



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-NEURAMINIDASA Y ANTICOAGULANTE
DE INFLORESCENCIAS Y SEMILLAS DE *CAESALPINNIA YUCATANENSIS***

Tesis que presenta

CLAUDIA MEJÍAS MÁRQUEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022

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 **CLAUDIA MEJÍAS MÁRQUEZ** titulado “**ACTIVIDAD ANTI-NEURAMINIDASA Y ANTICOAGULANTE DE INFLORESCENCIAS Y SEMILLAS DE CAESALPINNIA YUCATANENSIS**”, fue realizado en la **Unidad De Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de la **Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

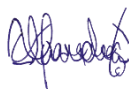


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 17 de enero de 2022

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.



Claudia Mejías Márquez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Aislamiento y evaluación antiviral de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* y *Caesalpinia yucatanensis*" con clave A1-S-27652, CONACYT-Ciencia Básica 2017-2018 en el que participé bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez.

AGRADECIMIENTOS

A la unidad de Materiales, en especial al Dr. Juan Cauich Rodríguez y la Dra. Nayeli Rodríguez por permitirnos el uso del lector de placas para la realización del ensayo de actividad anti-neuraminidasa, el cual fue adquirido por el proyecto de Atención a problemas Nacionales 248378.

A la técnica Mirbella Cáceres Farfán por su asesoría y capacitación en el uso del equipo HPLC.

Al IQI Santiago Duarte Aranda, por su apoyo en la realización de los espectros de FTIR.

Al Dr. Víctor Manuel Aguilar por su apoyo en la realización y obtención de los perfiles de HPLC-masas.

A la Dra. Blondy Canto Canché por su asesoramiento en el ensayo de actividad enzimática.

A mi comité tutorial por su apoyo y observaciones para mejorar el presente trabajo

A mi familia

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO I	1
ANTECEDENTES.....	1
I.1. COAGULACIÓN SANGUÍNEA	1
I.2 COAGULACIÓN SANGUÍNEA ANORMAL Y LAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS	1
I.3 ENFERMEDADES VIRALES Y COAGULACIÓN	2
I.4 VIRUS DE LA INFLUENZA Y COAGULACIÓN	3
I.5 FÁRMACOS ANTIVIRALES Y ANTICOAGULANTES.....	4
I.6 LAS PLANTAS COMO FUENTE DE FÁRMACOS.....	7
I.7 PLANTAS DEL GÉNERO CAESALPINNIA.....	10
I.8 <i>CAESALPINNIA YUCATANENSIS</i> GREENM	13
I.9 JUSTIFICACIÓN.....	14
CAPITULO II	16
OBJETIVOS	16
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPITULO III.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
III.1 REACTIVOS	17
III.2 MATERIAL Y EQUIPO	18
III.3 MATERIAL VEGETAL	18
III.4 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE <i>CAESALPINNIA</i> <i>YUCATANENSIS</i>	18
III.5 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LAS INFLORESCENCIAS DE <i>CAESALPINNIA</i> <i>YUCATANENSIS</i>	18
III.6 METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTI-NEURAMINIDASA	19
III.7 METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE	20
III.8 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN CON ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE Y ANTI- NEURAMINIDASA.....	21

III.9 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR.....	22
III.9.1 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE FLAVONOIDES	22
III.9.2 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE SAPONINAS.....	23
III.9.3 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE TRITERPENOS.....	23
III.9.4 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE CARBOHIDRATOS.....	23
III.9.5 ANÁLISIS POR HPLC DE LA FRACCIÓN CYF1	24
III.10 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	24
III.10.1 ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR	24
III.10.2 ESPECTROSCOPIA RMN.....	24
CAPÍTULO IV	26
RESULTADOS	26
IV.1 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE <i>CAESALPINNIA</i>	
<i>YUCATANENSIS</i>.....	26
IV.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE INFLORESCENCIAS Y	
SEMILLAS DE <i>CAESALPINNIA YUCATANENSIS</i>	31
IV.5 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA FRACCIÓN CYF1B	33
IV.5.1 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	34
IV.5.2 ANÁLISIS POR HPLC DE LA PARTICIÓN CYF1.....	34
IV.6. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA.....	35
IV.6.1. ANÁLISIS DE RMN-1H	35
CAPÍTULO V	38
CONCLUSIONES	38
ANEXO I.....	39
REFERENCIAS	40

LISTADO DE ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
An	Acetona
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
DTC	Diterpenos tipo casano
GC-MS	Cromatografía gaseosa con Espectrometría de Masas
Hx	Hexano
IS	Índice de selectividad
ACN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
NO	Monóxido de nitrógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
T&CM	Medicina Tradicional y Complementaria
VLC	Cromatografía líquida al vacío
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Factor tisular en la producción de dímero D viral mediada por la trombina (factor IIa [FIIa]).	3
Figura 2 Anticoagulantes clásicos más utilizados. A) Warfarina B) Heparina	6
Figura 3 Fármacos aprobados que inhiben el factor FXa y poseen actividad antiviral indirecta	7
Figura 4 Moléculas aisladas de plantas que han sido utilizadas como modelos estructurales para el desarrollo de fármacos comerciales. A) Cromolina B) Galegina C) Quinina D) Artemisina E) Vincristina, F) Paclitaxel.	9
Figura 5 Moléculas aisladas de plantas con actividad antiviral A) Apigenina B) Quercetina C) Ácido glicirrízico	10
Figura 6 Distribución de <i>Caesalpinnia yucatanensis</i> en la península de Yucatán	14
Figura 7 Estrategia experimental	17
Figura 8 Diagrama de obtención de las fracciones CYF1A, CYF1B y CYF1C	21
Figura 9 Reacción propuesta para la identificación de flavonoides mediante el ensayo de Shinoda	22
Figura 10 Mecanismo del ensayo fenol-sulfúrico para la identificación de carbohidratos	23
Figura 11 Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas a partir de semillas de <i>C. yucatanensis</i>	27
Figura 12 Análisis por CCD del extracto metanólico CYF y las fracciones CYF1 (B) y CYF2(C). Fase móvil: CH ₂ Cl ₂ /MeOH.	28
Figura 13 Ensayo enzimático fluorescente utilizando la neuraminidasa de <i>Clostridium perfringes</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14 Comportamiento de la fluorescencia durante el ensayo de inhibición enzimática A) Control negativo (buffer + enzima + sustrato) B) Fracciones CYS1, CYS2, CYS3 y CYF1	29
Figura 15 Comportamiento de la fluorescencia en el ensayo enzimático con neuraminidasa A) CYF1A B) CYF1B C) CYF1C	30
Figura 16 Resultados del análisis colorimétrico de la fracción CYF1B	34
Figura 17 Caracterización cromatográfica de la fracción CYF1B A) Cromatograma HPLC B) Cromatofolio de fase reversa, fase móvil H ₂ O/MeOH 1:1	35
Figura 18 Espectro de RMN- ¹ H de la fracción CYF1B	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Partes más estudiadas de las plantas del género <i>Caesalpinnia</i>	11
Tabla 2 Valores de CI_{50} para las fracciones CYF1A, CYF1B, CYF1C	30
Tabla 3 Valores de tiempos de coagulación obtenidos a partir de una solución de 20 mg/ml de extractos de inflorescencias y semillas de <i>Caesalpinnia yucatanensis</i>	31
Tabla 4 Valores de tiempos de coagulación obtenidos a partir de una solución de 10 mg/ml de extractos de inflorescencias y semillas de <i>Caesalpinnia yucatanensis</i>	32

RESUMEN

La trombosis es una complicación clínica común de la influenza grave. Los pacientes con una infección grave por influenza a menudo muestran alteraciones típicas de la coagulación. La sobreactivación de la coagulación por influenza exagera el riesgo de enfermedades pulmonares y cardíacas. La investigación de nuevas fuentes de moléculas de origen natural que puedan atender ambas patologías es de especial interés. El género *Caesalpinnia* ha demostrado contener compuestos con actividades farmacológicas diversas, entre estas antivirales y anticoagulantes. En éste trabajo se realizó la evaluación *in vitro* de la actividad anti-neuraminidasa y anticoagulante de extractos obtenidos a partir de las inflorescencias y semillas de *Caesalpinnia yucatanensis*, planta nativa de la península de Yucatán. Para la evaluación de la actividad anti-neuraminidasa se empleó el ensayo de inhibición enzimática con el sustrato 4-ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico y la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*. Como control positivo se empleó un producto natural con actividad anti-neuraminidasa (quercetina). Para la evaluación de la actividad anticoagulante se empleó el ensayo de tiempo de protrombina, utilizando heparina como control positivo.

Los extractos de inflorescencias y semillas fueron particionados y fraccionados de forma biodirigida. Los resultados indicaron que las particiones y fracciones polares de inflorescencias de *C. yucatanensis* presentaron actividad anti-neuraminidasa. La fracción CYF1B presentó un valor de CI_{50} de 0.15 mg/mL. Los resultados de la actividad anticoagulante indicaron que las particiones y fracciones polares de *C. yucatanensis* mostraron los tiempos de coagulación significativamente más largos respecto al control ($p < 0.05$ - test de Fischer). La fracción CYF1B retrasó el tiempo de coagulación en un 26%. Las semillas de *Caesalpinnia yucatanensis* no presentaron actividad anticoagulante ni actividad anti-neuraminidasa significativa.

La fracción CYF1B fue caracterizada de manera preliminar mediante ensayos colorimétricos y espectroscópicos. Fue posible detectar la presencia de carbohidratos y flavonoides. En la literatura se reporta la actividad anti-neuraminidasa y anticoagulante este tipo de metabolitos, lo cual se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos y permite concluir que las inflorescencias de *C. yucatanensis* tienen un alto potencial farmacológico.

ABSTRACT

Thrombosis is a common clinical complication of severe influenza. Patients with severe influenza infection often show typical coagulation disorders. Overactivation of coagulation by influenza exacerbates the risk of pulmonary and cardiac disease. The investigation of new sources of naturally occurring molecules that can address both pathologies is of particular interest. The genus *Caesalpinnia* has been shown to contain compounds with diverse pharmacological activities, including antiviral and anticoagulant activities. In this work, the *in vitro* evaluation of the anti-neuraminidase and anticoagulant activity of extracts obtained from the flowers and seeds of *Caesalpinnia yucatanensis*, was carried out. For the evaluation of the anti-neuraminidase activity, the enzymatic inhibition assay was used with the substrate 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid and *Clostridium perfringens* neuraminidase. A natural product with anti-neuraminidase activity (quercetin) was used as a positive control. The prothrombin time assay was used to evaluate the anticoagulant activity, using heparin as a positive control.

Flowers and seed extracts were partitioned and fractionated in a bioguided manner. The results indicated that the partitions and polar fractions of *C. yucatanensis* flowers showed anti-neuraminidase activity. The CYF1B fraction presented an IC_{50} value of 0.15 mg/mL. The results of the anticoagulant activity indicated that the partitions and polar fractions of *C. yucatanensis* showed significantly longer coagulation times with respect to the control ($p < 0.05$ - Fischer's test). The CYF1B fraction delayed the clotting time by 26%. *Caesalpinnia yucatanensis* seeds didn't display anticoagulant nor anti-neuraminidase activity.

The CYF1B fraction was preliminarily characterized by colorimetric and spectroscopic assays. It was possible to detect the presence of carbohydrates and flavonoids. The literature reports the anti-neuraminidase and anticoagulant activity of these metabolites, which is in agreement with the results obtained and allows us to conclude that *C. yucatanensis* flowers have a high pharmacological potential.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

I.1. Coagulación sanguínea

Se denomina coagulación al proceso por el cual la sangre pierde su liquidez convirtiéndose en un gel, para formar un coágulo. Este proceso potencialmente desemboca en la hemostasis, es decir, en el cese de la pérdida de sangre desde un vaso dañado, seguida por su reparación. El mecanismo de coagulación involucra la activación, adhesión y agregación plaquetaria, junto con el depósito y maduración de la fibrina. Los desórdenes de la coagulación son estados de enfermedad que pueden provocar hemorragias espontáneas, formación de hematomas o coagulación obstructiva (trombosis) (Chee, 2014).

La coagulación comienza casi instantáneamente después de que una herida daña el endotelio de un vaso sanguíneo. La exposición de la sangre al espacio que se encuentra debajo del endotelio inicia dos procesos: cambios en las plaquetas, y exposición del factor tisular subendotelial al factor VII del plasma, lo cual conduce finalmente a la formación de fibrina (Palta et al., 2014). Las plaquetas inmediatamente forman un tapón en el sitio de la lesión; este proceso se denomina hemostasis primaria. La hemostasis secundaria ocurre en simultáneo; los factores de coagulación proteicos más allá del factor VII responden en una compleja cascada de reacciones enzimáticas para formar fibras de fibrina, que fortalecen el tapón de plaquetas.

I.2 Coagulación sanguínea anormal y las patologías asociadas

Un trastorno de coagulación, significa que no se tienen suficientes plaquetas o factores de coagulación o éstos no funcionan como deberían. Los problemas de coagulación pueden ocurrir por otras enfermedades, como enfermedades hepáticas severas (cáncer, cirrosis, hepatitis vírica) o falta de vitamina K. También pueden ser un trastorno hereditario.

Entre las patologías asociadas a trastornos en la coagulación se puede citar el tromboembolismo venoso como una de las más recurrentes y mortales (Stone et al., 2017). El término de trombosis hace referencia al proceso de formación o la presencia de un coágulo que afecta la circulación sanguínea, arterial o venosa. La causa de esta oclusión en muchas ocasiones puede ser claramente identificada, pero en otras permanece sin identificarse el origen.

En México existen entre 400 y 500 mil casos de trombosis por año, lo que la hace una de las primeras causas de mortalidad del país (Martínez-Murillo, 2000). Una trombosis venosa profunda, puede desprenderse y causar un problema serio en los pulmones, conocido como embolia pulmonar, un infarto agudo al miocardio o un derrame cerebral.

I.3 Enfermedades virales y coagulación

Durante el último siglo han emergido nuevos virus, incluyendo nuevas cepas del virus de la influenza A, síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV), y recientemente el SARS-CoV-2. Se conoce que los procesos de cambio y deriva antigénica permiten la formación de nuevas cepas con resistencia a los antivirales aprobados por la FDA (Meganck and Baric, 2021). De ahí el interés y la necesidad por el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antiviral.

Adicional a los síntomas particulares de cada virus, estudios científicos reportan que muchas infecciones virales comprometen la hemostasia y la coagulación, introduciendo complicaciones hemorrágicas o trombóticas (Mackman et al., 2020). Recientemente, una fuerte asociación entre la coagulación sanguínea y las enfermedades virales se ha documentado, afectando a millones de personas a nivel mundial. Un ejemplo de esto es la infección por SARS-CoV-2. Una de las complicaciones más preocupantes es la inusual formación de coágulos sanguíneos en muchos pacientes con COVID-19 (Bautista-Vargas et al., 2020). Estos coágulos pueden llegar a órganos como el pulmón, el corazón o el cerebro, y causar ataques cardíacos o accidentes cerebrovasculares, con consecuencias fatales.

En el caso del SARS-CoV-2, se han reportado tromboembolias pulmonares dentro de la arteria pulmonar principal, trombos en vasos pequeños y fibrina dentro de los vasos pulmonares así como focos de hemorragia (York et al., 2013)(Li et al., 2020). La mayoría de los casos que han conducido la muerte han presentado complicaciones coagulatorias

Existen otros virus coagulopáticos en humanos como varicela y sarampión; arbovirus como el virus del dengue; virus del ébola; y también virus de la influenza, hepatitis, VIH, citomegalovirus y coronavirus (Pryzdial et al., 2020).

