-Bosch S, Alegre L (2002) The role of α -tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* 21: 31-57
66. Nakamura ES, Kurosaki F., Arisawa M., Mukainaka T., Okuda M., Tokuda H., Nishino H., Pastore F. (2002) Efectos quimiopreventivos del cáncer de los constituyentes de *Caesalpinia ferrea* y compuestos relacionados. *Cáncer Lett*. 177

: 119-124. doi: 10.1016 / S0304-3835 (01) 00708-X

67. Niazian M., Sadat-Noori S.A., Tohidfar T., Galuszka P., Mahdi Mortazavian S.M. (2019) Agrobacterium-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant. (2019) *Industrial Crops and Products* Volume 132 Pages 29-40
68. Novia Sembiring E., Berna Elya, Rani Sauriasari. (2018) Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn J.*; 10(1): 123-127
69. Oh, M., Park, S., Song, J. *et al.* (2020). Componentes químicos de las ramitas de *Caesalpinia latisiliqua* y su actividad antiviral. *J Nat Med* **74**, 26–33
70. Peng Y., D. Wang, J. Wang, K. Li, Z. Tan, Y. Shu, T. Jiang, (2017) A universal computational model for predicting antigenic variants of influenza A virus based on conserved antigenic structures *Sci. Rep.*, 7
71. Peña Núñez B.R., Duménigo González A., Martínez Hormaza I. (2015) Acción virucida directa sobre el virus influenza de un extracto de *Punica granatum* L (granada). *Rev Cubana Plant Med* vol.20 no.3 Ciudad de la Habana.
72. Pichardo A., Méndez X., Alvarado G., Ramirez P., Serrano R., Avila M., Meraz S., Orozco J., García-Bores A., J. Avila G. Hernández T. (2013) Antimicrobial
73. Piñeyro P.E., Baumeister E., Cappuccio J. A., Machuca M.A., Quiroga M.A., Tedoroff T., Perfumo C.J. (2010) Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: Evaluación mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA. *Revista Argentina de Microbiología.* 42: 98-101
74. Pizzani P.; Matute I.; De Martino.; Arias A.; Godoy, S.; Pereira L.; Palma J.; Rengifo M. (2006) Composición Fitoquímica y Nutricional de Algunos Frutos de Árboles de Interés Forrajero de Los Llanos Centrales de Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, vol. 47, núm. 2, Universidad Central de Venezuela Maracay, Venezuela.
75. Reid AH, Taubenberger JK. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol.* 2003 Sep;84(Pt 9):2285-2292. doi:

10.1099/vir.0.19302-0. PMID: 12917448.

76. Reyes, S. G., Venegas Casanova E. A., Chávez Gaona A. H., Eustaquio Saldarriaga C.L. (2010) Preliminary identification of secondary metabolites from aqueous and ethanolic extracts of the fruit and leaves of *Morinda citrifolia* L. "noni" and spectrophotometric quantification of total flavonoids., UCV – Scientia. 11-22
77. Rodriguez-Sanchez, P.V., Tacher SIL, . Ramirez-Marcial, N., Estrada-Lugo, E. (2019) Comparative analysis of fundo legal vegetation and mature vegetation in the town of Yaxcaba, Yucatán, México. BOTANICAL SCIENCES. Volumen: 97 Número: 1 Páginas: 50-64
78. Rosado-Aguilar, JA, Rodríguez-Vivas, RI, Borges-Argaez, R. et al. (2017) Actividad acaricida de extractos de hojas metanólicas de *Havardia albicans* y *Caesalpinia gaumeri* en *Rhipicephalus microplus* y su toxicidad para animales de laboratorio. Exp. Appl. Acarol 71, 345–354
79. Russell P.E. (2006) El desarrollo del control de enfermedades comerciales. *Planta Pathol.* 55: 585–594.
80. Saenjum C., Chaiyasut C., Kadchumsang S., Chansakaow S., Suttajit M. (2010) Actividad antioxidante y efectos protectores sobre el daño en el ADN del extracto de *Caesalpinia sappan* L. *J. Med. Plantas Res.* 4 : 1594-1608
81. Saenjum C., Chaiyasut C., Kadchumsang S., Chansakaow S., Suttajit M. (2010) Actividad antioxidante y efectos protectores sobre el daño en el ADN del extracto de *Caesalpinia sappan* L. *J. Med. Plantas Res.*; 4 : 1594-1608
82. Salisbury, F.B., Ross, C.W. (2000) *Fisiología de las plantas 1 Células: agua, soluciones y superficies*, Paraninfo Thomson learning. 305p.
83. Salvador C., Dellacassa E. Arnaldo I. Bandoni. (2003) *Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?*, *Actividad Farmacéutica Forense.* 265-278
84. Santacoloma Varón L.E., Granados J.E. (2012) Interrelation between the content of secondary metabolites of species *Gliricidia sepium* and *Tithonia diversifolia* and some physicochemical properties of soil., *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 53-62

