



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-SIALIDASA DE
LOS DERIVADOS ACETILADOS Y METIL-
ACETILADOS DEL ÁCIDO CARMÍNICO**

Tesis que presenta

Lic. Laura Beatriz Montes de Oca Camba

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022

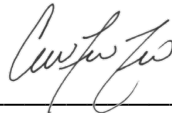
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Laura Beatriz Montes de Oca Camba titulado “**Evaluación de la actividad anti-sialidasa de los derivados acetilados y metil-acetilados de ácido carmínico**” fue realizado en el laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Rocío 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, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 regirán 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.



Laura Beatriz Montes de Oca Camba

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto de Ciencia Básica CONACYT con número de registro A1-S-27652, en el que participé bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de maestría No. 1049665.

Al Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández por su apoyo en la realización de los espectros de HPLC-masas.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por brindarme su lector de microplacas para realizar los ensayos de actividad enzimática.

A la Dra. Gloria Ivonne Hernández Bolio y el Dr. Emanuel Hernández Núñez, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN por su apoyo en la realización de los espectros de RMN.

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

Al MsC. José Martín Baas López por su apoyo en la realización del espectro FT-IR.

A mi comité tutorial y de revisión de tesis conformado por la Dra. Guadalupe Ayora Talavera, la Dra. Luisa López Ochoa, el Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y el Dr. Ramiro Quijano.

A mi asesora de tesis, la Dra. Rocío Borges Argáez.

DEDICATORIAS

Esta tesis de maestría la dedico a mi familia, en especial a mis padres Beatriz y Ernesto, porque me han apoyado desde el inicio de mi carrera para poder cumplir mis sueños. A pesar de que estamos lejos, ellos siempre me han acompañado en los momentos difíciles y me han dado ánimo. Gracias por ser para mí un paradigma de esfuerzo y valentía, y por enseñarme que el camino a la felicidad está lleno a veces de voluntad y sacrificio.

Contenido

Listado de abreviaturas	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 VIRUS DE LA INFLUENZA. CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
1.2 ANTIVIRALES CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA A	4
1.3 ENZIMA NEURAMINIDASA DE INFLUENZA A	5
1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL SITIO ACTIVO DE ENZIMAS SIALIDASAS	5
1.5 ANTRAQUINONAS COMO ANTIVIRALES	8
1.6 ÁCIDO CARMÍNICO	10
1.7 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA	11
1.7.1 Acetilación	11
1.7.2 Metilación	13
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivos	15
General	15
Específicos	16
CAPÍTULO II	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 DERIVATIZACIÓN DEL ÁCIDO CARMÍNICO	17
2.1.1 Reacción de acetilación del ácido carmínico	17
2.1.2 Obtención de derivados metil-acetilados	18
2.1.3 Visualización de derivados	18
2.1.4 Purificación del crudo acetilado	19
2.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	19
2.2.1 Caracterización por Espectrometría de Masas	19

2.2.2 Caracterización por FTIR.....	19
2.2.3 Caracterización por RMN	20
2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-SIALIDASA DE DERIVADOS ACETILADOS Y METIL-ACETILADOS DE ÁCIDO CARMÍNICO	20
2.4 ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	21
2.4.1 Calibración del método de acoplamiento molecular	21
2.4.2 Acoplamiento molecular	22
CAPÍTULO III.....	23
RESULTADOS	23
3.1 OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDO CARMÍNICO	23
3.1.1 Obtención de derivados acetilados.....	23
3.1.2 Obtención de derivados metil-acetilados de ácido carmínico.....	23
3.1.3 Purificación del crudo acetilado.....	23
3.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	24
3.2.1 Caracterización por Espectrometría de masas	24
3.2.1.1 Crudo acetilado ACV	24
3.2.1.2 Muestra AC.C	26
3.2.2 Caracterización por FTIR.....	27
3.2.2.1 Derivados metilados	27
3.2.3 Caracterización por RMN	28
3.2.3.1 Derivados acetilados.....	28
3.2.3.2 Derivados metilados	32
3.2.3.3 Derivados metil-acetilados.....	34
3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-SIALIDASA DE DERIVADOS ACETILADOS Y METIL-ACETILADOS DE ÁCIDO CARMÍNICO	35
3.4 ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	37
3.4.1 Calibración del método y acoplamiento molecular.....	37
CAPÍTULO IV	42
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	42
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	42
4.2 CONCLUSIONES.....	44
4.3 PERSPECTIVAS	44
ANEXOS.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

Listado de abreviaturas

μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
δ	Desplazamiento químico
AcOEt	Acetato de etilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AC	Ácido carmínico
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido siálico
BNA	Neuraminidasa Bacteriana (Bacterial Neuraminidase)
°C	Grados Celsius
CCD	Cromatografía en capa delgada
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
Csp ^x	Carbono con hibridación sp ^x
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
HA	Hemaglutinina
HCl	Ácido clorhídrico
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IS	Índice de selectividad
^x J _{CH}	Acoplamiento de carbono e hidrógeno a múltiples enlaces
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio

MCNC	Máxima concentración no citotóxica
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitro
NA	Neuraminidasa
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio anhidro
OMS	Organización Mundial de la Salud
R _f	Factor de retención en CCD
R _p	Rendimiento práctico
R _t	Rendimiento teórico
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
SAR	Relación estructura-actividad (Structure-activity relationship)
SARS-CoV-2	Cepa de coronavirus
TA	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
VIA	Virus de influenza A