Aunque la patología manifestada es específica de cada virus, el factor tisular (TF) parece ser el principal activador de la cascada de la coagulación durante la infección viral (Goeijenbier et al., 2012). El TF es un receptor transmembranal fundamental en el mecanismo de coagulación sanguínea. Este acelera la activación proteolítica del factor X (FX) en presencia de membranas

que contienen fosfolípidos aniónicos y calcio. También acelera la activación del factor IX(FIX) a FIXa, del factor FVIII a FVIIIa y la autoactivación de FVII (Kamikubo et al., 2017) (Figura 1). La activación excesiva de estos factores causa una amplificación de la formación de coágulos.

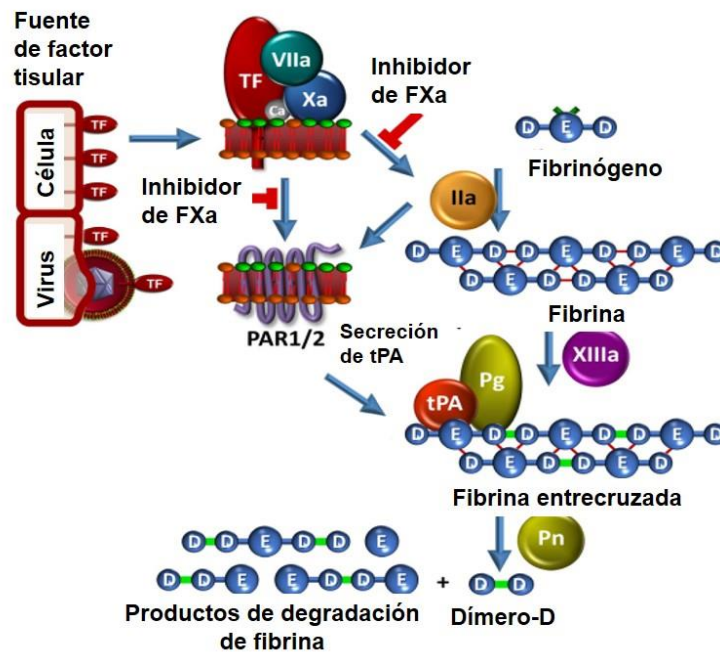


Figura 1 Factor tisular en la producción de dímero D viral mediada por la trombina (factor IIa [FIIa]). Tomado de: (Pryzdial et al., 2020)

I.4 Virus de la influenza y coagulación

La influenza es un problema de salud a nivel mundial. Sus síntomas incluyen fiebre, tos (generalmente seca), dolor de cabeza, dolor muscular y articular, malestar severo (sensación de malestar), dolor de garganta y secreción nasal. Anualmente se detectan alrededor de un billón de casos, de los cuales 3 a 5 millones son severos y se producen entre 290,000 y 650,000 muertes por problemas respiratorios asociados a esta enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2019).

En México durante la temporada estacional (semana 40 del 2019 a la 20 del 2020), se estimaron 236,150 casos de influenza y 330 defunciones a nivel nacional acumulados al corte del mes de abril del 2020. El subtipo viral predominante es A (H1N1) en un 48% de todos los casos (Secretaría de Salud, 2020).

La trombosis es una complicación clínica común de la influenza grave. Los pacientes con una infección grave por virus de influenza A (VIA) a menudo muestran alteraciones típicas de la coagulación, que incluyen hemorragias y trombosis de vasos sanguíneos pequeños y capilares pulmonares (Yang and Tang, 2016). Las anomalías de la coagulación (coagulopatía) se caracterizan por un tiempo prolongado de tromboplastina parcial activada, tiempo de protrombina y tiempo de trombina, y disminución del recuento de plaquetas en sangre en pacientes infectados (Palta et al., 2014)

La sobreactivación de la coagulación por influenza exagera el riesgo de enfermedades pulmonares y cardíacas (Antoniak and Mackman, 2014). Las infecciones por VIA también causan un aumento transitorio del riesgo de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar (Smeeth et al., 2006), síndromes coronarios agudos (Corrales-Medina et al., 2010), cardíacos agudos (Ludwig et al., 2015), infarto agudo de miocardio (Barnes et al., 2015) y otras enfermedades cardiovasculares (Clar et al., 2015). La trombosis en una arteria coronaria ya enferma puede causar un nivel subcrítico de estenosis, atribuible al desarrollo de síndromes coronarios agudos. El uso de oseltamivir (Tamiflu) ha demostrado que una reducción de la carga viral se asocia con una disminución de la incidencia de trastornos cardíacos (Dobson et al., 2015).

I.5 Fármacos antivirales y anticoagulantes

La estrategia más efectiva para combatir enfermedades virales es la vacunación. Sin embargo, a pesar de la existencia de vacunas contra el VIA, su efectividad es muy baja, dada la variabilidad antigénica del mismo (Dou et al., 2018). Por otra parte, los fármacos antivirales constituyen otra vía para el control de esta enfermedad.

Existen tres clases de agentes antivirales aprobados y disponibles para el tratamiento de la influenza: los bloqueadores del canal iónico de la proteína M2, los inhibidores de neuraminidasa y los inhibidores de polimerasas. Actualmente los inhibidores de neuraminidasa son los más utilizados. Estos inhibidores son análogos competitivos de ácido siálico, o sea, que interfieren en la actividad enzimática sialidasa de la proteína viral, que es fundamental para la liberación de la progenie de nuevos viriones en la célula infectada. En la actualidad existen cuatro inhibidores de NA aprobados para el tratamiento de infecciones por influenza A y B: oseltamivir, zanamivir, peramivir y laninamivir (Lehnert et al., 2016).

Oseltamivir es el más ampliamente utilizado de los tres; mientras que el zanamivir, administrado por inhalación, no se recomienda para niños pequeños con problemas respiratorios; el peramivir, por vía intravenosa, está priorizado para pacientes hospitalizados que no pueden recibir el

tratamiento de forma oral; y el laninamivir de dosis única, también es administrado por inhalación, para el tratamiento de niños y adultos (Pizzorno et al., 2019).

Sin embargo, el virus ha desarrollado resistencia ante estos antivirales de NA. Una de las mutaciones responsables de la resistencia mostrada por la cepa H1N1 frente a oseltamivir y peramivir, es la sustitución H275Y. Otras de las mutaciones reportadas son R292K y E119V en la cepa H3N2, que confieren baja sensibilidad al zanamivir y laninamivir. Incluso cuando la prevalencia de la resistencia en las cepas circulantes es muy baja (menor del 1 %), se ha observado en condiciones apropiadas cómo la resistencia podría diseminarse rápidamente para alcanzar una prevalencia del 90-100% (Samson et al., 2013).

Un fármaco anticoagulante es una sustancia exógena que interfiere o inhibe la coagulación de la sangre, creando un estado antitrombótico o prohemorrágico (Alquwaizani et al., 2013). Existen 4 tipos de anticoagulantes: heparinas, inhibidores directos del factor Xa (rivaroxabán, apixabán y edoxabán), inhibidores de la vitamina K (cumarinas) e inhibidores directos de trombina (dabigatrán).

Las cumarinas warfarina (Figura 2A) y acenocumarol se usaron sin competencia por más de medio siglo, tienen buena absorción y bajo costo. Son fármacos que actúan en el hepatocito inhibiendo la activación de la vitamina K e impidiendo las carboxilaciones necesarias para activar los factores vitamina K dependientes (II, VII, IX, X) y las proteínas C y S, ambas inhibidoras de la coagulación. En sobredosis, su efecto puede revertirse utilizando principalmente concentrados liofilizados de complejos protrombóticos. Sus principales desventajas son las múltiples interacciones con fármacos y alimentos que modifican su metabolismo generando variabilidad en un mismo paciente e inestabilidad dosis-respuesta (Alquwaizani et al., 2013).

La heparina no fraccionada (HNF) y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) son los anticoagulantes de elección en la trombosis aguda debido a su rápido inicio de actividad antitrombótica. Las heparinas (Figura 2B) no tienen actividad fibrinolítica y no lisan los trombos existentes, sino que contienen una secuencia activa de pentasacáridos que se une a antitrombina libre. Esta unión produce un cambio conformacional, acelerando la unión de AT y la inactivación de los factores de coagulación XIIa, IXa, XIa, Xa y trombina. Esto da como resultado la neutralización del factor Xa, que finalmente inhibe la formación de trombina y el desarrollo de trombos (Alquwaizani et al., 2013).

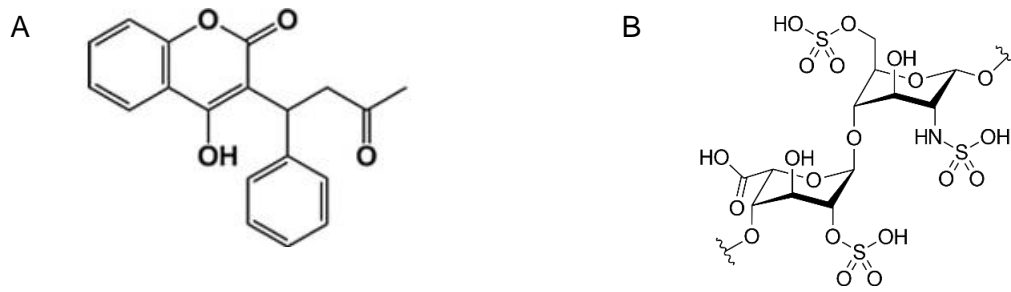


Figura 2 Anticoagulantes clásicos más utilizados. A) Warfarina B) Heparina.
Tomado de : (Alquwaizani et al., 2013)

Estos anticoagulantes clásicos tienen como desventajas la alta variabilidad de su efecto en cada sujeto y entre individuos, la influencia del nivel de ingesta de vitamina K, la necesidad de control periódico del nivel de anticoagulación y su interacción con múltiples drogas. Por estas limitaciones, se han creado nuevos anticoagulantes orales (NACOs), siendo progresivamente aprobados para uso clínico por agencias internacionales. Genéricamente, son de 2 tipos: inhibidores selectivos de trombina (dabigatrán) o de FXa (rivaroxabán, apixabán, edoxabán y betrixabán). Los NACOs se caracterizan por su dosificación una o dos veces al día, rapidez de acción, vida media corta en la circulación, predictibilidad de su efecto, dosis preestablecidas, sin necesidad de control periódico y con escasa o nula interacción con otras drogas. Estas ventajas no se han traducido en la mayoría de los ensayos en un superior efecto antitrombótico o menor riesgo de sangrado, y en su mayoría (salvo dabigatrán) carecen de antídoto específico demostrado (Berkovits and Mezzano, 2017).

Además de su actividad anticoagulante, estos inhibidores de FXa : rivaroxaban (Mueck et al., 2008), apixaban (Byon et al., 2019), edoxaban (Bounameaux and Camm, 2014) (Figura 3) han mostrado efecto protector indirecto ante la entrada de diferentes virus a la célula hospedera (Visseren et al., 2000)(Kanade et al., 2018).

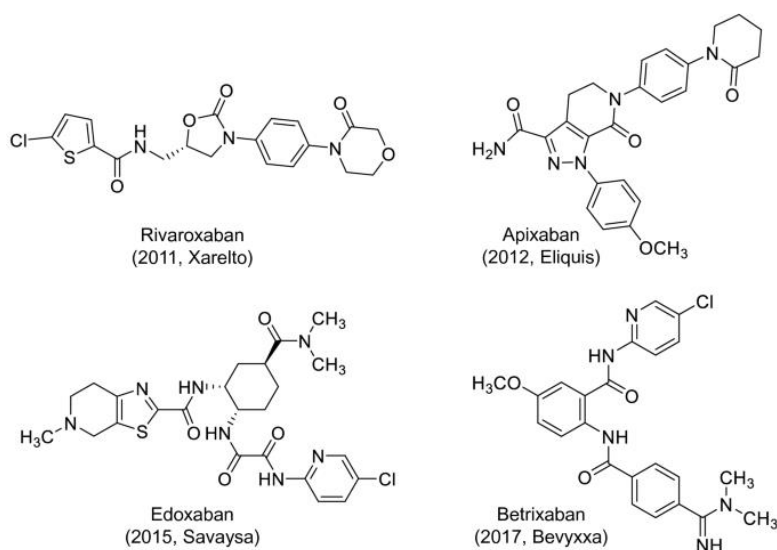


Figura 3 Fármacos aprobados que inhiben el factor FXa y poseen actividad antiviral indirecta

Aunque no hay una evidencia de que este tipo de fármacos inhiba directamente una etapa del ciclo viral, sí disminuyen la letalidad y mortalidad al contrarrestar los desórdenes coagulatorios provocados por virus. Como ejemplo puede citarse el empleo de heparina, un fármaco inhibidor de trombina, en pacientes con SARS-CoV-2, para reducir la letalidad en aquellos pacientes que muestren marcadores de estados procoagulatorios (Gozzo et al., 2020).

I.6 Las plantas como fuente de fármacos

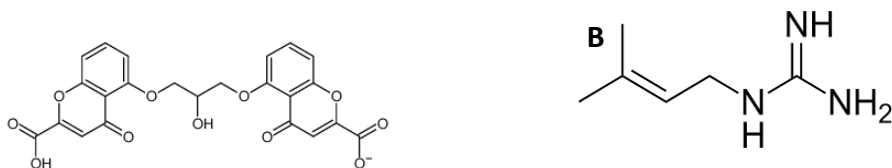
Los remedios basados en plantas continúan desempeñando un papel esencial en la atención médica, y su uso por diferentes culturas ha sido ampliamente documentado (Palma-Tenango et al., 2017). La Medicina Tradicional y Complementaria (T&CM) forma parte del programa General de Trabajo de la OMS, el cual afirma que la T&CM puede hacer una contribución significativa a la cobertura universal de salud. A nivel mundial, el panorama de T&CM ha mejorado constantemente. En 2018, se reportó que 107 Estados Miembros de la OMS tenían una oficina nacional de MT y 75 Estados Miembros tenían un instituto nacional de investigación sobre productos naturales. Un total de 34 Estados Miembros de las seis regiones de la OMS incluyeron medicamentos a base de plantas en sus listas nacionales de medicamentos esenciales (NEML), y en muchos Estados Miembros, como Ghana, existía una lista separada de medicamentos herbarios esenciales (World Health Organization, 2019).

Las plantas producen un amplio rango de metabolitos secundarios a partir de cuatro rutas biosintéticas principales. Muchos de estos metabolitos han demostrado ser biológicamente

activos y han servido como plantilla para el desarrollo de fármacos. Como ejemplos relevantes se pueden citar el desarrollo de la cromolina (Figura 4A) de *Ammi visnaga* (en forma de cromoglicato de sodio) como broncodilatador; la galegina (Figura 4B), de *Galega officinalis*, que fue el modelo para la síntesis de metformina y otros fármacos antidiabéticos; y la papaverina de *Papaver somniferum* que formó la base del verapamilo utilizado en el tratamiento de la hipertensión (Fabricant and Farnsworth, 2001). Esta última planta es más conocida por ser la fuente de analgésicos como la morfina y la codeína (Dittbrenner, 2012). Probablemente el mejor ejemplo del papel de la etnomedicina como guía en el descubrimiento y el desarrollo de fármacos es el descubrimiento de los antimaláricos quinina (Figura 4C) y artemisinina (Virk et al., 2016) (Figura 4D).