85. Sarker S.D, Latif Z, Gris A.I. (2006) Aislamiento de productos naturales: una visión general. En: Sarker SD, Latif Z, Grey AI editors. Métodos en biotecnología. Humana Press Inc., Totowa N.J. pp. 1–25.
86. Sepúlveda Jiménez G., Porta Ducoing H., Rocha Sosa M. (2003) La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 21, núm. pp. 355-363
87. Shintani D DellaPenna D (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science 282: 2098-2100
88. SL Geng , ZX Cui , XC Huang , YF Chen , D. Xu , P. Xiong
Variaciones en el rendimiento y la composición del aceite esencial durante el crecimiento de la corteza de *Cinnamomum cassia*(2011)
Ind. Cultivos Prod. , 33 (1) , págs. 248 - 252
89. Smole, Hugo F. Guevara,²³ Edward A. Belongia,²⁴ Patricia A. Clark,²⁵ Sara T. Beatrice,²⁶ Ruben Donis,¹ Jacqueline Katz,¹ Lyn Finelli,¹ Carolyn B. Bridges,¹ Michael Shaw,¹ Daniel B. Jernigan,¹ Timothy M. Uyeki,¹ Derek J. Smith,^{2,3,4†} Alexander I. Klimov,¹ Nancy J. Cox¹. † (2009) Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses. Nueva York. Science 197-201
90. Solórzano Santos F., Miranda Novale M.G. (2009) Influenza. Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, UMAE.: 461-473
91. Szymańska et al., 2017 R. Szymańska , I. Ślesak , A. Orzechowska , J. Kruk
Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por alta temperatura y luz en las plantas Reinar. Exp. Larva del moscardón. , 139 (2017) , págs.165 - 177
92. Tafolla-Arellano, Julio C., González-León, Alberto, Tiznado-Hernández, Martín E., Zacarías García, Lorenzo, & Báez-Sañudo, Reginaldo. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. Revista fitotecnia mexicana, 36(1), 3-12.
93. Toegel S, Wu SQ, Otero M, Goldring MB, Leelapornpisid P, Chiari C et al (2012) *Caesalpinina sappan* extracto inhibe la sobreexpresión mediada por IL 1 β de las metaloproteinasas de la matriz en condrocitos humanos. Genes Nutr 7 (2): 307–318
94. Toro Montoya A.I., Aguirre Muñoz C. (2009) Influenza A. Editora Medica

colombiana. 111-131

95. Tuchinda P, Saiai A, Pohmakotr M, Yoosook C, Kasisit J, Napaswat C, Santisuk T., Reutrakul V. (2004) Anti-HIV-1 Cycloartanes from Leaves and Twigs of *Gardenia thailandica* Planta Med. 70:366.
96. Ulibarri E. (2008) Los generos de Caesalpinioidea (leguminosae) presentes en Sudamérica. Darwiniana. (en línea) 46, 69-163
97. Valdés, R. & Balbín, María Irene. (2000). Curso de fisiología y bioquímica vegetal. UNAH. La Habana, Cuba. 89 p.
98. Van Wyk B.-E., Wink M. (2015) Phytomedicines, drogas herbales y venenos. Prensa de la Universidad de Chicago; Chicago, IL, EE. UU
99. Verma N., S. Shukla Impacto de varios factores responsables de la fluctuación de los metabolitos secundarios of the plants. J. Appl. Res. Medicina. Aromat. Plantas , 2 (4) (2015) , pp. 105 – 113
100. Wang YZ, Sun S, Zhou Y (2011) Extracto del duramen seco de *Caesalpinia sappan* L. atenúa la artritis inducida por colágeno. J Ethnopharmacol 136: 271–278
101. Waterman , S.P.G Mole. (1994) Análisis de los metabolitos de plantas fenólicas. Ilustrados. 248 páginas
102. Wehner, F., H. Olsen, H. Tinel, E. Kinne-Saffran y R.K.H. Kinne. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 148, 1-80.
103. Wei, X. H.; Yang, S. J.; Liang, N.; Hu, D. Y.; Jin, L. H.; Xue, W.; Yang, S. (2013) Chemical constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) alston. Molecules 18, 1325–1336.
104. Wongphatcharachai M., Wang P., Enomoto S., Webby R.J., Gramer M.R., Amonsin A., Sreevatsan S. (2013) Neutra lizing DNA aptamers against swine influenza H3N2 viruse J. Clin. Microbiol., 51 pp. 46-54
- 105 Yang L., Kui-Shan W. , Ruan X , Ying-Xian Z. , Wei F Wang Q. (2018) Respuesta de los metabolitos secundarios de la planta a factores ambientales. Molecules. (4):pp 762.