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Antraquinonas con actividad anti-influenza A.	9
Tabla 2 Datos espectroscópicos de RMN-¹H de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico	29
Tabla 3 Datos espectroscópicos de RMN-¹³C de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico	29
Tabla 4 Datos espectroscópicos de RMN-¹H de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico	33
Tabla 5 Datos espectroscópicos de RMN-¹³C de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico	33
Tabla 6 Datos espectroscópicos de RMN-¹³C de crudo acetilado y compuestos de referencia ácido carmínico y ácido carmínico metil-acetilado	34
Tabla 7 Actividad inhibitoria media de las muestras evaluadas	36
Tabla 8 Resultado de la simulación de acoplamiento molecular y la interacción entre el sitio de unión de NA y los ligandos.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura esquemática del virus de influenza A. (Adaptado de referencia (Su et al. 2017)	3
Figura 2 Interacciones entre la neuraminidasa bacteriana y el ligando ácido siálico. (PDB ID: 2BF6).....	6
Figura 3 Interacciones entre la neuraminidasa viral y el ligando oseltamivir. (PDB ID: 2HU0)	6
Figura 4 Estructura química del ácido carmínico (ChemDraw).....	10
Figura 5 Reacción general de acetilación de fenoles (Solomons and Fryhle, 2011).	12
Figura 6 Reacción general de acetilación de la glucosa (Solomons and Fryhle, 2011).	12
Figura 7 Mecanismo general de acetilación de alcoholes y fenoles utilizando anhídrido acético (ChemDraw).	12
Figura 8 Mecanismo de metilación de ácidos carboxílicos con yoduro de metilo. (ChemDraw)	14
Figura 9 A) Síntesis de Williamson. B) Mecanismo de reacción de la síntesis de Williamson utilizando óxido de plata. (ChemDraw).....	14
Figura 10 Reacción general de acetilación de ácido carmínico.....	17
Figura 11 Reacción general de metilación de ácido carmínico.	18
Figura 12 Cromatofolios obtenidos de la separación por placa preparativa del crudo acetilado ACI. A) Cromatofolio resultante de separar 14,3 mg de crudo acetilado; B) Cromatofolio resultante de separar 13,5 mg de crudo acetilado. Fase móvil AcOEt:MeOH (8:2).	24
Figura 13 Espectro de masas de iones moleculares de la muestra acetilada ACV.	25
Figura 14 Espectro de masas de iones moleculares de la muestra acetilada AC.C.....	26
Figura 15 Espectro FTIR de crudo metilado de ácido carmínico.....	27
Figura 16 Estructura de ácido carmínico totalmente acetilado.	28
Figura 17 Estructura química de las muestras evaluadas en el ensayo enzimático de actividad anti-sialidasa. A) Crudo metil-acetilado M-Ac, B) Crudo acetilado ACV, C) muestra AC.C y D) quercetina.	35
Figura 18 Curvas de dosis-respuesta de A) crudo metil-acetilado, B) crudo acetilado, C) Muestra AC.C y D) quercetina.	37
Figura 19 Interacciones de una de las conformaciones del acoplamiento entre el ácido siálico y la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i>	38
Figura 20 Interacciones de una de las conformaciones del acoplamiento entre el oseltamivir y la N1 de influenza A.....	38
Figura 21 Superposición de la pose cristalográfica con las cinco mejores conformaciones del acoplamiento entre el ácido siálico y la enzima bacteriana.	39
Figura 22 Superposición de la pose cristalográfica con las cinco mejores conformaciones del acoplamiento entre el oseltamivir y la N1 de influenza A.	39
Figura 23 Interacciones de la NA viral con el derivado 3-AC.....	40
Figura 24 Interacciones de la NA viral con el derivado 6-AC.....	40
Figura 25 Representación en superficie de la NA viral con ligando 3-AC en su sitio catalítico.....	41

Figura 26 Representación en superficie de la NA viral con ligando 6-AC en su sitio catalítico.....	41
Figura 27 Reacción enzimática entre la enzima neuraminidasa y el sustrato MUNANA. ..	43

RESUMEN

La influenza A es un virus pandémico que afecta a gran parte de la población mundial, y causa, además, incontables pérdidas económicas. Por ello se hace muy necesario desarrollar nuevos fármacos que inhiban el virus de influenza A. Una de las dianas terapéuticas más empleadas para el diseño de antivirales contra la influenza A es la neuraminidasa, debido a su importante rol en la liberación de la progenie viral. Recientemente se han reportado antraquinonas con actividad contra varias cepas de este virus. Además, también se ha descrito la relación estructura-actividad de antraquinonas, indicando que la presencia de una unidad de glucosa tetraacetilada incrementa la actividad antiviral del compuesto. El ácido carmínico es una hidroxiantraquinona 7-C-glicosilada, ampliamente utilizado como colorante alimentario, textil y en la industria farmacéutica y cosmética. Por su estructura, este compuesto puede servir de base para obtener moléculas activas contra el virus de influenza A. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad anti-sialidasa de los derivados acetilados y metil-acetilados del ácido carmínico.

Se llevaron a cabo reacciones de acetilación y metilación para obtener los crudos acetilados y metil-acetilados de ácido carmínico. El crudo acetilado se purificó por cromatografía en placa preparativa. La evaluación de la actividad anti-sialidasa se realizó empleando el ensayo enzimático con MUNANA y la neuraminidasa bacteriana de *Clostridium perfringens*.

La caracterización por espectrometría de masas y RMN indica que el compuesto mayoritario del crudo acetilado contiene la glucosa tetraacetilada y grupos acetilo en posiciones 3 y 6; y el crudo metil-acetilado presenta grupos metilo en posiciones 3, 6 y el ácido carboxílico, y acetilos en la glucosa. La muestra AC.C, purificada por cromatografía en placa preparativa, mostró la mejor actividad, con un CI_{50} de 22.29 $\mu\text{g/mL}$. Dos posibles derivados de la muestra AC.C 3-AC y 6-AC se emplearon para el estudio de acoplamiento contra NA. El estudio mostró que ambas moléculas tienen un modo de unión diferente, pero el gran número de contactos con residuos clave de la enzima explica la actividad que presentan.