También las plantas tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer (Amaral, 2019). De los medicamentos contra el cáncer de origen vegetal de uso clínico, algunos de los más conocidos son los llamados alcaloides de la vinca, vinblastina y vincristina (Figura 4E) aislados de *Catharanthus roseus* (Almagro et al., 2015), junto con los dos clínicamente activos agentes, etopósido y tenipósido (Gordaliza et al., 2000). También el Paclitaxel (Taxol®) (Figura 4F) que es el anticancerígeno derivado de plantas más interesante descubierto en los últimos años en las hojas de varias especies del género *Taxus* (Abu Samaan et al., 2019).

Durante los últimos 60 años, también se han identificado un gran número de plantas y compuestos derivados con actividad antiviral (Zakaryan et al., 2017). Las investigaciones sobre agentes antivirales aislados a partir de plantas comenzaron en la década de 1950, con la evaluación de la actividad de 288 plantas contra la influenza A en embriones de pollo (Chantrill et al., 1952). Se destacan como metabolitos antivirales la apigenina, quercetina y el ácido glicirrízico (Figura 5).



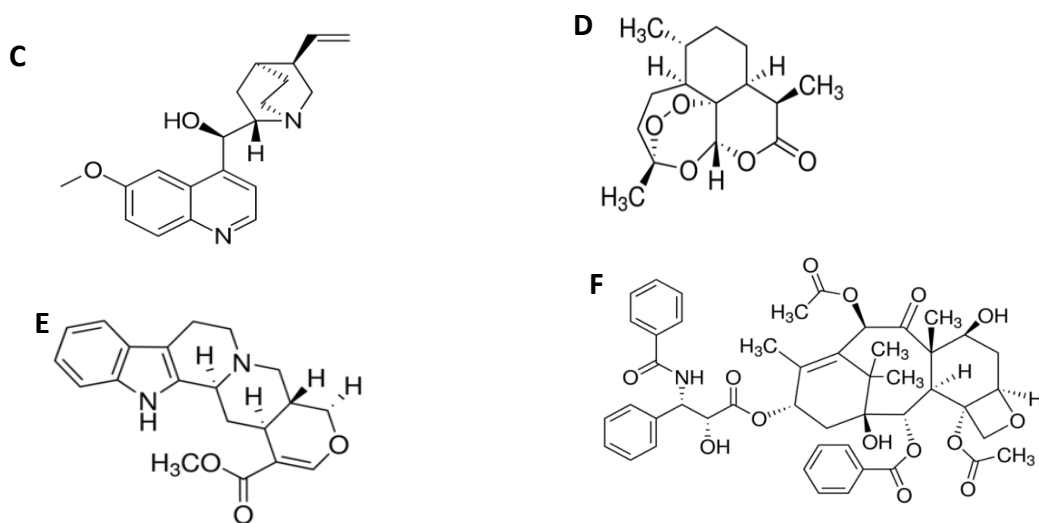


Figura 4 Moléculas aisladas de plantas que han sido utilizadas como modelos estructurales para el desarrollo de fármacos comerciales. A) Cromolina B) Galegina C) Quinina D) Artemisina E) Vincristina, F) Paclitaxel.

La apigenina, abundante en la familia *Asteraceae*, inhibe los virus del herpes simple (HSV-1) (Mucsi et al., 1992), hepatitis C (HCV) (Visintini Jaime et al., 2013) y hepatitis B (HBV) *in vitro* (Chiang et al., 2005). La quercetina tiene un efecto protector en ratones infectados con mengovirus (Veckenstedt et al., 1987), así como un efecto inhibitorio dependiente de la dosis en el caso de HSV-1 (Lee et al., 2017) y el virus sincitial (RSV) (Lopes et al., 2020). El ácido glicirrízico es un triterpreno glicosilado que se extrae de la planta *Glycyrrhiza glabra*. Es una molécula con un gran potencial como antiviral ya que se ha demostrado su capacidad inhibitoria contra muchos tipos de virus como HSV-1, influenza, citomegalovirus, HBV y hepatitis C (HCV). También se ha sugerido como una terapia de largo plazo a pacientes infectados con VIH (Ming and Yin, 2013).

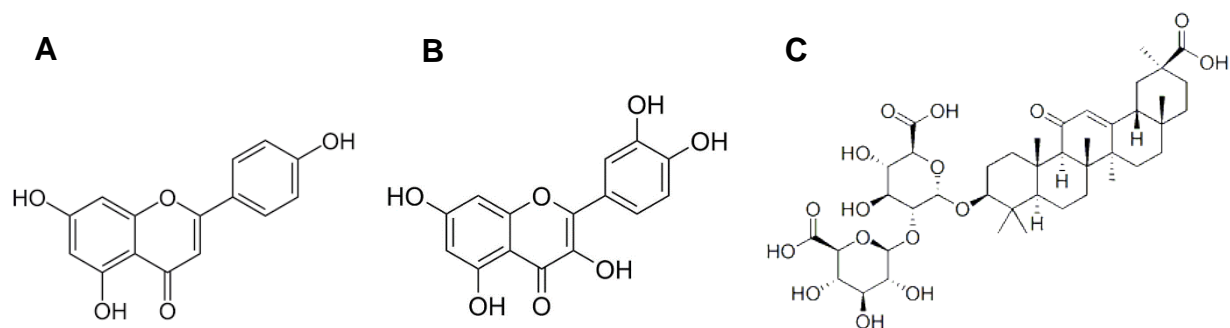


Figura 5 Moléculas aisladas de plantas con actividad antiviral A) Apigenina B) Quercetina C) Ácido glicirrízico

Recientemente se han reportado conjugados de ácido glicirrízico y L-aminoácidos con índices de selectividad en el rango de 38-71 en ensayos *in vitro* contra el virus de la influenza A (Baltina et al., 2015).

I.7 Plantas del Género *Caesalpinnia*

Caesalpinnia L. es un género de plantas que pertenece a la subfamilia *Caesalpinioideae* de la familia *Caesalpinniaceae* y consta de más de 225 especies. En su mayoría son árboles leñosos que se encuentran en zonas tropicales y subtropicales (Gagnon et al., 2019).

Desde 1967, se han investigado intensivamente 15 especies de *Caesalpinnia*, debido a sus bioactividades o usos en la medicina tradicional. Se ha reportado la presencia de varios tipos de metabolitos secundarios en estas plantas, como flavonoides, triterpenos, esteroides, lignanos, fenilpropanoides y alcaloides (Zanin et al., 2012) (Tabla 1).

A partir de las hojas y partes aéreas de plantas del género *Caesalpinnia* se han aislado principalmente flavonoides, flavanonas, chalconas, así como ácido gálico y terpenos. Como ejemplos recientes se pueden citar el estudio realizado por Ogunlana y col., donde aislaron 7 flavonoides del extracto etanólico de las hojas de *Caesalpinnia bonduc* y demostraron actividad citotóxica significativa contra células HeLa (Ogunlana et al., 2015). También el aislamiento de dos nuevos homoisoflavanos, una nueva coumarina, y 7 compuestos fenólicos conocidos a partir del extracto etanólico de hojas de *Caesalpinnia spinosa* (He et al., 2016).

Tabla 1 Partes más estudiadas de las plantas del género *Caesalpinnia*

Especie	Parte
<i>C. minax</i>	Semillas
	Ramas y hojas
	Fruto
<i>C. sappan</i>	Semillas
<i>C. bonduc</i>	Planta entera
	Semillas
	Pericarpo
	Raíces
	Corteza de la raíz
	Corteza del tallo
<i>C. decapetala</i>	Semillas
	Raíces
	Cotiledones
	Hojas
<i>C. pulcherrima</i>	Tallo
	Raíces
	Hojas
<i>C. mimosoides</i>	Frutas
	Raíces
<i>C. volkensii</i>	Corteza de raíz
	Corteza de tallo
<i>C. crista</i>	Semillas
	Hojas
	Tallo
	Raíces
<i>C. spinosa</i>	Ramas y Hojas
<i>C. platyloba</i>	Hojas
<i>C. magnifoliolata</i>	Semillas
<i>C. echinata</i>	Tallo

<i>C. benthamiaina</i>	Corteza de raíz
<i>C. bonducella</i>	Semillas
	Raíces
	Raíces
<i>C. major</i>	Raíces
	Semillas

Las raíces de las plantas pertenecientes al género *Caesalpinnia* son una fuente de diterpenos tipo casano. Este es el caso de las especies *Caesalpinnia bonduc*, *Caesalpinnia pulcherrima*, *Caesalpinnia Boducella* y *Caesalpinnia crista* (Jing et al., 2019). En 2016, Qiao y colaboradores reportaron 18 furanoditerpenos tipo casano aislados a partir de las raíces de *Caesalpinnia decapetala*, de los cuales 8 eran nuevos. Algunos de estos compuestos mostraron actividad inhibitoria contra líneas de cáncer pancreático humano (SW1990) con valores de CI_{50} entre 2.9 a 8.9 μM (Qiao et al., 2016).

Las semillas de las plantas del género *Caesalpinnia* han sido, junto con las raíces, las partes más estudiadas. Son la fuente más abundante de los diterpenos tipo casanos (DTC), de los cuales se han aislado más de 450 en este género. Además de ser estructuras químicamente interesantes debido a su gran variedad estructural, los diterpenos tipo casano presentan actividad biológica contra muchas enfermedades (Jing et al., 2019). La investigación fitoquímica de las semillas de *Caesalpinnia minax*, *Caesalpinnia sappan* y *Caesalpinnia crista* permitió obtener DTC con una citotoxicidad moderada contra líneas celulares cancerígenas como DU145, K562, HepG2, MCF-7, HCT-116, KB, HeLa y HCT-8 (Bao et al., 2016) (Ma et al., 2012) (Tran et al., 2015). Respecto a enfermedades inflamatorias, se ha llevado a cabo el aislamiento de algunos DTC bioactivos a través de un ensayo de inhibición de monóxido de nitrógeno (NO), el cual está directamente relacionado con cascadas de activación de la respuesta inflamatoria. Investigadores de Tailandia descubrieron que las tapeninas L y D de *Caesalpinnia mimosoides* tienen actividad inhibitoria del NO, con valores de CI_{50} de 7,1 μM y 8,2 μM , respectivamente, en comparación con el inhibidor de la NO sintasa L-nitroarginina ($CI_{50} = 61,8 \mu\text{M}$) (Song et al., 2016). De 44 DTC que se purificaron y obtuvieron de *Caesalpinnia crista*, 8 de ellos mostraron una fuerte actividad antipalúdica contra *P. falciparum* con valores de CI_{50} de 0.09-0.26 μM , superiores a la actividad biológica de la cloroquina ($CI_{50} = 0,29 \mu\text{M}$) (Kalauni et al., 2006).

También se han reportado DTC como inhibidores del virus de la influenza. Tal es el caso de la espirocaesalmina B, cesalpininas M1, M2, F1 y cesalminas E1-E3. Estas moléculas mostraron

efectos inhibitorios moderados sobre NA con valores de CI_{50} de 29,0 a 87,4 μM , en comparación con los valores de CI_{50} del zanamivir a 6,33 μM (Qin et al., 2018).

Aunque los DTC son los metabolitos más buscados en las semillas de *Caesalpinnia*, también se han reportado modestos esfuerzos en caracterizar metabolitos más polares. Sánchez-Carranz y colaboradores aislaron los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Caesalpinnia coriaria* (ácido gálico, estigmasterol, etil galato) y evaluaron su actividad anticancerígena (Sánchez-Carranza et al., 2017).

A pesar de ser una parte de la planta con gran disponibilidad, las flores de *Caesalpinnia* no se han estudiado extensivamente. Solamente se reportan estudios en las flores de *Caesalpinnia pulcherrima*, cuyos extractos etanólico y acuoso muestran actividades antivirales, antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas, antiinflamatorias y antihelmínticas (Chiang, 2003; Moteriya and Chanda, 2017). El único estudio fitoquímico conocido se realizó a partir de las flores de *Caesalpinnia giliesi* para aislar compuestos fenólicos y fitoesteroles. En este artículo se caracterizó un novedoso derivado de ácido octadecenoico y se demostró su efecto hepatoprotector en modelos de ratón intoxicados con CCl_4 (Osman et al., 2016).

También se han reportado algunas plantas del género *Caesalpinnia* que han mostrado actividad anticoagulante. Un ejemplo interesante son las semillas de *Caesalpinnia crista*, cuyo extracto acuoso presentó un efecto anticoagulante fuerte mediante el ensayo TP y TTPa (Srinivasa et al., 2019). Se observó actividad anticoagulante en la corteza de *Caesalpinnia Sappan* y de su metabolito principal brazilin (Kim and Park, 2019). Recientemente, se realizó un estudio de aislamiento de metabolitos en la corteza de *Caesalpinnia ferrea*, y se detectó que los polisacáridos que contenían arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido urónico poseen actividad inhibitoria de la vía intrínseca de la coagulación (de Araujo et al., 2021).

1.8 *Caesalpinnia yucatanensis* Greenm

Caesalpinnia yucatanensis es un árbol de hasta 10 m de altura, el tronco puede llegar a medir hasta 15 cm de diámetro. Se puede encontrar normalmente en la selva mediana subperennifolia, en la selva baja caducifolia y en la vegetación secundaria (bordes de camino y campos de cultivo). Comúnmente se ha utilizado como fuente melífera, maderable y para la construcción.

La época de floración se encuentra entre los meses de enero a marzo y de noviembre a diciembre, mientras que los frutos se observan entre los meses de enero a abril.

Esta especie es nativa de la Península de Yucatán, aunque también se encuentra distribuida en otras regiones de México como Chiapas y Tabasco, así como Belice, Guatemala y Honduras. Es conocido comúnmente como “sen de País” o “palo de gusano” y el nombre maya se registra como ttaa k’in che’ o k’aan pok’ool k’uum (Figura 6).

Caesalpinnia yucatanensis ha sido poco estudiado en cuanto a su composición química y sus posibles actividades biológicas. Estudios realizados en el laboratorio de Productos Naturales del CICY demostraron que las fracciones de hoja y tallo presentaron relevante actividad antiviral



Figura 6 Distribución de *Caesalpinnia yucatanensis* en la península de Yucatán

contra el virus de la influenza A-H1N1 (IS 65-369) y baja toxicidad (51-72 μ M).

I.9 Justificación

Cada día existe mayor evidencia de relación entre las enfermedades virales y la coagulación sanguínea. Si bien, diferentes virus manifiestan diversas enfermedades debido a la singularidad de las proteínas codificadas por su genoma, numerosos tipos de virus tienen en común la modulación del sistema de coagulación de la sangre con correlaciones con la patología hemostática. Los síntomas varían ampliamente según el tipo de virus y son impulsados por complicados mecanismos virus-huésped, que involucran proteínas (coagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas), plaquetas, células endoteliales, leucocitos y proteínas del complemento.

Existen pocos fármacos que pueden emplearse para el tratamiento de ambas patologías, por lo que la búsqueda de nuevos prototipos de fármacos, ya sea con una o varias propiedades farmacológicas es una necesidad apremiante. El género *Caesalpinia* ha mostrado ser una fuente rica en moléculas con diversas actividades biológicas, como antiviral y anticoagulante. *Caesalpinia yucatanensis* es una especie ampliamente distribuida en la Península de Yucatán, de fácil propagación y que ha demostrado ser una fuente de compuestos antivirales presentes en sus hojas y corteza, sin embargo, aún no se explora en su totalidad el potencial farmacéutico de semillas e inflorescencias como fuente de metabolitos antivirales y anticoagulantes.