- 106 Yanqun Li, Dexin Kong, Ying Fu, Michael R. Sussman, Hong Wu, The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants, *Plant Physiology and Biochemistry* (2020) Volume 148, Pages 80-89,
- 107 Yhasminie K. da Silva. (2019) Avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos de *Caesalpinia echinata* na atividade anti-inflamatória e antifúngica. Universidade Federal de Pernambuco
- 108 Zheng J., Yang B., Ruusunen V., Laaksonen O., Tahvonen R., Hellsten J., Kallio H. (2012) Diferencias de composición de los compuestos fenólicos entre los cultivares de grosella negra (*Ribes nigrum* L.) y su respuesta a la latitud y las condiciones climáticas. *J. Agric. Food Chem.*
- 109 Zhou R., WH Su , GF Zhang , YN Zhang , XR Guo Relación entre flavonoides y fotoprotección en *Erigeron breviscapus* desarrollado a la sombra transferido a la luz solar
- 110 Zhu Y., CH Xu , J. Huang , GY Li , XH Liu , SQ Sun , JH Wang Discriminación rápida de *Codonopsis lanceolata* cultivada en diferentes edades por FT-IR y 2DCOS-IR
- 111 Zobayed SMA, Afreen F., Kozai T. (2007) Cambios fitoquímicos y fisiológicos en las hojas de las plantas de hierba de San Juan en condiciones de estrés hídrico. *Reinar. Exp. Larva del moscardón.* 59 : 109-116.

Tesis Consultadas

Cetina L. (2016). Evaluación de la Actividad Antiviral de naftoquinonas aisladas de *Diospyros anisandra* contra el Virus de la Influenza. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Gallego M.G. (2016) Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles. Universidad politécnica de Catalunya Barcelona

Thec. Barcelona

May A.J. (2014). Evaluación de la Actividad Antiviral de Compuestos Obtenidos de *Caesalpinia yucatanensis* contra el Virus de la Influenza A (H1N1). Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Spadera S.G.(2018) Comparacion de la actividad antioxidante de cuatro metabolitos secundarios presentes en *Taraxacum officinale* (Diente de león) frente a N-acetil Cisteina un antioxidante comercial. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca

Valares C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Universidad de Extremadura

Memorias

Bello Jimenez E. (2016) Diterpenos de *Caesalpinia platyloba*. Universidad Autónoma de Guerrero. Tlamati Sabiduría, Volumen 7 Número Especial

Sitios Web

- CDC Centers for Disease Control and Prevention.(2020) Informe semanal de vigilancia de la influenza en EE. UU. Actualización 21 de noviembre de 2020 Disponible en <https://www.cdc.gov/> Acceso 22 de noviembre de 2020
- CONABIO (2019) Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Cocoite *Erythrostemon yucatanensis*. Disponible en <http://enciclovida.mx/especies/188957-caesalpinia-yucatanensis> Acceso 15 de enero de 2019
- Hindawi. (2019) Plantas medicinales de América del Norte, Centroamérica y el Caribe consideradas tóxicas para los humanos: la otra cara de la moneda Disponible en <https://doi.org/10.1155/2017/9439868>

Actualización 2 de noviembre de 2017D

- CLIMATE-DATA.ORG (2018) Sierra Papacal clima (México) Disponible en <https://es.climate-data.org/america-del-norte/mexico/yucatan/sierra-papacal-218486> Actualización 18 de diciembre de 2018
- SEMARNAT (2010) Parque Científico Tecnológico de Yucatán. Disponible en <http://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/yuc/estudios/2010/31YU2010UD057.pdf> Actualización 24 de agosto de 2020
- INAFED (2018) Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Disponible en <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM31yucatan/municipios/31056a.html>
- BOTANY.CZ (2018) *CAESALPINIA YUCATANENSIS* Greenm. – sapan. Disponible en <https://botany.cz/cs/caesalpinia-yucatanensis> Actualización de abril de 2015
- METEORED (2019) Clima en Oxkutzcab. Disponible en https://www.meteored.mx/clima_Oxkutzcab-America+Norte-Mexico-Yucatan--1-22230.html Actualización 10 agosto de 2019
- WEATHERSPARK (2019) El clima típico en cualquier lugar de la Tierra. Disponible en <https://weatherspark.com/>