ABSTRACT

Influenza A is a pandemic virus that affects a large part of the world's population, and also causes countless economic losses. For this reason, it is very necessary to develop new drugs that inhibit the influenza A virus. One of the most widely used therapeutic targets for the design of antivirals against influenza A is neuraminidase protein, due to its important role in the release of viral progeny. Anthraquinones with activity against various strains of this virus have recently been reported. Furthermore, the structure-activity relationship of anthraquinones has also been described, indicating that the presence of a tetraacetylated glucose unit increases the antiviral activity of the compound. Carminic acid is a 7-C-glycosylated hydroxyanthraquinone, widely used as a food coloring, textile and in the pharmaceutical and cosmetic industry. Due to its structure, this compound can be used as the basis for obtaining active molecules against influenza A virus. The objective of this work is to evaluate the anti-sialidase activity of acetylated and methyl-acetylated derivatives of carminic acid.

Acetylation and methylation reactions were carried out to obtain the acetylated and methyl-acetylated crudes of carminic acid. The acetylated crude was purified by preparative layer chromatography. The evaluation of the anti-sialidase activity was carried out using the enzymatic assay with MUNANA and the bacterial neuraminidase of *Clostridium perfringens*.

The characterization by mass spectrometry and NMR indicates that the majority compound of the acetylated crude contains the tetraacetylated glucose and acetyl groups in positions 3 and 6; and the crude methyl-acetylated has methyl groups in positions 3, 6 and the carboxylic acid, and acetyl groups in the glucose unit. The AC.C sample, purified by preparative layer chromatography, showed the best activity, with an IC_{50} of 22.29 $\mu\text{g/mL}$. Two possible derivatives of the AC.C sample, 3-AC and 6-AC were used for the docking study against NA. The study showed that both molecules have a different binding mode, but the large number of contacts with key enzyme residues explains their activity.

INTRODUCCIÓN

Los virus respiratorios son objeto de numerosos estudios debido a su impacto sobre la salud humana. En la última década, virus pandémicos como los de influenza A y SARS-CoV-2 han provocado cuantiosas pérdidas humanas y económicas a nivel mundial. Esta crítica situación resalta la importancia y la necesidad de explorar nuevas formas de tratamiento contra estos padecimientos, que permitan el desarrollo de alternativas farmacológicas.

El virus de influenza, al igual que el SARS-CoV-2, es un patógeno altamente contagioso. Ha sido el agente causante de tres grandes pandemias en el último siglo: la gripe española de 1918 (H1N1), la gripe asiática de 1957 (H2N2) y la gripe de Hong Kong de 1968 (H3N2) (Cox and Subbarao, 2000). En 1997, el virus de la influenza altamente patógena H5N1 despertó la preocupación del público a nivel mundial debido a sus altas tasas de morbilidad y mortalidad (Kaplan and Webby, 2013).

En abril de 2009, una nueva cepa de gripe porcina H1N1 provocó un gran pánico social, debido a su rápida propagación a través de la transmisión de persona a persona (Dawood et al., 2009). México, uno de los países de origen del virus, vio un golpe de 0.7 por ciento de su Producto Interno Bruto, equivalente a 57 mil millones de pesos, según datos de la Secretaría de Salud en 2009 (Secretaría de Salud and Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010).

Además, en 2013, la aparición de un virus de la influenza aviar H7N9 en China provocó una enfermedad inaparente en la vida silvestre y las aves de corral, pero una enfermedad respiratoria grave en los seres humanos. Con respecto al H7N9, en septiembre de 2018, 1567 personas estaban infectadas con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 40% (Li et al., 2020).

Algunas proteínas del virus de influenza A se han utilizado como dianas terapéuticas para el diseño de antivirales. Entre ellas se destaca la neuraminidasa (NA), por su importante rol en el ciclo de replicación viral de la influenza. Esta facilita la liberación del virión al escindir los residuos de ácido siálico terminales entre la hemaglutinina y la célula huésped (Yang et al., 2016).

Entre los cuatro inhibidores de NA existentes, el oseltamivir (Tamiflu®) (McClellan and Perry, 2001) y el zanamivir (Relenza®) (Dunn and Goa, 1999) están disponibles en el mercado mundial desde la temporada de influenza 1999-2000. Además, el peramivir

(Rapivab®) ha sido aprobado para el tratamiento de la influenza en adultos y niños en Japón, Corea del Sur y China (Alame et al., 2016) y el octanoato de laninamivir (Inavir®) en Japón (Hideyuki and Naoki, 2011). Entre los medicamentos aprobados, el fosfato de oseltamivir es el único inhibidor oral de neuraminidasa con las ventajas de alta eficacia, baja toxicidad y alta biodisponibilidad. Desafortunadamente, han surgido varias cepas resistentes al oseltamivir, que han limitado gravemente la aplicación clínica de Tamiflu (Samson et al., 2013). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de búsqueda y/o desarrollo de nuevos fármacos antivirales.

Los productos naturales constituyen una incalculable fuente de fármacos, dada su gran variedad y potencial actividad biológica. Entre los compuestos reportados con actividad anti-influenza se encuentran las antraquinonas, como las que se extraen de la planta *Aloe vera* (Borges Argáez et al., 2019). Además del *Aloe*, existen otras fuentes naturales de antraquinonas, que pueden encontrarse tanto en los líquenes, microorganismos, como en insectos. El ácido carmínico es una antraquinona C-glicosilada que se extrae principalmente del insecto *Dactylopius coccus*, también conocido como cochinilla. El uso más difundido de este compuesto es como colorante de alimentos y cosméticos. Algunos estudios han mostrado la bioactividad del ácido carmínico, aunque poco se conoce al respecto. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad anti-sialidasa de los derivados acetilados y metil-acetilados del ácido carmínico.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 VIRUS DE LA INFLUENZA. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El virus de influenza, pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, su genoma consiste en ocho segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo. La familia *Orthomyxoviridae* se divide además en cinco géneros, de los cuales los virus de influenza A, B y C, son los más representativos. Los virus de influenza B y C solo infectan humanos, causando enfermedades respiratorias. El virus de influenza A (VIA) puede infectar tanto humanos como una gran variedad de animales, por lo que posee un alto riesgo de infección zoonótica, cambio de huésped y la generación de virus pandémicos (Forrest and Webster, 2010; Szewczyk et al., 2014). Recientemente se aisló de cerdos y vacas un nuevo tipo, nombrado influenza D (Su et al., 2017).