CAPITULO II

OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

Evaluar la actividad anticoagulante y anti-sialidasa de semillas e inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*.

II.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar la actividad anticoagulante de semillas e inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*.
- 2) Evaluar la actividad anti-sialidasa presente en semillas e inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*.
- 3) Caracterizar de manera preliminar la(s) fracción(es) con actividad anticoagulante y/o anti-sialidasa.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 7, se describe la metodología empleada en este trabajo de investigación. Se inició con la extracción masiva de los compuestos presentes en las inflorescencias y semillas de *Caesalpinnia yucatanensis*. Posteriormente se realizó la evaluación de la actividad anti-neuraminidasa y anticoagulante de las fracciones obtenidas. La fracción con actividad dual anticoagulante y anti-sialidasa fue fraccionada mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las fracciones más activas se caracterizaron por métodos colorimétricos, espectroscópicos y cromatográficos.

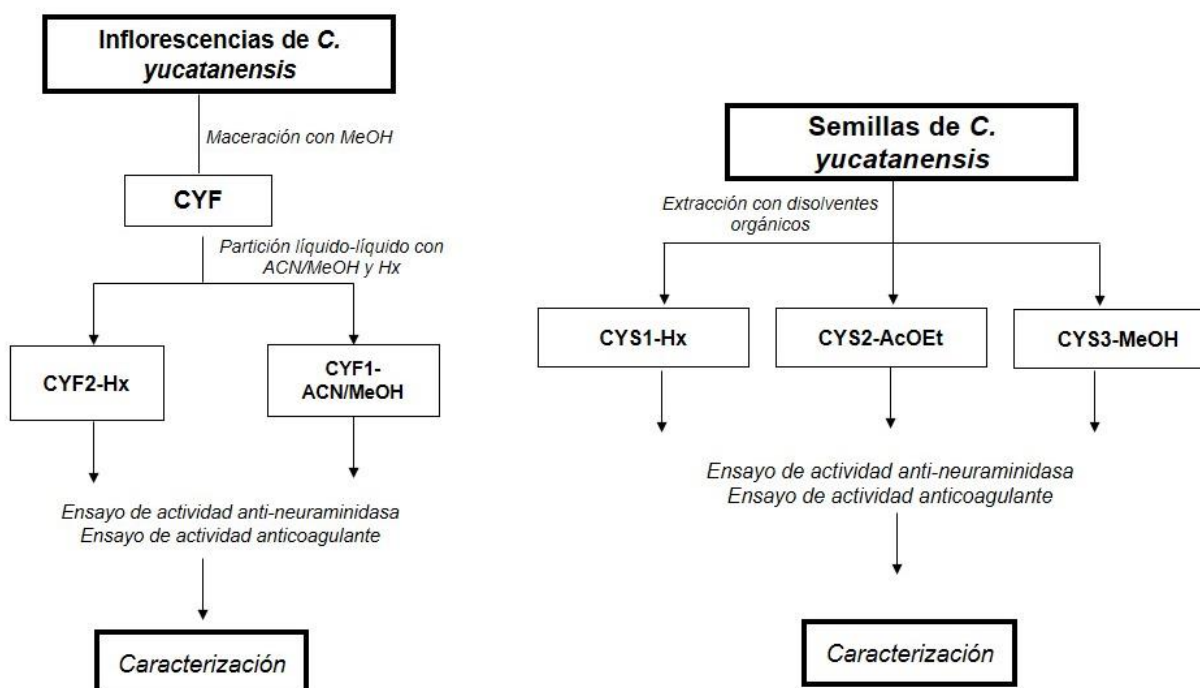


Figura 7 Esquema de la estrategia experimental para el aislamiento de metabolitos de *Caesalpinnia yucatanensis* y la evaluación de su actividad biológica

III.1 Reactivos

Para la extracción del material vegetal se utilizaron disolventes de grado industrial destilados en el laboratorio; para el revelado de las placas cromatográficas se utilizó ácido fosfomolíbldico en ácido sulfúrico al 5%.

III.2 Material y equipo

Para el análisis del material vegetal se emplearon cromatofolios de gel de sílice y soporte de aluminio. Para la visualización de los componentes se empleó una cámara de UV, 245-365 m, (Chromato-Vue® C-75). Para el fraccionamiento de los extractos se utilizó una columna de cromatografía líquida al vacío, así como sílica gel (malla 60-200). Para el secado de los extractos y fracciones se empleó un rotavapor Buchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y una bomba de vacío PVK 700.

III.3 Material vegetal

La planta *Caesalpinnia yucatanensis* se recolectó en enero del 2020 en el municipio Dzityá. Un ejemplar de la planta fue depositado en el herbario del CICY. Las vainas que contenían las semillas fueron secadas con luz natural a temperatura ambiente. Posteriormente se extrajeron las semillas, se limpiaron, pesaron y trituraron en una licuadora. Las flores fueron secadas con luz natural por un período de 2 semanas a temperatura ambiente. Este material se limpió, pesó y almacenó.

III.4 Extracción y fraccionamiento de las semillas de *Caesalpinnia yucatanensis*

Las semillas secas (115 g) se extrajeron a temperatura ambiente durante 24 horas con *n*-hexano (Hx), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH), sucesivamente. A cada extracción se le aplicó sonicación 3 veces durante 30 minutos, para maximizar la extracción de metabolitos. Los extractos obtenidos se separaron por decantación y se concentraron a presión reducida con un rotavapor a 40 °C. Las fracciones se analizaron por CCD. Para la fracción apolar y de polaridad intermedia se utilizó como fase móvil Hx/AcOEt (9:1) y para la fracción polar se empleó como fase móvil AcOEt/MeOH (6:4).

III.5 Extracción y fraccionamiento de las inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*

Las flores (560 g) secas se extrajeron a temperatura ambiente con MeOH durante 24 horas. Se aplicó sonicación 3 veces durante 30 minutos para maximizar la extracción de metabolitos. Posteriormente se decantó el disolvente y se concentró a presión reducida con un rotavapor a 40 °C. El extracto metanólico se particionó con MeOH/ACN/Hx 6:2:1 para obtener una fracción polar (ACN/MeOH) y una apolar (Hx). Las fracciones se analizaron por CCD. Para la fracción apolar se utilizó como fase móvil Hx/AcOEt (9:1) y para la fracción polar se empleó como fase móvil AcOEt/MeOH 6:4.

Los cromatofolios para CCD se visualizaron bajo UV a 254 nm y a 360 nm; y se revelaron utilizando una solución al 4 % de ácido fosfomolibdico con trazas de sulfato cérico en H₂SO₄ al 5 %.

III.6 Metodología para evaluar la actividad anti-neuraminidasa

La actividad inhibidora de neuraminidasa de las fracciones y extractos de *C. yucatanensis* se determinó mediante un ensayo enzimático basado en la emisión de fluorescencia de un sustrato en presencia de la enzima neuraminidasa (Figura 8). Se utilizó como tampón una solución de acetato de sodio a 50 mM, ajustada a pH 5,0 con HCl. Se preparó el sustrato ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico (MUNANA), en forma de sal de sodio hidratada, a una concentración de 1,25 mM, en la solución de acetato de sodio. Se preparó la enzima, neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, a una concentración de 0,2 U/ml en tampón de acetato de sodio.

Estandarización del método

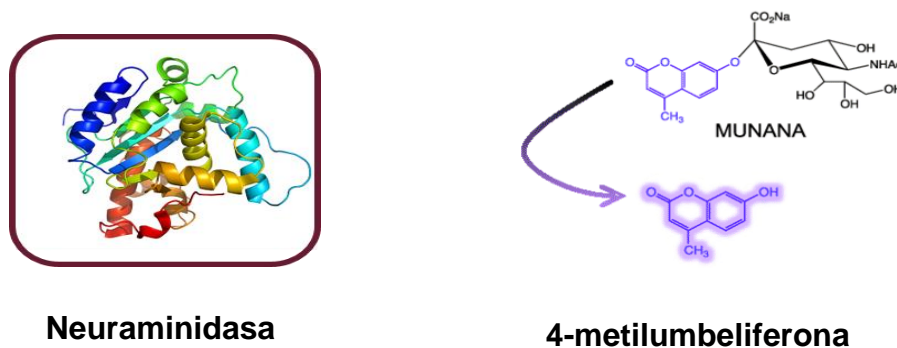


Figura 8 Ensayo enzimático fluorescente utilizando la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*

Se estudió el comportamiento de la fluorescencia en el tiempo utilizando concentraciones variables de enzima (0.1 y 0.2 UI/ml) y MUNANA (0.5mM, 0.25mM). Se tuvo en cuenta el rango lineal de fluorescencia y la pendiente de la recta que describe su comportamiento, siendo los valores de 0.2 UI/ml y 0.5 mM de MUNANA los más adecuados para garantizar la reproducibilidad y repetibilidad del ensayo.

Compuestos de referencia

Para validar las condiciones del ensayo, se seleccionó la quercetina como control positivo de inhibición. La quercetina tiene un valor de CI₅₀ (concentración del compuesto para inhibir el 50% de la actividad enzimática) cercano a 21 μ M.

Evaluación de fracciones de inflorescencias y semillas de *C. yucatanensis*

Las soluciones madre de los compuestos evaluados se prepararon disolviéndolas en MeOH, y posteriormente en la solución buffer hasta obtener concentraciones entre 0.2-0.012 mg/mL. El ensayo enzimático se realizó como se indica: se añadieron 110 μ L de tampón de acetato de sodio, 10 μ L de enzima, 10 μ L del compuesto a evaluar y, por último, 20 μ L de sustrato en una placa inmunológica de 96 pocillos. Como resultado de la reacción enzimática, se libera la especie fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU). La fluorescencia que emite este compuesto se midió con el lector de microplacas Cytation3 (BioTek). Las longitudes de onda de emisión y excitación fueron 450 nm y 365 nm, respectivamente. La quercetina (Sigma-Aldrich) se utilizó como control positivo. También se utilizó un control negativo, sin compuesto. A los valores de fluorescencia del ensayo se les sustrajo la fluorescencia de fondo, producida por los compuestos en estudio.

Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se empleó el programa OriginPro8 para trazar los gráficos. El cálculo del CI_{50} se realizó utilizando un ajuste no lineal con el programa GraphPad.

III.7 Metodología para evaluar la actividad anticoagulante

El ensayo de tiempo de protrombina permite evaluar si los compuestos tienen actividad anticoagulante vía extrínseca. El ensayo se realiza incubando la muestra con el plasma reconstituido y agregando reactivo de protrombina. Posteriormente se mide el tiempo que tarda en formarse un coágulo utilizando un coagulómetro BIOBAS 10 (SpinReact, S.A, Girona, España) (Kishore, 2013). El coagulómetro opera de acuerdo al principio de medición opto-mecánico. El rayo de luz atraviesa la cubeta conteniendo el plasma, el cual es detectado por un fotodetector. El cambio que se produce en la intensidad de la luz transmitida, ya sea incremento o descenso de la luz, es convertido en una señal eléctrica. De este modo, aun el coágulo más inestable puede ser detectado. El lapso de tiempo desde la adición del reactivo inicial hasta la formación del coágulo es medido por el instrumento. El mismo puede ser convertido en la unidad apropiada (% , INR, mg/dl, g/l).

Los parámetros estándares para este ensayo y que se consideran tiempos de coagulación normales, se encuentran entre los 12-14 segundos. Sin embargo, siempre se utiliza un control positivo y negativo para asegurar la veracidad de los resultados (Capoor et al., 2015).

Para realizar el ensayo se reconstituyen el plasma liofilizado (SpinReact, S.A.) y el reactivo de protrombina en agua destilada. Para ello se le agregan 1 mL y 2 mL respectivamente y se mezclan suavemente hasta disolver su contenido evitando la formación de espuma.

Las muestras a evaluar se disuelven en DMSO al 10% para alcanzar una concentración de 5 mg/mL. Solo se pueden analizar aquellas con una mediana o alta polaridad, debido a la naturaleza del ensayo, el cual requiere el empleo de disoluciones polares. En el caso de las semillas de *Caesalpinia yucatanensis*, solamente la fracción CYS3 fue soluble en DMSO al 10%, y en el caso de las inflorescencias solo fue posible evaluar la fracción CYF1.

Para dar inicio al test de tiempo de protrombina, se incubaron 50 μ L de muestra con 50 μ L de plasma en la cubeta del coagulómetro. Posteriormente se agregaron 100 μ L de reactivo de protrombina. Se anotó el tiempo al que el equipo detectó la formación del coágulo. Se realizó el mismo procedimiento por triplicado para cada una de las muestras.

También se evaluó un control negativo constituido por 50 μ L de plasma, 100 μ L de reactivo de protrombina y 50 μ L de la disolución de DMSO al 10%, y como control positivo se utilizó heparina a 1 UI/mL (0.2 mg/mL).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente con el software OriginPro. Los datos representan la media y la desviación estándar de la media. Los datos se consideraron como significativos para $p < 0.05$ utilizando el método ANOVA (test de Fischer).

III.8 Purificación de la fracción con actividad anticoagulante y anti-neuraminidasa

La fracción CYF1 (550 mg) fue purificada por cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex LH20 como fase estacionaria y MeOH al 100 % como eluyente, en una columna de

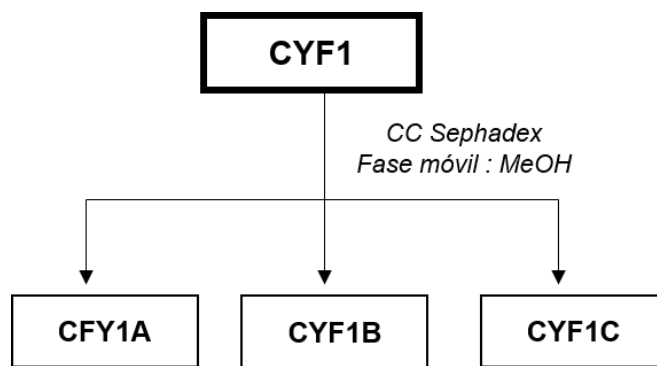


Figura 9 Diagrama de obtención de las fracciones CYF1A, CYF1B y CYF1C

2.5 cm de diámetro y 55 cm de altura. Se eluyeron 50 fracciones de 10 mL, las cuales se reunieron de acuerdo a sus perfiles cromatográficos en 3 fracciones (CYF1A, CYF1B y CYF1C).

III.9 Caracterización preliminar

Para realizar los ensayos colorimétricos, se pesaron 5 mg de la fracción CYF1 y se disolvieron en 5 mL de MeOH. Esta disolución se dividió en alícuotas de 1 mL.

III.9.1 Detección de la presencia de flavonoides

La prueba de flavonoides se realizó por la reacción de Shinoda (Saptarini et al., 2016). Se resuspendió la muestra con MeOH en un tubo de ensayo de 15 x 1.85 cm. Posteriormente se agregaron unas virutas de magnesio y 1 ml de HCl concentrado. Como control positivo se utilizó 1 mg de flavona aislada de flores de *Lonchocarpus longistylus* (Borges-Argáez et al., 2017).

En el ensayo de Shinoda, el esqueleto de los flavonoides se transforma en un esqueleto de antocianidina, mediante la reducción del grupo carbonilo. La conjugación en el esqueleto antocianidina provoca que la muestra cambie de coloración hacia naranja o rojo (Figura 10).

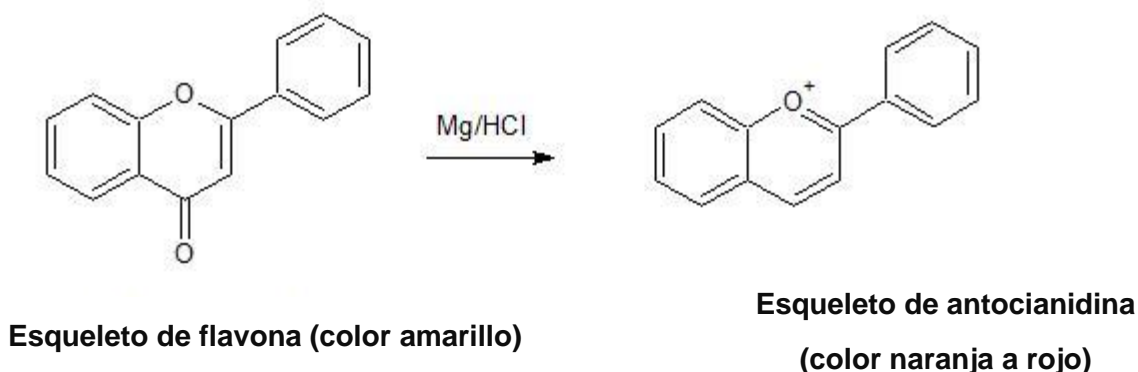


Figura 10 Reacción propuesta para la identificación de flavonoides mediante el ensayo de Shinoda

III.9.2 Detección de la presencia de saponinas

Para la identificación de saponinas se realizó la prueba de Salkowski. A 1 mL de disolución de CYF1 se le agregaron 22 mL de CHCl_3 y 2 mL de H_2SO_4 . Una coloración anaranjada indica una reacción positiva. La prueba de Salkowski se basa en una reacción de deshidratación con H_2SO_4 de las saponinas formando nuevos dobles enlaces. De esta manera se obtienen complejos biesteroidales con una elevada conjugación. Como control positivo se utilizó una fracción enriquecida de saponinas del fruto de *Enterolobium cyclocarpum* (Borges-Argáez et al., 2017).

III.9.3 Detección de la presencia de triterpenos

Se preparó una solución de anhídrido acético: $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{CHCl}_3$ (10:1:25) (Hossain et al., 2013). Se agregó 2 mL de la solución a 1 mL de disolución de CYF1 y se dejó reposar durante 2 minutos. Un cambio de coloración rojo, rosa, púrpura o azul se considera una prueba positiva. La reacción ocurre entre los reactivos utilizados y grupos hidroxilos conjugados a anillos aromáticos en el esqueleto de los triterpenoides. De esta manera aumenta la conjugación y la coloración se intensifica. Como control positivo se utilizó baicaleína.

III.9.4 Detección de la presencia de carbohidratos

Para la prueba de carbohidratos se utilizó el método fenol-ácido sulfúrico (Nielsen, 2010). A 1 mL de disolución de CYF1 se le añadió 1 mL de fenol y 5 mL de ácido sulfúrico. Una coloración amarillo dorado indica la presencia de carbohidratos. La reacción propuesta para este método implica la deshidratación de los carbohidratos a derivados de furfural (Figura 11). Estos derivados

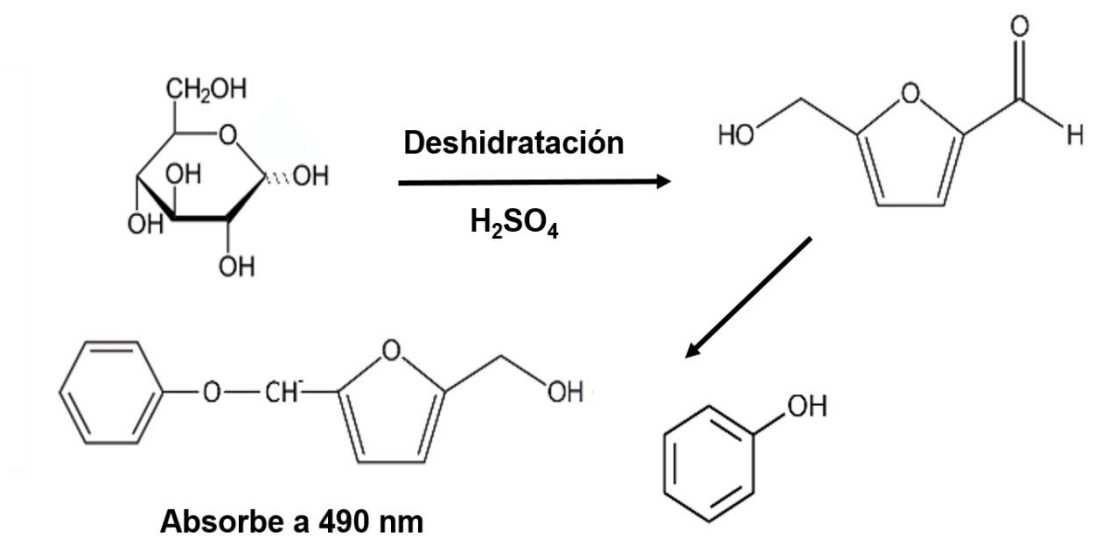


Figura 11 Mecanismo del ensayo fenol-sulfúrico para la identificación de carbohidratos

reaccionan con el fenol para formar compuestos con grupos cromóforos. Como control positivo se utilizó glucosa.

III.9.5 Análisis por HPLC de la fracción CYF1

Para el análisis de la composición de la fracción CYF1 se empleó la técnica cromatográfica de HPLC. Los cromatogramas se obtuvieron empleando un HPLC Flexar (Perkin Elmer, 2012). El cromatógrafo está equipado con un detector de onda variable, con lámpara de deuterio. El eluyente A empleado fue metanol, y el B, agua desionizada. La separación cromatográfica se llevó a cabo en la columna analítica ODS Hypersil, 250 × 4.6 mm, 5 μm (USA), de fase reversa.

Los parámetros establecidos durante el análisis fueron: velocidad de flujo 0.7 mL/min, volumen de inyección 20 μL, longitud de onda 275 nm, temperatura del horno 40 °C. Todos los disolventes empleados en el análisis fueron de grado HPLC. La muestra analizada se filtró utilizando filtro para jeringa de membrana de nylon, de 0.45 μm de tamaño de poro. La muestra analizada se preparó a 0,2 mg/mL en MeOH. El método de separación consistió en un flujo isocrático de 100% de A durante 15 minutos y posteriormente se realizó un lavado por 15 min hasta llegar a 60 % de B.

III.10 Caracterización espectroscópica

A pesar de no contar con una muestra pura, se procedió a realizar análisis de espectroscopía IR y Resonancia Magnética Nuclear para corroborar la información obtenida en los ensayos colorimétricos.

III.10.1 Espectroscopía FTIR-ATR

Las fracciones de interés se analizaron mediante Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), el equipo empleado fue un espectroscopio marca BRUKER modelo Tensor II con un detector ATR de punta de diamante, los datos se colectaron usando un intervalo de medición de 400-4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹ y 16 barridos en el intervalo de longitud de onda antes especificado. Para el tratamiento de datos: se realizó una compensación por CO₂ atmosférico para cada espectro y también se realizó una corrección del ángulo del ATR de diamante empleado (estas correcciones las realiza el equipo).

III.10.2 Espectroscopía RMN

Para el análisis por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) este se utilizó un equipo marca VARIAN/AGILENT modelo Premium-COMPACT de 600 MHz con un campo magnético de

14.1 T, que tiene la capacidad para realizar estudios de RMN multinuclear. Como disolvente se empleó cloroformo deuterado (CDCl_3). Se obtuvo el espectro protónico de la muestra CYF1B.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV.1 Extracción y fraccionamiento de las semillas de *Caesalpinnia yucatanensis*

Las semillas de las plantas del género *Caesalpinnia* han sido la parte vegetal más estudiada debido a su alto contenido de DTC. Prácticamente todos los metabolitos aislados a partir de semilla provienen de las fracciones de mediana polaridad de los extractos y son identificados como DTC (Wu et al., 2011). Aunque los DTC son los metabolitos más buscados en las semillas de *Caesalpinnia*, también se han reportado modestos esfuerzos en caracterizar metabolitos más polares. Sánchez-Carranz y colaboradores aislaron los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Caesalpinnia coriaria* (ácido gálico, estigmasterol, etil galato) y evaluaron su actividad anticancerígena (Sánchez-Carranza et al., 2017).

También se han reportados algunas plantas del género *Caesalpinnia* que han mostrado actividad anticoagulante. Un ejemplo interesante son las semillas de *Caesalpinnia crista*, cuyo extracto acuoso presentó un efecto anticoagulante fuerte mediante el ensayo TP y TTPa (Srinivasa et al., 2019). Otro ejemplo de presencia de compuestos anticoagulantes es brazilin, aislado de *Caesalpinnia Sappan* (Kim and Park, 2019)

A partir de 115 g de semillas de *Caesalpinnia yucatanensis* fue posible obtener 3 fracciones: CYS1, CYS2 y CYS3, cuyos rendimientos fueron 4.4%, 5.6% y 1.3%, respectivamente. El perfil cromatográfico de las mismas se observa en la Figura 12. En las fracciones CYS1 y CYS2 precipitaron dos sólidos de color amarillo claro, los cuales se separaron y denominaron como las fracciones CYS1A y CYS2A.

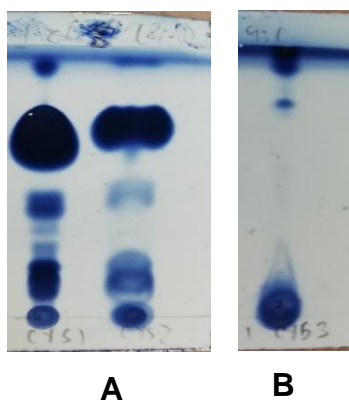


Figura 12 Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas a partir de semillas de *C. yucatanensis*. A) Fracción CYS1 y CYS2. Fase móvil: AcOEt/MeOH 8:2 B) CYS3. Fase móvil: MeOH/AcOEt 9:1

IV.2 Extracción y fraccionamiento de las inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*

Las flores de las plantas del género *Caesalpinnia* no han sido caracterizadas desde un punto de vista fitoquímico ni biológico. A pesar de ser una parte de la planta con gran disponibilidad, las flores de *Caesalpinnia* no se han estudiado extensivamente. Solamente se reportan estudios en las flores de *Caesalpinnia pulcherrima*, cuyos extractos etanólico y acuoso muestran actividades antivirales, antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas, antiinflamatorias, y antihelmínticas (Chiang, 2003; Moteriya and Chanda, 2017). El único estudio fitoquímico conocido se realizó a partir de las flores de *Caesalpinnia giliesi* para aislar compuestos fenólicos y fitoesteroles. En este artículo se caracterizó un novedoso derivado de ácido octadecenoico y se demostró su efecto hepatoprotector en modelos de ratón intoxicados con CCl_4 (Osman et al., 2016).

Por lo anterior, resulta interesante la evaluación de la actividad biológica de los metabolitos de ésta especie, en particular de sus inflorescencias.

A partir de 0.56 kg de inflorescencias de *Caesalpinia yucatanensis* fue posible obtener 99.23 g de extracto crudo metanólico para un rendimiento del 17.7 %. El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 13. De este extracto se disolvieron 59.32 g en una mezcla MeOH/ACN (2:1, v:v) y posteriormente se fraccionó mediante partición líquido-líquido utilizando el doble de volumen de hexano. Durante la partición, se observó la formación de un precipitado en la fase polar, que se separó e identificó como la fracción CYF3 (m = 3.41 g, 5.74%). Se obtuvieron 34.42 g de CYF1 (54%) y 1.17 g de CYF2 (1.77%).

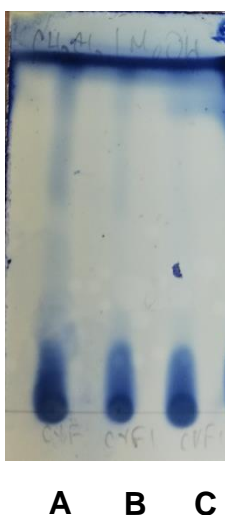


Figura 13 Análisis por CCD del extracto metanólico CYF y las fracciones CYF1 (B) y CYF2(C). Fase móvil: CH₂Cl₂/MeOH.

IV.3

Actividad

anti-neuraminidasa de fracciones de inflorescencias y semillas de *C. yucatanensis*

La neuraminidasa (NA) es una glicoproteína transmembranal tetramérica compuesta de cuatro subunidades idénticas (Air, 2012). Es la segunda glicoproteína de superficie principal presente en los virus de la influenza A y B, pero está ausente en el virus de la influenza C. La función de la neuraminidasa es escindir los residuos terminales de ácido siálico presentes en las superficies celulares y liberar los viriones de la progenie, facilitando la liberación del virus de las células infectadas. La proteína NA ha sido un importante y bien establecido objetivo para el tratamiento de la influenza (Bai et al., 2021).

El desarrollo de ensayos enzimáticos utilizando derivados fluorescentes de ácido siálico como sustrato, ha permitido evaluar la actividad anti-neuraminidasa de manera sencilla, rápida y sin emplear medios de cultivo costosos. Entre estos ensayos se destaca, el uso de 4- ácido 4-

metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico y la neuraminidasa de *Clostridium perfringes* para verificar la actividad inhibitoria de compuestos naturales e incluso fracciones de plantas (Ullah et al., 2019).

En este trabajo se describe la evaluación de la actividad anti-neuraminidasa de semillas e inflorescencias de *C. yucatanensis*, así como el establecimiento del ensayo NA en el laboratorio.

Primeramente se evaluaron las fracciones CYS1, CYS2, CYS3 y CYF1 a una concentración de 0.1 mg/mL. Las fracciones que mostraran una disminución de la velocidad de la reacción enzimática, se seleccionaron como candidatos con posible actividad antineuraminidasa. Como se observa en la figura 14, la fluorescencia del control (enzima, buffer y sustrato) se incrementa a lo largo del tiempo, mientras que en el caso del control positivo (quercetina) se aprecia como apenas se incrementa la fluorescencia. Las fracciones con menor incremento de la fluorescencia fueron CYF1 y CYS1, por lo que se proponen para continuar su estudio y la determinación del CI_{50} .

La fracción CYF1 impidió que impidió la reacción enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringes* a una concentración de 0.1 mg/mL

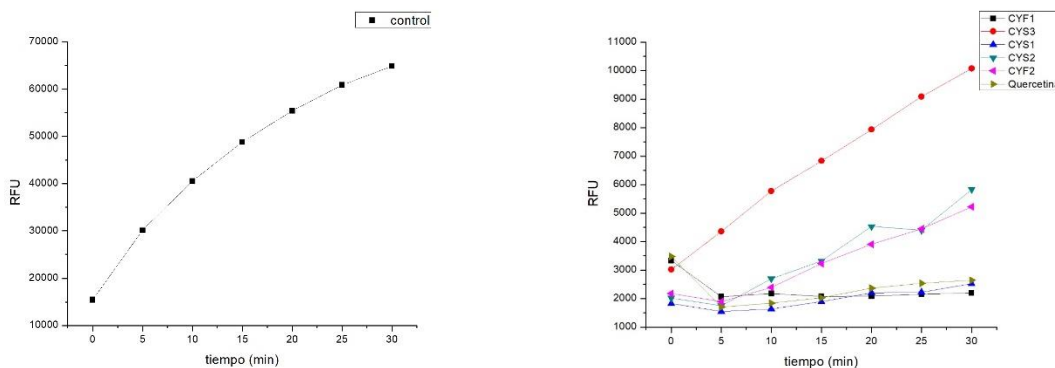


Figura 14 Comportamiento de la fluorescencia durante el ensayo de inhibición enzimática A) Control negativo (buffer + enzima + sustrato) B) Fracciones CYS1, CYS2, CYS3 y CYF1

Mediante cromatografía de exclusión por tamaño fue posible obtener 3 fracciones derivadas de CYF1, a las cuales se le evaluó la actividad anti-neuraminidasa. En todos los casos, al aumentar la concentración de las fracciones evaluadas, disminuye la fluorescencia observada. En la Figura 15 se muestra el comportamiento de la fluorescencia para las fracciones CYF1A, CYF1B y CYF1C.