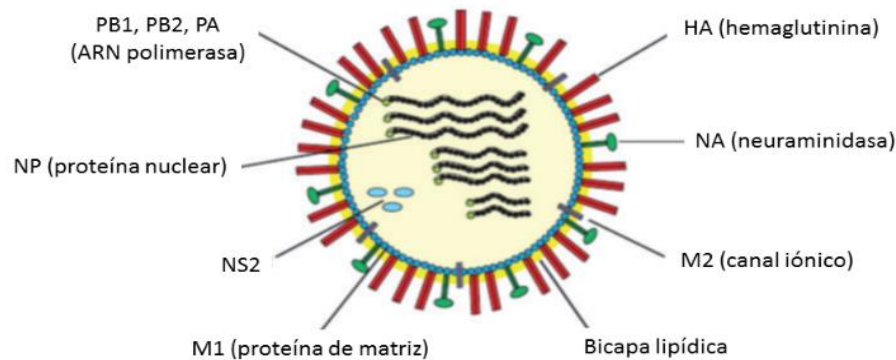


Figura 1 Estructura esquemática del virus de influenza A. (Adaptado de referencia (Su et al. 2017))

El genoma del VIA codifica a las proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), M1 proteína de matriz (M1), M2 proteína de canal iónico (M2), proteína nuclear (NP), proteínas no estructurales (NS1, NS2 o NEP), y el complejo de ARN polimerasas (PB1, PB2, PA) (Figura 1) (Forrest and Webster, 2010; Shao et al., 2017). El VIA se divide según sus glicoproteínas de membrana, en 18 subtipos de HA y 11 de NA. Algunas especies de animales pueden actuar como hospederos de varios subtipos; sin embargo, solo los subtipos H1N1, H3N2 y H5N1 pueden infectar humanos (De Vlugt et al., 2018).

El VIA puede evadir el sistema inmune a través de dos mecanismos fundamentales: *deriva* y *cambio antigénico*. La *deriva antigénica* se refiere a mutaciones puntuales en proteínas como HA y/o NA. Como consecuencia de dichas mutaciones, el sistema inmunitario no

puede identificar las variantes de virus recientemente cambiadas y el patrón de reconocimiento de la interacción antígeno-anticuerpo ya no es completamente funcional. Estas mutaciones ocurren debido a errores en la copia del genoma por parte de la polimerasa viral, y la selección de aquellos mutantes con cambios en los sitios antigénicos que permiten escapar de la neutralización (Carrat and Flahault, 2007; Shao et al., 2017). El *cambio antigénico* se produce por la reorganización de segmentos de genes virales dentro de una misma célula infectada con dos variantes genómicas diferentes del VIA. Después del intercambio de segmentos genómicos, se pueden establecer nuevas cepas con propiedades drásticamente cambiadas en la población, y pueden dar lugar a pandemias (Carrat and Flahault, 2007; Landolt and Olsen, 2007; Shao et al., 2017).

1.2 ANTIVIRALES CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA A

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 (Krammer and Palese, 2015). 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. 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; Principi 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% (Pizzorno et al., 2019).

1.3 ENZIMA NEURAMINIDASA DE INFLUENZA A

La neuraminidasa del virus de influenza es una de las principales glicoproteínas de superficie presente en influenza A y B. Esta enzima fue identificada como sialidasa o neuraminidasa desde 1958 por Alfred Gottschalk, debido a que el producto liberado era el ácido N-acetilneuramínico (Gottschalk, 1958). Las enzimas sialidasas son glicosidasas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -glicosídicos que unen residuos de ácido siálico con sacáridos de glicoproteínas y glicolípidos (Varki and Gagneux, 2012).

La NA viral es responsable de catalizar la escisión del enlace α 2-6 o α 2-3 que existe entre un ácido siálico (AS) terminal y un residuo de azúcar adyacente. La ruptura de este enlace de AS tiene varios efectos importantes que facilitan la propagación del virus en el tracto respiratorio. Primero, permite el transporte del virus a través de la mucina y destruye el receptor HA en la célula huésped, permitiendo así la liberación de la progenie viral de las células infectadas (Ohuchi et al., 2006). En segundo lugar, es necesaria la eliminación de AS del resto de carbohidratos de HA y NA recién sintetizados para prevenir la autoagregación del virus después de la liberación de las células huésped. En tercer lugar, esta enzima, al escindir los AS que se encuentran en el moco del tracto respiratorio, puede prevenir la inactivación viral y promover la penetración viral en las células epiteliales respiratorias (Gong et al., 2007).

1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL SITIO ACTIVO DE ENZIMAS SIALIDASAS

Las sialidasas, o neuraminidasas, catalizan la eliminación de los ácidos siálicos terminales de una gran variedad de glicoconjugados y desempeñan un papel importante en la patogénesis, la nutrición bacteriana y las interacciones celulares. Numerosas estructuras cristalinas de exo-sialidasas están disponibles en bacterias, virus, tripanosomas, sanguijuelas y el hombre. Todas las sialidasas comparten el mismo plegamiento de hélice de seis aspas en sus dominios catalíticos, y conservan aminoácidos catalíticos clave (Newstead et al., 2008).