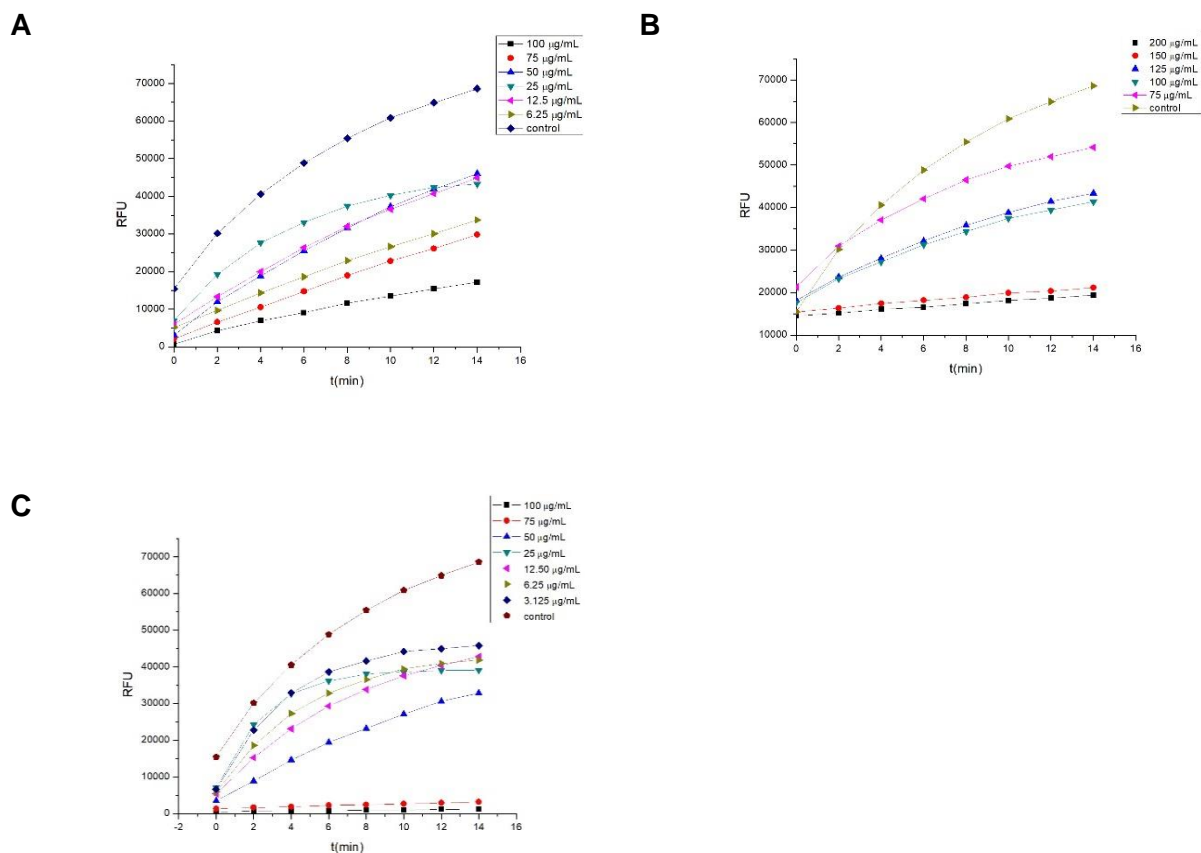


Figura 15 Comportamiento de la fluorescencia en el ensayo enzimático A) CYF1A B) CYF1B C) CYF1C

A partir de los valores de fluorescencia se realizó un ajuste no lineal utilizando el software Graphpad. De esta manera fue posible obtener valores de CI_{50} para las fracciones derivadas de CYF1.

Tabla 2 Valores de CI_{50} para las fracciones CYF1A, CYF1B, CYF1C

Fracción	CI_{50} (mg/mL)
CYF1A	-
CYF1B	0.15
CYF1C	2.125

La fracción CYF1B mostró el CI_{50} más bajo, por lo que de las tres fracciones derivadas de CYF1 ésta es la que contiene los metabolitos con potencial actividad anti-neuraminidasa. Este valor de

CI_{50} puede estar relacionado con la compleja composición de los metabolitos en las inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis* o a que las moléculas con actividad biológica se encuentran en bajas concentraciones. Es necesario continuar con el fraccionamiento de CYF1B para aislar e identificar los metabolitos activos.

El género *Caesalpinnia* está constituido por especies de alto potencial farmacológico. Entre estas especies, se han reportado presencia de metabolitos con actividad antiviral tal es el caso de los diterpenos de tipo casano como inhibidores del virus de la influenza, como espirocaesalmina B, cesalpininas M1, M2, F1 y cesalminas E1-E3. Estas moléculas mostraron efectos inhibitorios moderados sobre NA del virus de influenza con valores de CI_{50} de 29,0 a 87,4 μ M, en comparación con los valores de CI_{50} del zanamivir a 6,33 μ M (Qin et al., 2018). En el caso de *Caesalpinnia yucatanensis*, no se ha caracterizado la actividad biológica de sus semillas e inflorescencias. De ahí que resulte novedoso la actividad anti-neuraminidasa reportada en este trabajo.

El ensayo se realizó con la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, esta es una exosialidasa que cataliza en orden preferencial enlaces α -2,3 > α -2,6 > α -2,8-glucosídicos (Li and McClane, 2014). De igual forma, la neuraminidasa N1 del virus de influenza A hidroliza más eficientemente los enlaces α -2,3 que los α -2,6-glucosídicos (McAuley et al., 2019)(Air, 2012; McAuley et al., 2019). Dado que ambas enzimas presentan especificidad por la catálisis de enlaces de AS α -2,3, es posible extrapolar la actividad anti-neuraminidasa de la fracción CYF1B hacia la N1 del virus de Influenza A. Se requieren ensayos específicos con dicha enzima para determinar la CI_{50} y posteriores ensayos con el virus de influenza A para verificar su potencial como antiviral.

IV.4 Evaluación de la actividad anticoagulante de inflorescencias y semillas de *Caesalpinnia Yucatanensis*

Como se mencionó anteriormente, solamente fue posible evaluar los compuestos solubles en DMSO al 10%. De las fracciones de semilla de *Caesalpinnia yucatanensis* solo fue posible evaluar la partición metanólica (CYS3), mientras que de las inflorescencias se evaluó CYF1. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de tiempo de protrombina.

Tabla 3 Valores de tiempos de coagulación obtenidos a partir de una solución de 20 mg/ml de extractos de inflorescencias y semillas de *Caesalpinnia yucatanensis*

Muestra	Tiempo de coagulación (s)
---------	---------------------------

Control negativo	12.73 ± 0.15
Control positivo (heparina)	42.60 ± 4.01
CYS3	13.68 ± 0.26
CYF1	18.82 ± 2.13

Existen diferencias significativas (Anexo I) para las fracciones CYF1 y el control negativo, indicando que la actividad anticoagulante de CFY1 no es un falso positivo. La fracción CYF1 mostró un aumento respecto al control negativo de un 48% en el tiempo de coagulación, en cambio la fracción CYS3 no muestra actividad anticoagulante.

Es importante considerar que al evaluar fracciones, los compuestos que ejercen la actividad biológica se encuentran en menor concentración, por lo que se espera que, al purificar, se obtengan mejores valores de actividad anticoagulante. Se recomienda continuar con el aislamiento y purificación biodirigida hasta la completa elucidación estructural del o los metabolitos responsables del efecto farmacológico.

A partir de CYF1 se obtuvieron 3 fracciones mediante cromatografía de exclusión (CYF1A, CYF1B, CYF1C), las cuales se evaluaron para determinar cuál(es) contenían los componentes activos.

Tabla 4 Valores de tiempos de coagulación obtenidos a partir de una solución de 10 mg/ml de extractos de inflorescencias y semillas de *Caesalpinnia yucatanensis*

Muestra	Tiempo de coagulación (s)
Control negativo	12.73 ± 0.15
Control positivo (heparina)	42.60 ± 4.01
CYF1A	14.87 ± 0.40
CYF1B	17.17 ± 0.64
CYF1C	13.23 ± 0.15

La fracción CYF1B mostró mayor tiempo de coagulación, con un incremento respecto al control negativo del 26%, por lo que se considera la fracción con mayor actividad anticoagulante.

En la literatura se reporta la actividad anticoagulante de numerosas plantas, tanto de sus extractos como de metabolitos aislados. Se pueden citar las dicumarinas euforbetina y dimeresculetina, aisladas de *Viola yedoensis*, que incrementan el tiempo de protrombina a 30s

(concentración 100 μM) (Zhou et al., 2009). También el extracto metanólico de *Crassocephalum crepidioides* prolonga de manera significativa el tiempo de protrombina a una concentración de 10mg/mL (Ayodele et al., 2019).

Por otra parte, los anticoagulantes orales aprobados comercialmente incrementan el tiempo de protrombina significativamente a concentraciones mucho más bajas que los extractos de plantas. Un ejemplo de esto es el apixaban, que duplica el tiempo normal de protrombina a una concentración de 3.6 μM (Byon et al., 2019).

De ahí, que en muchas ocasiones, cuando se identifican plantas con potencial actividad anticoagulante, se procede al aislamiento de los metabolitos que eliciten dicha respuesta.

Una excepción a este planteamiento lo constituyen los remedios tradicionales chinos Kangerkaryu y Bak Foong Pill, que son prescritos como anticoagulantes naturales con beneficios adicionales a la salud (antioxidante, anticancerino, antiinflamatorio) (Samuels, 2005). Kangerkaryu está compuesto por 6 plantas medicinales: raíz de peonía, rizoma de cnidium, cártamo, rizoma de cyperus, raíz de saussurea y raíz de *Salvia miltiorrhiza* (Makino et al., 2002). Mientras que Bak Foong Pill incluye 26 especies de plantas diferentes (Gou et al., 2003).

Teniendo esto en cuenta, es posible que los metabolitos que componen la fracción CYF1B eliciten una respuesta anticoagulante significativa a menor concentración, por lo que se sugiere proseguir con la purificación de la misma. Pero también es importante considerar otros usos de las inflorescencias de *Caesalpinia yucatanensis* como remedio natural.

IV.5 Caracterización preliminar de la fracción CYF1B

La complejidad de una fracción o extracto vegetal es un reto a superar en la investigación fitoquímica. En muchas ocasiones, los componentes con actividad biológica se encuentran a muy baja concentración, mientras que en otras ocasiones, la sinergia de dos o más compuestos, es la que eliciten una respuesta biológica (Boik et al., 2009).

La fracción CYF1 tiene una naturaleza polar, debido a que se obtuvo a partir de una partición con ACN/MeOH. Los polisacáridos sulfatados, flavonoides y terpenoides son las principales entidades químicas con actividad anticoagulante y anti neuraminidasa (Ciancia et al., 2010; Liu et al., 2008). Es por ello que la fracción CYF1 fue sometida a distintas pruebas colorimétricas de identificación, las cuales incluyen: detección de la presencia de flavonoides, detección de la presencia de saponinas, detección de la presencia de triterpenos y detección de la presencia de carbohidratos.

IV.5.1 Identificación de metabolitos secundarios

Mediante la evaluación de ensayos colorimétricos se determinó que la fracción CYF1 contiene carbohidratos y flavonoides. La planta *Caesalpinia yucatanensis* se ha utilizado como fuente melífera, por lo que la presencia de carbohidratos en sus inflorescencias es un resultado esperado (Varga et al., 2013). La coloración de las mismas (amarillo y rojo) es atribuida a la presencia de flavonoides (Stavenga et al., 2021) (Figura 16).

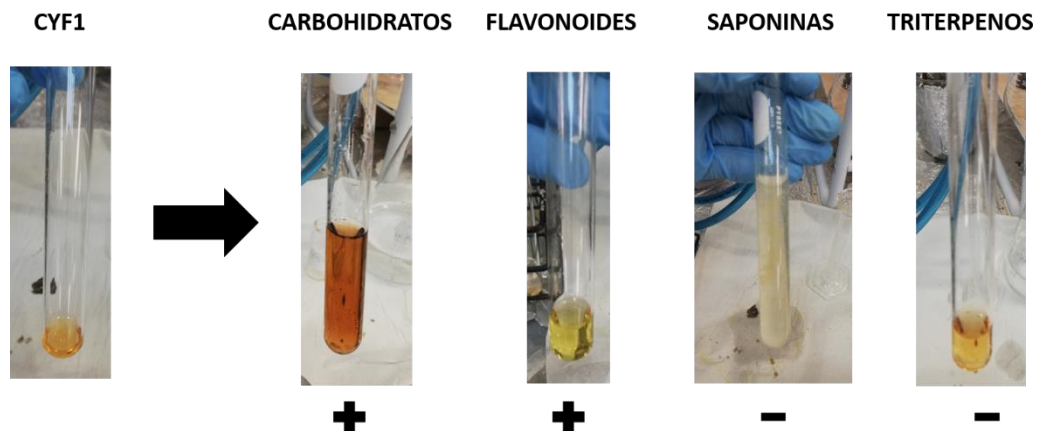


Figura 16 Resultados del análisis colorimétrico de la fracción CYF1B

IV.5.2 Análisis por HPLC de la partición CYF1

El análisis por HPLC de la fracción CYF1, permitió observar la presencia de 3 señales de gran intensidad que se superponen con tiempos de retención de 2.5, 2.8 y 3.2 minutos (Figura 17). Paralelamente a la fracción CYF1 se realizó un análisis por cromatografía en capa delgada donde se pueden observar 3 bandas principales con factores de retención de 0.4, 0.8 y 0.9.

A pesar de que se observan 3 bandas, es posible que numerosos compuestos similares en estructura química se encuentren en esta partición, por lo que se continuará con la exploración de diversos métodos cromatográficos para separar cada uno e identificar el (los) que confieren la actividad antineuraminidasa y anticoagulante.