Estudios sobre varias sialidasas bacterianas han revelado una superfamilia de enzimas multidominio construidas alrededor del dominio catalítico canónico de plegamiento β

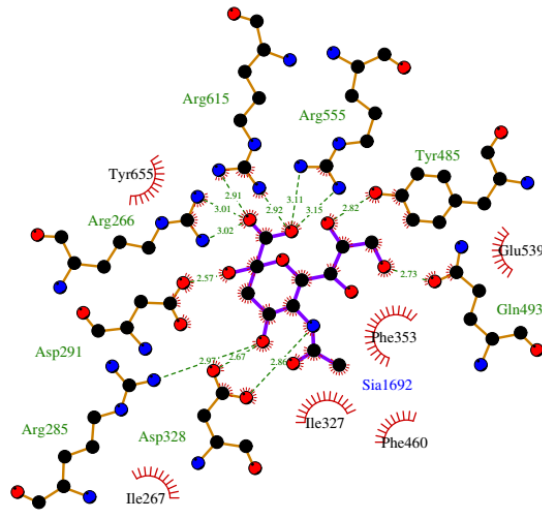


Figura 2 Interacciones entre la neuraminidasa bacteriana y el ligando ácido siálico. (PDB ID: 2BF6)

La representación fue generada por el programa LigPlot+. Los aminoácidos de la enzima que interactúan con el ligando por enlace de hidrógeno están representados con el modelo de bolas y barras; las líneas discontinuas de color verde representan los enlaces de hidrógeno, con distancias incluidas; los arcos con rayos representan los aminoácidos de la enzima con contactos hidrofóbicos con el ligando. Leyenda de colores por átomo: oxígeno en rojo, nitrógeno en azul, carbono en negro. Ligandos representados con barras color violeta, enzima representada con barras café.

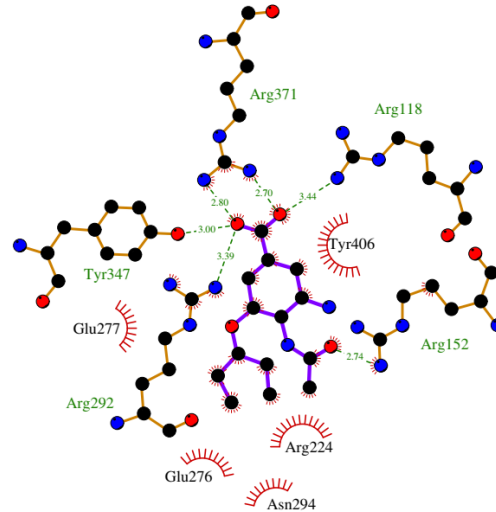


Figura 3 Interacciones entre la neuraminidasa viral y el ligando oseltamivir. (PDB ID: 2HU0)

(Taylor, 1996). Las sialidasas bacterianas comparten poca identidad de secuencia entre sí, típicamente 30%, pero contienen dos motivos de secuencia conservados: el primero es el motivo RIP/RLP (Arg-Ile/Leu-Pro); el segundo, es la caja-Asp (Ser/Thr-X-Asp-[X]-Gly-X-Thr-Trp/Phe; donde X representa cualquier aminoácido), que puede presentarse varias veces a lo largo de la cadena (Roggentin et al., 1989).

Los estudios estructurales sobre enzimas de los subtipos N1, N2, N4, N5, N8 y N9 del virus de la influenza A, han revelado una estructura que está bien conservada, a pesar de la baja similitud en el alineamiento de las secuencias. No obstante, el sitio activo está muy conservado y presenta un centro catalítico rígido (Selvaraj et al., 2020).

A pesar de que la similitud entre las secuencias de neuraminidasas virales y bacterianas no es muy elevada, la topología del dominio catalítico se conserva y los sitios activos comparten muchas características comunes. El motivo RIP/RLP de las neuraminidasas bacterianas contiene una de las argininas que interactúan con el grupo carboxilato de ácido siálico. En cambio, la neuraminidasa del virus de la influenza no posee cajas-Asp, pero tienen un motivo REP análogo al motivo RIP (Taylor, 1996).

El sitio activo de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* está compuesto por numerosos residuos clave que se muestran en la Figura 2. Estos incluyen un grupo tri-arginal (Arg266, Arg555 y Arg615) que interactúa con el grupo carboxilato del ácido siálico. La posición de la primera arginina (Arg266) se estabiliza mediante un ácido glutámico conservado (Glu671). Una característica conservada de los sitios activos de sialidasa es el catalizador ácido/básico, Asp291. Todos los sitios activos de sialidasa tienen un bolsillo hidrofóbico para acomodar el grupo N-acetilo del sustrato, pero los residuos exactos que forman este bolsillo generalmente no se conservan. En este caso, el bolsillo está formado por cadenas laterales en su mayoría aromáticas: Phe347, Phe353, Phe460, Thr345, Ile327 y finalmente Trp354 que forma una tapa en el bolsillo hidrofóbico (Newstead et al., 2008). Además, se observan otros residuos que forman enlace de hidrógeno con zonas polares de la molécula, como Arg285, Asp328, Asp291, Tyr485 y Gln493.

Informes anteriores han identificado numerosos residuos críticos que forman el sitio activo de la enzima NA de influenza y su marco circundante. Estos residuos son Arg 118, Glu 119, Asp 151, Arg 152, Asp198, Ile 222, Arg 224, Glu 227, Asp 243, His 274, Glu276, Glu 277, Arg 292, and Asp 330, Arg 371 (Colman et al., 1983). En el sitio activo de la neuraminidasa N1 de influenza, podemos encontrar tres argininas (Arg118, Arg292 y Arg371) que forman enlace de hidrógeno con el grupo carboxilato del oseltamivir (Figura 3), al igual que en el sitio catalítico de la neuraminidasa bacteriana. Reportes de Air y col. muestran dichas argininas de la N9 de influenza A interactuando con el grupo carboxilo del ligando DANA (ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico) (Air, 2012). Además, se observan interacciones hidrofóbicas con residuos Arg224, Glu276, Glu277, Asn294 y Tyr406.

Lo anterior implica que el sitio activo de las proteínas NA comparten características comunes. La tríada de argininas es una de estas similitudes, que provoca que el resto carboxilo de AS se oriente en esa dirección. De esta forma, el grupo N-acetilo queda en dirección al bolsillo hidrofobo, conformado por aminoácidos variables según la enzima en cuestión. Otro rasgo es el par de nucleófilos Tyr/Glu y Asp, que actúan como catalizador ácido/base. El residuo de tirosina actúa como un nucleófilo catalítico activado por el residuo de ácido glutámico próximo.

La NA desempeña un papel importante en la propagación del virus de la influenza (Air, 2012). Además, los residuos de aminoácidos del sitio activo que interactúan directamente con el sustrato se conservan considerablemente en diferentes virus de influenza tipos A y

B (Gong et al., 2007; Ohuchi et al., 2006). Por estas razones se considera a la neuraminidasa como una diana terapéutica de gran relevancia.

1.5 ANTRAQUINONAS COMO ANTIVIRALES

Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales. Las antraquinonas naturales se encuentran libres y/o en combinaciones glicosídicas. Pueden hallarse en la corteza y raíz de diversos géneros y especies de las familias *Rubiáceas*, *Rhamnáceas*, *Poligonáceas*, *Leguminosas*, *Escrofulariáceas*, *Liliáceas* y *Verbenáceas*, en los líquenes, hongos, y en los insectos tintóreos de la familia de los *Cóccidos* (Gibaja Oviedo, 1998).

Hace algunos años, Shih-Wen Li et al. (2014), evaluaron la actividad contra el virus de influenza A de las antraquinonas aloe-emodina, emodina y crisofanol. De estas tres, aloe-emodina (Tabla 1) mostró un CI_{50} de $1.35 \pm 0.05 \mu\text{M}$. A esto se suma un índice de selectividad mayor que 10, indicando la eficacia de aloe-emodina en su actividad contra el virus (Li et al., 2014).

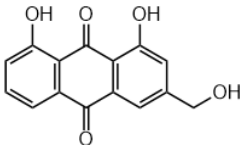
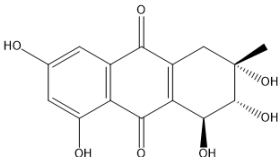
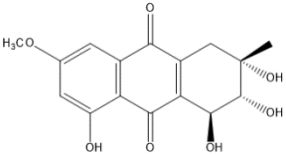
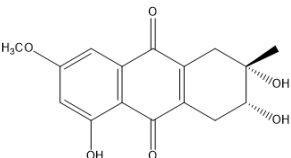
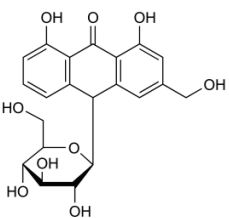
Estudios publicados por Zhang et al. (2016) muestran hidroxiantraquinonas aisladas de *Nigrospora sp.*, con actividad contra el virus de influenza A(H1N1). Un ensayo de reducción del efecto citopático reveló que estos derivados (Compuestos 1, 2 y 3, Tabla 1) inhiben significativamente esta cepa del virus con CI_{50} menor de $10 \mu\text{M}$ (Zhang et al., 2016).

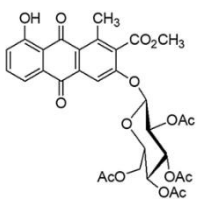
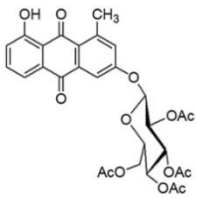
Aloína (Tabla 1) es una antrona C-glicosilada en C10, que posee gran estabilidad frente a reacciones de hidrólisis del bloque glucosídico. En 2019, Huang y colaboradores evaluaron la actividad anti influenza A de este compuesto, obteniendo resultados satisfactorios. Sus resultados mostraron que la aloína redujo significativamente la infección *in vitro* de todas las cepas analizadas del virus de influenza, incluidos los virus de la influenza A (H1N1) pdm09 resistentes a oseltamivir, con un CI_{50} promedio de $91.83 \pm 18.97 \mu\text{M}$. Los ensayos *in vivo* mostraron una reducción de la infección en ratones y un incremento en la supervivencia. Un ensayo de inhibición de neuraminidasa basado en MUNANA mostró que $100 \mu\text{M}$ de aloína reducen al 90 % la actividad enzimática de NA. Sin embargo, aloína no mostró actividad contra la hemaglutinina del virus (Huang et al., 2019).

Recientemente, Borges et al. (2019) realizaron un estudio de Relación estructura-actividad (SAR, siglas en inglés) donde reportaron dos antraquinonas derivadas de aloesaponarina I y II, con potencial actividad anti-influenza A (Tabla 1). Basados en el análisis SAR, concluyeron que el residuo de glucosa tetraacetilada en posición 3 de los compuestos 5 y 7 puede tener un rol importante para la actividad antiviral que manifiestan los compuestos

a nivel postratamiento. Esta actividad no se debe exclusivamente al residuo de glucosa tetraacetilada, la cual no mostró inhibición del virus. Además, la polaridad de los sustituyentes de la glucosa es significativa, ya que las antraquinonas O-glicosiladas no mostraron actividad, a diferencia de los compuestos 5 y 7 con el residuo de glucosa tetraacetilada (Borges Argáez et al., 2019).

Tabla 1 Antraquinonas con actividad anti-influenza A.