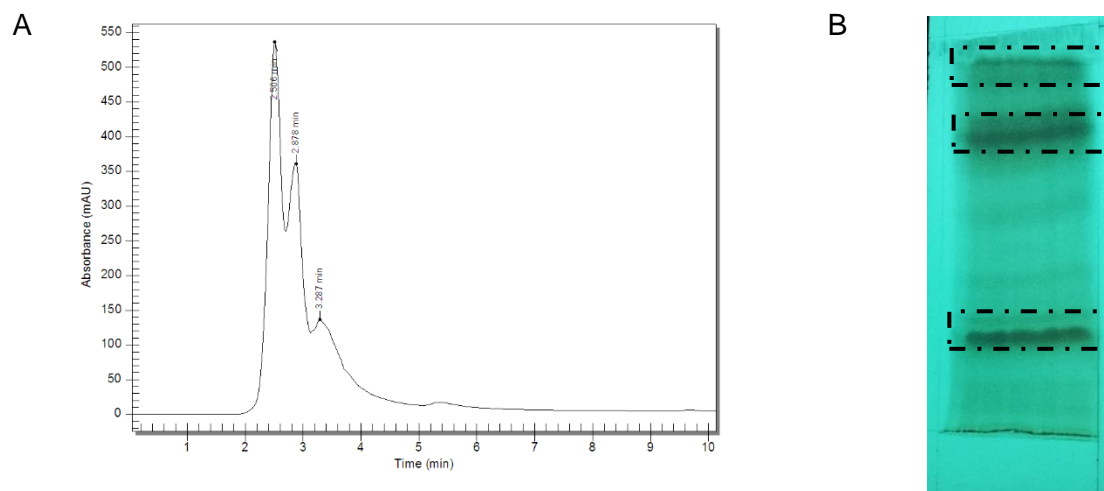


Figura 17 Caracterización cromatográfica de la fracción CYF1B A) Cromatograma HPLC B) Cromatofolio de fase reversa, fase móvil H₂O/MeOH 1:1

IV.6. Caracterización espectroscópica

IV.6.1. Análisis de RMN-1H

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear es una poderosa técnica para determinar la estructura de moléculas pequeñas. Para la fracción CYF1B no fue posible asignar señales a una estructura debido a la complejidad de la muestra. Sin embargo, los desplazamientos químicos de los protones sí permiten al menos diferenciar la naturaleza de los mismos. En la Figura 18 se muestran señales en la zona de protones aromáticos ($\delta = 6.5-7.5$ ppm) y protones

unidos a carbono sp^3 de los carbohidratos ($\delta = 3-6$ ppm). Los protones anoméricos muestran desplazamientos más blindados ($\delta = 4.5-5$ ppm)

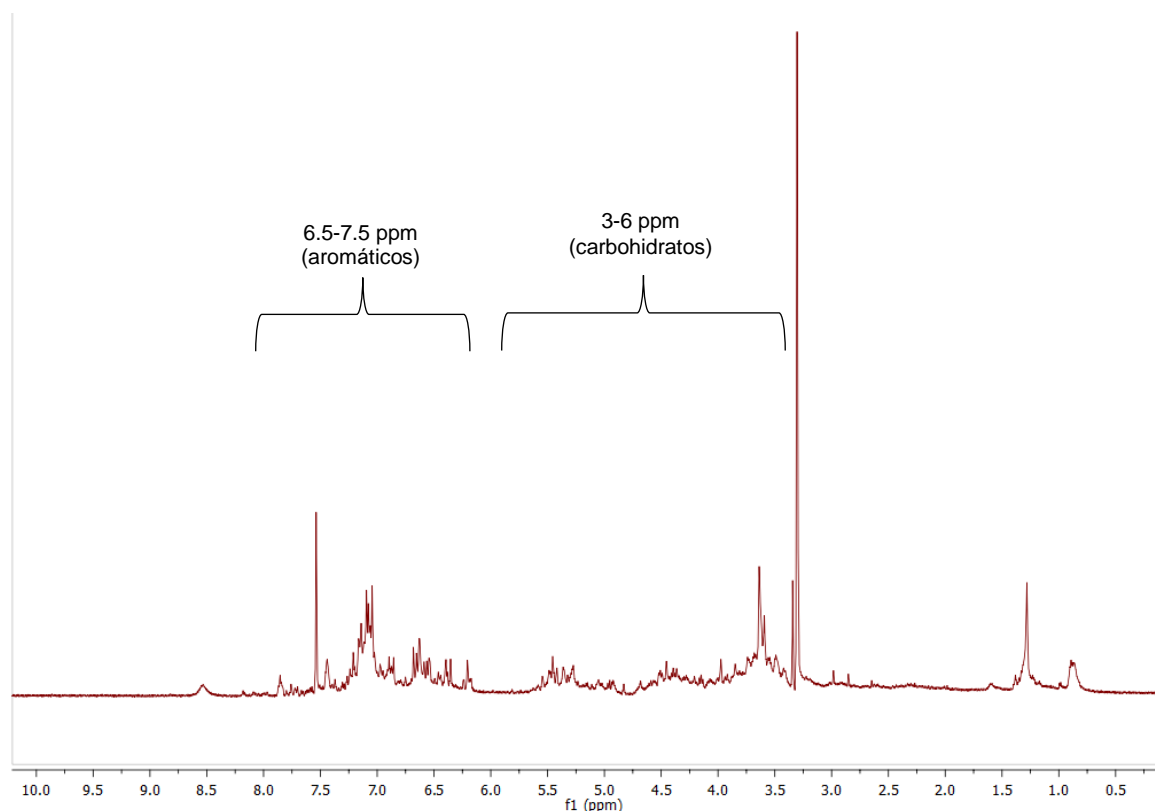


Figura 18 Espectro de RMN- 1 H de la fracción CYF1B

IV.6.2. Análisis de FT-IR

La espectroscopía infrarroja (IR) se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, convirtiéndola en vibración molecular. Esta absorción es característica de la naturaleza de los enlaces químicos presentes en una muestra. Mediante el análisis del espectro IR es posible identificar los grupos funcionales presentes en una molécula orgánica. El espectro IR de la fracción CYF1B (Figura 19) muestra una banda ancha entre 3600 y 3100 cm^{-1} que corresponde a vibraciones de enlace de grupo –OH libre. Esta es una banda típica en los espectros IR de carbohidratos o de flavonoides.

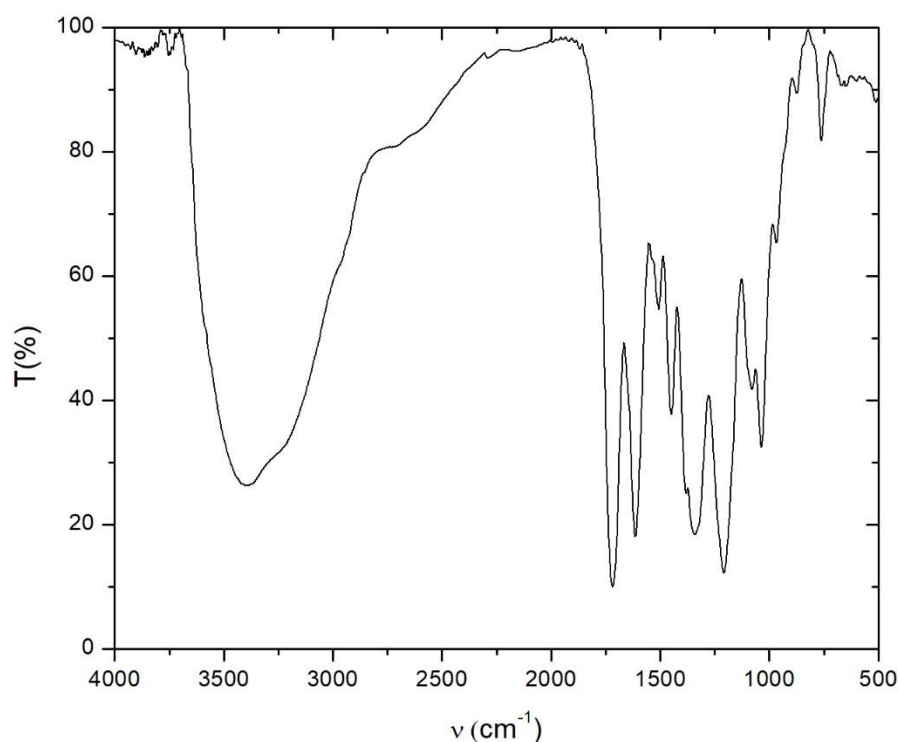


Figura 19 Espectro de RMN-1H de la fracción CYF1B

Otra señal característica de esta estructura es la vibración de enlace C=O a 1728 cm^{-1} , correspondiente a grupo carbonilo de cetona. Aunque no es posible asignar la estructura de los componentes de la fracción CYF1B, se observan las bandas del patrón de fenilo a una frecuencia de 1600 , 1501 y 1448 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estrechamiento de doble enlace C=C de anillos aromáticos. En la zona de la huella de la molécula, se presenta la banda $\nu_{\text{C-O}}$ para fenoles en 1200 cm^{-1} . También se observan bandas a una frecuencia de 1025 cm^{-1} , que pudiera representar la banda $\nu_{\text{C-O}}$ pero para alcoholes primarios.

El análisis del espectro IR ha contribuido a fortalecer las evidencias preliminares de que la muestra CYF1B tiene en su composición flavonoides y carbohidratos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Las inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*, poseen compuestos con actividad anticoagulante. Hasta el momento solo se han reportado compuestos con actividad anticoagulante en el tronco de *Caesalpinnia sappan* y en la corteza *Caesalpinnia férrea*. Por lo que este sería el primer registro de dicha actividad en la especie.
- Las inflorescencias y semillas de *Caesalpinnia yucatanensis* mostraron actividad anti-neuraminidasa en el ensayo enzimático con ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico a la concentración de 100 μ g/mL.
- Se obtuvo un valor de CI_{50} de 0.15 mg/mL de inhibición de la actividad de la neuraminidasa para la subfracción CYF1B de las inflorescencias de *Caesalpinnia yucatanensis*.
- En la subfracción activa CYF1B se identificaron carbohidratos y flavonoides mediante pruebas colorimétricas y espectroscópicas.

ANEXO I

Análisis estadístico de la evaluación de la actividad anticoagulante de CYF1B. (Test de Fisher para $p < 0.05$). Control negativo (Nivel 1), Control positivo (Nivel 2), CYS3 (Nivel 3), CYF1 (Nivel 4). Los grupos con una significación equivalente a 1 indican que sus medias tienen diferencias estadísticamente significativas.

		Dif. Media	Valor de t	Probabilidad	Significación
Nivel 2	Nivel 1	29.86	16.06	2.258 E-7	1
Nivel 3	Nivel 1	0.95	0.51	0.623	0
Nivel 3	Nivel 2	-28.91	-15.56	2.903 E-7	1
Nivel 4	Nivel 1	6.08	3.27	0.011	1
Nivel 4	Nivel 2	-23.78	-12.79	0.0131 E-6	1
Nivel 4	Nivel 3	5.133	2.76	0.024	1

REFERENCIAS

- Abu Samaan, T.M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., Büsselberg, D., 2019. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules* 9, 789. <https://doi.org/10.3390/biom9120789>
- Air, G., 2012. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir. Viruses* 6, 245–256.
- Almagro, L., Fernández-Pérez, F., Pedreño, M., 2015. Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health. *Molecules* 20, 2973–3000. <https://doi.org/10.3390/molecules20022973>
- Alquwaizani, M., Buckley, L., Adams, C., Fanikos, J., 2013. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. *Curr. Emerg. Hosp. Med. Rep.* 1, 83–97. <https://doi.org/10.1007/s40138-013-0014-6>
- Amaral, R.G., 2019. Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. *Clin. Oncol.* 4, 5.
- Antoniak, S., Mackman, N., 2014. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. *Blood* 123, 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-526277>
- Ayodele, O.O., Onajobi, F.D., Osoniyi, R.O., 2019. In vitro anticoagulant effect of *Crassocephalum crepidioides* leaf methanol extract and fractions on human blood. *J. Exp. Pharmacol.* Volume 11, 99–107. <https://doi.org/10.2147/JEP.S218261>
- Bai, Y., Jones, J.C., Wong, S.-S., Zanin, M., 2021. Antivirals Targeting the Surface Glycoproteins of Influenza Virus: Mechanisms of Action and Resistance. *Viruses* 13, 624. <https://doi.org/10.3390/v13040624>
- Baltina, Lidia A., ZarubaeV, V.V., Baltina, Lia A., Orshanskaya, I.A., Fairushina, A.I., Kiselev, O.I., Yunusov, M.S., 2015. Glycyrrhizic acid derivatives as influenza A/H1N1 virus inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1742–1746. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.02.074>
- Bao, H., Zhang, L.-L., Liu, Q.-Y., Feng, L., Ye, Y., Lu, J.-J., Lin, L.-G., 2016. Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects of Cassane Diterpenoids from the Seeds of *Caesalpinia sappan* in Cancer Cells. *Molecules* 21, 791.
- Barnes, M., Heywood, A.E., Mahimbo, A., Rahman, B., Newall, A.T., Macintyre, C.R., 2015. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case–control studies. *Heart* 101, 1738–1747. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307691>
- Bautista-Vargas, M., Bonilla-Abadía, F., Cañas, C.A., 2020. Potential role for tissue factor in the pathogenesis of hypercoagulability associated with in COVID-19. *J. Thromb. Thrombolysis* 50, 479–483. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02172-x>

- Berkovits, A., Mezzano, D., 2017. Nuevos anticoagulantes orales: actualización. Rev. Chil. Cardiol. 36, 254–263. <https://doi.org/10.4067/S0718-85602017000300254>
- Boik, J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Seymour, E.M., Spelman, K., 2009. Interactions of Bioactive Plant Metabolites: Synergism, Antagonism, and Additivity, in: Recent Advances in Plant Biotechnology. Springer US, Boston, MA, pp. 213–230. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0194-1_10
- Borges-Argáez, R., Cáceres-Farfán, M., De Pedro, N., Cautain, B., Pérez-del Palacio, J., Vicente, F., Genilloud, O., Melguizo, A., Díaz, C., Reyes, F., El Aouad, N., Sansores-Peraza, P., 2017. Cytotoxic studies and in vitro effects of trans-3,4,4',5-tetramethoxystilbene, a bioactive compound isolated from *Lonchocarpus punctatus* Kunth. Polibotánica 0. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.43.7>
- Bounameaux, H., Camm, A.J., 2014. Edoxaban: an update on the new oral direct factor Xa inhibitor. Drugs 74, 1209–1231. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0261-1>
- Byon, W., Garonzik, S., Boyd, R.A., Frost, C.E., 2019. Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review. Clin. Pharmacokinet. 58, 1265–1279. <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00775-z>
- Capoor, M.N., Stonemetz, J.L., Baird, J.C., Ahmed, F.S., Awan, A., Birkenmaier, C., Inchiosa, M.A., Magid, S.K., McGoldrick, K., Molmenti, E., Naqvi, S., Parker, S.D., Pothula, S.M., Shander, A., Steen, R.G., Urban, M.K., Wall, J., Fischetti, V.A., 2015. Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Testing: A Comparative Effectiveness Study in a Million-Patient Sample. PLOS ONE 10, e0133317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133317>
- Chantrill, H., Inkley, W., Morris, W., Pyle, A.H., 1952. The Action of Plant Extracts on a Bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on Influenza A Virus 11.
- Chee, Y.L., 2014. Coagulation. J. R. Coll. Physicians Edinb. 44, 42–45. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2014.110>
- Chiang, L.C., 2003. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. J. Antimicrob. Chemother. 52, 194–198. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg291>
- Chiang, L.-C., Ng, L.-T., Cheng, P.-W., Chiang, W., Lin, C.-C., 2005. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32, 811–816. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04270.x>
- Ciancia, M., Quintana, I., Cerezo, A.S., 2010. Overview of Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds in Relation to their Structures, Focusing on those of