Nombre o código	Estructura	Cl ₅₀	Referencia
Aloe-emodina		1.35 μM	Li, 2014
6-O-demethyl-4-dehydroxyaltersolanol A (Compuesto 1)		2.59 μM Cepa PR8 de H1N1	Zhang, 2016
4-dehydroxyaltersolanol A (Compuesto 2)		8.35 μM Cepa PR8 de H1N1	Zhang, 2016
altersolanol B (Compuesto 3)		7.82 μM Cepa PR8 de H1N1	Zhang, 2016
Aloína		91.83 μM Cepas: PR8 y WSN de H1N1, 3446 de H3N2, 70,555 de influenza B, 126 A(H1N1)pdm09 sensible a oseltamivir, 066 A(H1N1)pdm09	Huang, 2019

		resistente a oseltamivir	
Compuesto 5		30.77 μM Cepa A/Yucatán/2370/09 62.28 μM Cepa A/México/InDRE797/10	Borges, 2019
Compuesto 7		13.70 μM Cepa A/Yucatán/2370/09 19.47 μM Cepa A/México/InDRE797/10	Borges, 2019

1.6 ÁCIDO CARMÍNICO

El ácido carmínico (Figura 4) es una antraquinona 7-C-glicosilada que se extrae fundamentalmente de la cochinilla (*Dactylopius coccus*) u otros insectos de la familia *Coccidae*. Algunos estudios sobre la posible función biológica de este compuesto indican que es un potente elemento disuasorio para las hormigas, como la *Monomorium destructor*. Esta disuasión puede ser indicativa de la función natural del compuesto, que puede haber evolucionado en las cochinillas como un arma química contra la depredación. Incluso, algunos depredadores de este insecto, como *Laetilia coccidivora*, utilizan el ácido carmínico ingerido como defensa contra sus propios predadores (Eisner and Nowicki, 1980).

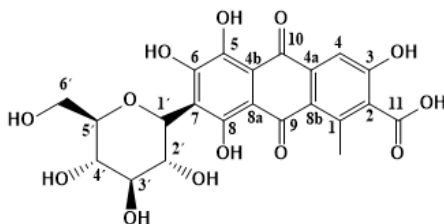


Figura 4 Estructura química del ácido carmínico (ChemDraw).

Este compuesto se utiliza ampliamente como colorante en las industrias alimentaria, textil, farmacéutica y cosmética. La coloración roja se le atribuye a la formación de quelatos con cationes metálicos como Al^{3+} y Ca^{2+} . Esta coloración puede variar dependiendo del catión metálico acomplejado (Color Index, 1971; Gibaja Oviedo, 1998).

Sin embargo, las investigaciones acerca de su actividad biológica son escasos y poco concluyentes. Algunos estudios indican que posee actividad anticancerígena en sarcoma de Jensen en ratas (Mihail and Craciun, 1970), sin embargo, no se comprobó que su mecanismo de acción fuese por unión covalente con el ADN (Lown et al., 1979). Otras investigaciones revelan que el ácido carmínico potencia la actividad antiviral de polirribonucleótidos (AU). Este estudio se llevó a cabo mediante un bioensayo del virus de la estomatitis vesicular fibroblástica del prepucio humano. Por otra parte, cada uno por separado, poli-r(A-U) o ácido carmínico, no fueron agentes antivirales efectivos frente a este virus (Jamison et al., 1988, 1990; Krabill et al., 1993).

La eficacia de una vacuna se puede mejorar mediante la adición de adyuvantes. Recientemente en un estudio, a finales de 2019, se identificaron 41 aditivos alimentarios que exhibían un efecto adyuvante en ratones cuando se usaban con las vacunas trivalente y tetravalente contra la HA de influenza. Entre estos compuestos se encontró al ácido carmínico, el cual provocó una completa respuesta protectora en ratones cuando estos se inmunizaron con la vacuna (Feng et al., 2019).

1.7 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA

El ácido carmínico está constituido por una parte quinónica (antraquinona) a la que está unido en posición 7 un azúcar monosacárido glucosa. Los monosacáridos se comportan generalmente como alcoholes simples. Los grupos hidroxilo de los carbohidratos pueden convertirse en ésteres y éteres, los que son más fáciles de trabajar que los azúcares libres.

1.7.1 Acetilación

Las reacciones de acetilación-desacetilación son de gran importancia en el organismo. Estas se producen generalmente por la acción de enzimas acetiltransferasas como la acetil-CoA, y las acetilesterasas. Estas reacciones regulan un sinnúmero de procesos metabólicos, como la acetilación de histonas, que regula la expresión génica en las células.

En muchos metabolitos secundarios se encuentran con frecuencia grupos acetilo, cuya función está relacionada con el reconocimiento de receptores proteicos. Por ejemplo, la actividad sialidasa de la neuraminidasa de los virus de influenza se debe a su capacidad de reconocer enlace α -2,3-N-acetilneuramínico; sin embargo, existen algunas variantes de ácido siálico O-acetilado en posiciones 4, 7 ó 9, que reducen la capacidad de sialidasas de romper dicho enlace (Wasik et al., 2016).

Químicamente se pueden obtener productos acetilados a partir de alcoholes y fenoles, mediante una reacción de esterificación. Los compuestos fenólicos, quinonas e

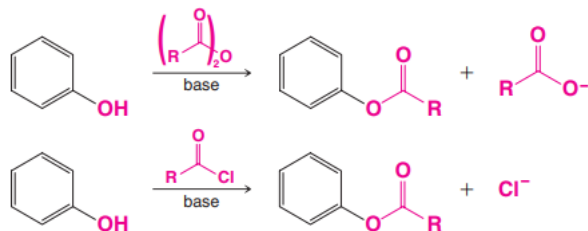


Figura 5 Reacción general de acetilación de fenoles (Solomons and Fryhle, 2011).

hidroxiantraquinonas, pueden reaccionar con anhídrido acético o cloruros de acilo en presencia de bases para formar ésteres (Figura 5). Esta reacción ocurre de forma similar a la de los alcoholes (Solomons and Fryhle, 2011).