- Green Seaweeds*. *Curr. Med. Chem.* 17, 2503–2529. <https://doi.org/10.2174/092986710791556069>
- Clar, C., Oseni, Z., Flowers, N., Keshtkar-Jahromi, M., Rees, K., 2015. Influenza vaccines for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005050.pub3>
- Corrales-Medina, V.F., Madjid, M., Musher, D.M., 2010. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 10, 83–92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70331-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70331-7)
- de Araujo, D.F., Madeira, J. da C., Cunha, A.P., Ricardo, N.M.P.S., Bezerra, F.F., Mourão, P.A.S., Assreuy, A.M.S., Pereira, M.G., 2021. Structural characterization of anticoagulant and antithrombotic polysaccharides isolated from *Caesalpinia ferrea* stem barks. *Int. J. Biol. Macromol.* 175, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.177>
- Dittbrenner, A., 2012. Variability of alkaloid content in *Papaver somniferum* L. 5.
- Dobson, J., Whitley, R.J., Pocock, S., Monto, A.S., 2015. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *The Lancet* 385, 1729–1737. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62449-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62449-1)
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., Daniels, R., 2018. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.* 109, 7.
- Gagnon, E., Ringelberg, J.J., Bruneau, A., Lewis, G.P., Hughes, C.E., 2019. Global Succulent Biome phylogenetic conservatism across the pantropical *Caesalpinia Group* (Leguminosae). *New Phytol.* 222, 1994–2008. <https://doi.org/10.1111/nph.15633>
- Goeijenbier, M., van Wissen, M., van de Weg, C., Jong, E., Gerdes, V.E.A., Meijers, J.C.M., Brandjes, D.P.M., van Gorp, E.C.M., 2012. Review: Viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. *J. Med. Virol.* 84, 1680–1696. <https://doi.org/10.1002/jmv.23354>
- Gordaliza, M., Castro, M., Miguel del Corral, J., San Feliciano, A., 2000. Antitumor Properties of Podophyllotoxin and Related Compounds. *Curr. Pharm. Des.* 6, 1811–1839. <https://doi.org/10.2174/1381612003398582>
- Gou, Y.L., Ho, A.L.S., Rowlands, D.K., Chung, Y.W., Chan, H.C., 2003. Effects of Bak Foong Pill on Blood Coagulation and Platelet Aggregation. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 241–246. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.241>

- Gozzo, L., Viale, P., Longo, L., Vitale, D.C., Drago, F., 2020. The Potential Role of Heparin in Patients With COVID-19: Beyond the Anticoagulant Effect. A Review. *Front. Pharmacol.* 11, 1307. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01307>
- He, D.-Y., Li, Y.-P., Tang, H.-B., Luo, L., Ma, R.-J., Wang, J.-H., Wang, L.-Q., 2016. Phenolic compounds from the twigs and leaves of Tara (*Caesalpinia spinosa*). *J. Asian Nat. Prod. Res.* 18, 334–338. <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1096269>
- Hossain, M.A., AL-Raqmi, K.A.S., AL-Mijizy, Z.H., Weli, A.M., Al-Riyami, Q., 2013. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 705–710. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60142-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60142-2)
- Jing, W., Zhang, X., Zhou, H., Wang, Y., Yang, M., Long, L., Gao, H., 2019. Naturally occurring cassane diterpenoids (CAs) of *Caesalpinia*: A systematic review of its biosynthesis, chemistry and pharmacology. *Fitoterapia* 134, 226–249. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.023>
- Kalauni, S.K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Linn, T.Z., Asih, P.B.S., Syafruddin, D., Kadota, S., 2006. Antimalarial Activity of Cassane- and Norcassane-Type Diterpenes from *Caesalpinia crista* and Their Structure–Activity Relationship. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1050–1052. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1050>
- Kamikubo, Y., Mendolicchio, G.L., Zampolli, A., Marchese, P., Rothmeier, A.S., Orje, J.N., Gale, A.J., Krishnaswamy, S., Gruber, A., Østergaard, H., Petersen, L.C., Ruf, W., Ruggeri, Z.M., 2017. Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex. *Blood* 130, 1661–1670. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-767079>
- Kanade, G.D., Pingale, K.D., Karpe, Y.A., 2018. Activities of Thrombin and Factor Xa Are Essential for Replication of Hepatitis E Virus and Are Possibly Implicated in ORF1 Polyprotein Processing. *J. Virol.* 92. <https://doi.org/10.1128/JVI.01853-17>
- Kim, K., Park, K.-I., 2019. A Review of Antiplatelet Activity of Traditional Medicinal Herbs on Integrative Medicine Studies. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2019, 7125162. <https://doi.org/10.1155/2019/7125162>
- Kishore, K., 2013. In-vitro and In-vivo Screening Methods for Antithrombotic Agents. 2013 10.
- Lee, S., Lee, H., Shin, Y., Kang, H., Cho, H., 2017. The anti-HSV-1 Effect of Quercetin Is Dependent on the Suppression of TLR-3 in Raw 264.7 Cells. *Arch Pharm Res* 40, 623–630.
- Lehnert, R., Pletz, M., Reuss, A., Schaberg, T., 2016. Antiviral Medications in Seasonal and Pandemic Influenza. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 15.

- Li, G., Fox, S., Summa, B., Hu, B., Wenk, C., Akmatbekov, A., Harbert, J., Vander Heide, R., Brown, Q., 2020. Multiscale 3-dimensional pathology findings of COVID-19 diseased lung using high-resolution cleared tissue microscopy. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.037473>
- Li, J., McClane, B.A., 2014. The Sialidases of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718 Differ in Their Properties and Sensitivities to Inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1701–1709. <https://doi.org/10.1128/AEM.03440-13>
- Liu, A.-L., Wang, H.-D., Lee, S.M., Wang, Y.-T., Du, G.-H., 2008. Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 7141–7147. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.06.049>
- Lopes, B.R.P., da Costa, M.F., Genova Ribeiro, A., da Silva, T.F., Lima, C.S., Caruso, I.P., de Araujo, G.C., Kubo, L.H., Iacovelli, F., Falconi, M., Desideri, A., de Oliveira, J., Regasini, L.O., de Souza, F.P., Toledo, K.A., 2020. Quercetin pentaacetate inhibits in vitro human respiratory syncytial virus adhesion. *Virus Res.* 276, 197805. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197805>
- Ludwig, A., Lucero-Obusan, C., Schirmer, P., Winston, C., Holodniy, M., 2015. Acute cardiac injury events ≤ 30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* 15, 109. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0095-0>
- Ma, G.-X., Xu, N., Yuan, J.-Q., Wei, H., Zheng, Q.-X., Sun, Z.-C., Yang, J.-S., Xu, X.-D., 2012. Two new diterpenes, neocaesalpin MR and minaxin C, from *Caesalpinia minax*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 14, 1156–1161. <https://doi.org/10.1080/10286020.2012.734504>
- Mackman, N., Antoniak, S., Wolberg, A.S., Kasthuri, R., Key, N.S., 2020. Coagulation Abnormalities and Thrombosis in Patients Infected With SARS-CoV-2 and Other Pandemic Viruses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 2033–2044. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314514>
- Makino, T., Wakushima, H., Okamoto, T., Okukubo, Y., Saito, K., Kano, Y., 2002. Effects of Kangen-karyu on Coagulation System and Platelet Aggregation in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 523–525. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.523>
- Martínez-Murillo, C., 2000. Hacia un consenso nacional en tromboembolismo venoso 136, 5.
- McAuley, J.L., Gilbertson, B.P., Trifkovic, S., Brown, L.E., McKimm-Breschkin, J.L., 2019. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front. Microbiol.* 10, 39. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>

- Meganck, R.M., Baric, R.S., 2021. Developing therapeutic approaches for twenty-first-century emerging infectious viral diseases. *Nat. Med.* 27, 401–410. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01282-0>
- Ming, L.J., Yin, A.C.Y., 2013. Therapeutic Effects of Glycyrrhizic Acid. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1934578X1300800. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800335>
- Moteriya, P., Chanda, S., 2017. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Caesalpinia pulcherrima* flower extract and assessment of their in vitro antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, and genotoxic activities. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 45, 1556–1567. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1261871>
- Mucsi, I., Gyulai, Z., Béládi, I., 1992. Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures. *Acta Microbiol Hung.* 39 137–147.
- Mueck, W., Eriksson, B.I., Bauer, K.A., Borris, L., Dahl, O.E., Fisher, W.D., Gent, M., Haas, S., Huisman, M.V., Kakkar, A.K., Kålebo, P., Kwong, L.M., Misselwitz, F., Turpie, A.G.G., 2008. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor--in patients undergoing major orthopaedic surgery. *Clin. Pharmacokinet.* 47, 203–216. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847030-00006>
- Nielsen, S.S., 2010. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates, in: Nielsen, S.S. (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Texts Series*. Springer US, Boston, MA, pp. 47–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
- Ogunlana, O.O., He, W.J., Fan, J.T., Zeng, G.Z., Ji, C.J., Zheng, Y.Q., Olagunju, J.A., Akindahunsi, A.A., Tan, N.H., 2015. Report: Cytotoxic flavonoids from the young twigs and leaves of *Caesalpinia bonduc* (Linn) Roxb. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28, 2191–2198.
- Organización Mundial de la Salud, 2019. *Global Influenza Strategy 2019-2030*.
- Osman, S.M., El-Haddad, A.E., El-Raey, M.A., Abd El-Khalik, S.M., Koheil, M.A., Wink, M., 2016. A New Octadecenoic Acid Derivative from *Caesalpinia gilliesii* Flowers with Potent Hepatoprotective Activity. *Pharmacogn. Mag.* 12, S332–S336. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.185752>
- Palma-Tenango, M., Miguel-Chávez, R.S., Soto-Hernández, R.M., 2017. Aromatic and Medicinal Plants in Mexico, in: El-Shemy, H.A. (Ed.), *Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66507>
- Palta, S., Saroa, R., Palta, A., 2014. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58, 515. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>

- Pizzorno, A., Padey, B., Terrier, O., Rosa-Calatrava, M., 2019. Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy. *Front. Immunol.* 10, 531. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00531>
- Pryzdial, E.L.G., Sutherland, M.R., Lin, B.H., Horwitz, M., 2020. Antiviral anticoagulation. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 4, 774–788. <https://doi.org/10.1002/rth2.12406>
- Qiao, Y., Xu, Q., Hu, Z., Li, X.-N., Xiang, M., Liu, J., Huang, J., Zhu, H., Wang, J., Luo, Z., Xue, Y., Zhang, Y., 2016. Diterpenoids of the Cassane Type from *Caesalpinia decapetala*. *J. Nat. Prod.* 79, 3134–3142
- Qin, L., Bai, B., De-Po, Y., Shi-Yi, P., Long-Ping, Z., Mai-Hui, L., Zhi-Min, Z., 2018. Three New Cassane Diterpenes from the Seeds of *Caesalpinia Minax* Hance. *Nat. Prod. Res.* 32, 885–891.
- Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y., Boivin, G., 2013. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antivir. Res* 98, 174–185.
- Samuels, N., 2005. Herbal remedies and anticoagulant therapy. *Thromb. Haemost.* 93, 03–07. <https://doi.org/10.1160/TH04-05-0285>
- Sánchez-Carranza, J.N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E.W., Veloz G, R.A., Carraz, M., González-Maya, L., 2017. Phenolic Compounds Isolated from *Caesalpinia coriaria* Induce S and G2/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger Cell Death by Interfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines. *Mol. Basel Switz.* 22, 666. <https://doi.org/10.3390/molecules22040666>
- Saptarini, N.M., Herawati, I.E., Permatasari, U.Y., 2016. Total flavonoids content in acidified extract of flowers and leaves of gardenia (*Gardenia Jasminoides* Ellis) 3.
- Secretaría de Salud, 2020. NFORME SEMANAL DE LA TEMPORADA DE INFLUENZA ESTACIONAL 2019-2020.
- Smeeth, L., Cook, C., Thomas, S., Hall, A.J., Hubbard, R., Vallance, P., 2006. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting 367, 5.
- Song, G., Shen, X., Li, S., Li, Y., Si, H., Fan, J., Li, J., Gao, E., Liu, S., 2016. Structure-activity relationships of 3-O- β -chacotriosyl oleanane-type triterpenoids as potential H5N1 entry inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 119, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.061>
- Srinivasa, C., Nandish, S.K., Kengaiyah, J., Ramachandraiah, C., Shivaiah, A., Sannaningaiah, D., 2019. *Caesalpinia Crista* Seed Exhibits Strong Anticoagulant and Antiplatelet Activity.

- Stavenga, D.G., Leertouwer, H.L., Dudek, B., van der Kooij, C.J., 2021. Coloration of Flowers by Flavonoids and Consequences of pH Dependent Absorption. *Front. Plant Sci.* 11, 600124. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600124>
- Stone, J., Hangge, P., Albadawi, H., Wallace, A., Shamoun, F., Knuttien, M.G., Naidu, S., Oklu, R., 2017. Deep vein thrombosis: pathogenesis, diagnosis, and medical management. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 7, S276–S284. <https://doi.org/10.21037/cdt.2017.09.01>
- Tran, M.H., Nguyen, M.T.T., Nguyen, H.D., Nguyen, T.D., Phuong, T.T., 2015. Cytotoxic constituents from the seeds of Vietnamese *Caesalpinia sappan*. *Pharm. Biol.* 53, 1549–1554. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.986686>
- Ullah, M., Uddin, Z., Song, Y.H., Li, Z.P., Kim, J.Y., Ban, Y.J., Park, K.H., 2019. Bacterial neuraminidase inhibition by phenolic compounds from *Usnea longissima*. *South Afr. J. Bot.* 120, 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.020>
- Varga, S., Nuortila, C., Kytöviita, M.-M., 2013. Nectar Sugar Production across Floral Phases in the Gynodioecious Protandrous Plant *Geranium sylvaticum*. *PLoS ONE* 8, e62575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062575>
- Veckenstedt, A., Güttner, J., Béládi, I., 1987. Synergistic action of quercetin and murine alpha/beta interferon in the treatment of Mengo virus infection in mice. *Antiviral Res.* 7, 169–178. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(87\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0166-3542(87)90005-2)
- Virk, J.K., Kumar, S., Singh, R., Tripathi, A.C., Saraf, S.K., Gupta, V., Bansal, P., 2016. Isolation and characterization of quinine from *Polygonatum verticillatum*: A new marker approach to identify substitution and adulteration. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 7, 153–158. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.191427>
- Visintini Jaime, M.F., Redko, F., Muschiatti, L.V., Campos, R.H., Martino, V.S., Cavallaro, L.V., 2013. In vitro antiviral activity of plant extracts from *Asteraceae* medicinal plants. *Viol. J.* 10, 245. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-245>
- Visseren, F.L., Bouwman, J.J., Bouter, K.P., Diepersloot, R.J., de Groot, P.H., Erkelens, D.W., 2000. Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. *Thromb. Haemost.* 84, 319–324.
- World Health Organization (Ed.), 2019. WHO global report on traditional and complementary medicine, 2019. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wu, M., Wang, Y.-F., Zhang, M.-L., Huo, C.-H., Dong, M., Shi, Q.-W., Kiyota, H., 2011. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Caesalpinia*. *Chem. Biodivers.* 8, 1370–1399. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000176>

-
- Yang, Y., Tang, H., 2016. Aberrant coagulation causes a hyper-inflammatory response in severe influenza pneumonia. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 432–442. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.1>
- York, A., Hengrung, N., Vreede, F.T., Huiskonen, J.T., Fodor, E., 2013. Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4238–E4245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315068110>
- Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A., Zandi, K., 2017. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch. Virol.* 162, 2539–2551. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y>
- Zanin, J.L.B., de Carvalho, B.A., Salles Martineli, P., dos Santos, M.H., Lago, J.H.G., Sartorelli, P., Viegas, C., Soares, M.G., 2012. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules* 17, 7887–7902. <https://doi.org/10.3390/molecules17077887>
- Zhou, H.Y., Hong, J.L., Shu, P., Ni, Y.J., Qin, M.J., 2009. A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia* 80, 283–285. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.03.005>