El tratamiento de monosacáridos con anhídrido acético y una base débil como piridina o acetato de sodio, transforma todos los grupos hidroxilo en grupos éster, incluyendo el carbono anomérico (Figura 6) (McMurry, 2012; Wade and Simek, 2016; Solomons and Fryhle, 2011).

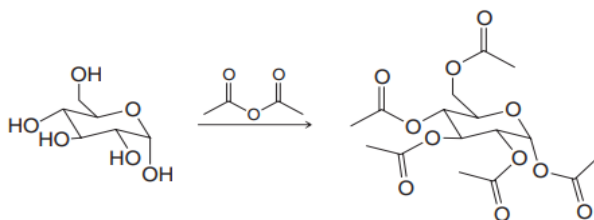


Figura 6 Reacción general de acetilación de la glucosa (Solomons and Fryhle, 2011).

El mecanismo mediante el cual ocurre la acetilación de alcoholes y fenoles se muestra en la Figura 7.

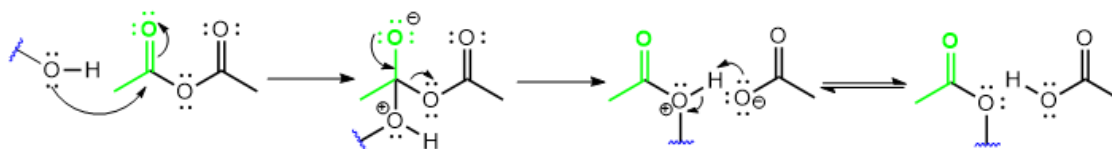


Figura 7 Mecanismo general de acetilación de alcoholes y fenoles utilizando anhídrido acético (ChemDraw).

1.7.2 Metilación

Los compuestos O-metilados son de importancia farmacocinética debido a que llegan a ser más resistentes al metabolismo hepático y muestran un alto grado de absorción intestinal. Algunos estudios han demostrado que estos compuestos

pueden ser más bioactivos que sus derivados hidroxilados (Bernini et al., 2011).

La metilación de compuestos fenólicos ocurre en las rutas biosintéticas de las plantas, microorganismos y mamíferos a través de enzimas O-metil transferasas. Químicamente la reacción se lleva a cabo mediante agentes alquilantes como diazometano, sulfato de dimetilo, yoduro de metilo y carbonato de dimetilo (Bernini et al., 2011; Lamoureux and Agüero, 2009). Los agentes alquilantes pueden dividirse en tres categorías dependiendo de las condiciones de reacción; básica, neutral o ácida. En condiciones básicas el agente alquilante actúa como electrófilo; en condiciones neutras existen diferentes posibilidades de mecanismo de acción, donde el agente alquilante actúa primero como una base formando especies activas que rápidamente continúan con la alquilación; finalmente, en medio ácido actúa como nucleófilo. La metilación en condiciones básicas o neutras generalmente es irreversible, más selectiva y puede proporcionar altos rendimientos de reacción (Lamoureux and Agüero, 2009).

La reacción de metilación utilizando sulfato de dimetilo como agente alquilante en condiciones básicas es conocida como metilación de Haworth, no es quimioselectiva ya que puede alquilar ácidos fenólicos, así como fenoles y grupos hidroxilo de sacáridos (Lamoureux and Agüero, 2009).

Los alcoholes reaccionan con diazocompuestos para formar éteres, dando metiléteres. Con diazometano, el método es costoso y requiere mucha precaución, pero las condiciones son suaves y se obtienen altos rendimientos. Este se usa principalmente para metilar alcoholes y fenoles que son caros o están disponibles en pequeñas cantidades. Los compuestos hidroxilados reaccionan mejor a medida que aumenta su acidez; los alcoholes ordinarios no reaccionan en absoluto a menos que esté presente un catalizador, como HBF_4 o gel de sílice. Los fenoles más ácidos reaccionan muy bien en ausencia de un catalizador (Lown et al., 1979; Smith and March, 2006).

Un reactivo muy común y menos costoso que el diazometano es el yoduro de metilo. Este, en presencia de una base y disolvente apropiado, puede funcionar como agente metilante de fenoles y ácidos carboxílicos. La metilación con yoduro de metilo se lleva a cabo generalmente empleando carbonato de potasio como base y acetona o dimetilformamida (Rao et al., 1940; Tatsuzaki et al., 2018). En la Figura 8 se muestra el mecanismo de metilación de ácidos carboxílicos empleando los reactivos antes mencionados. La metilación en medio básico de fenoles ocurre siguiendo el mismo mecanismo.

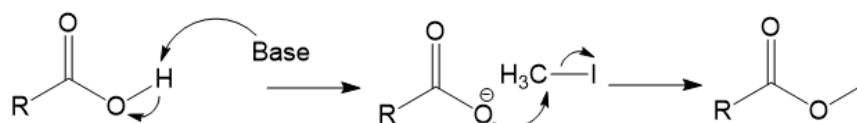


Figura 8 Mecanismo de metilación de ácidos carboxílicos con yoduro de metilo. (ChemDraw)

Los carbohidratos se convierten en éteres mediante el tratamiento con un halogenuro de alquilo en presencia de una base. Esta reacción se conoce como síntesis de Williamson. Las condiciones estándar de la síntesis de Williamson con una base fuerte tienden a degradar los sacáridos, pero empleando una base débil como óxido de plata, se pueden obtener buenos rendimientos (Figura 9) (McMurry, 2012; Wade and Simek, 2016).

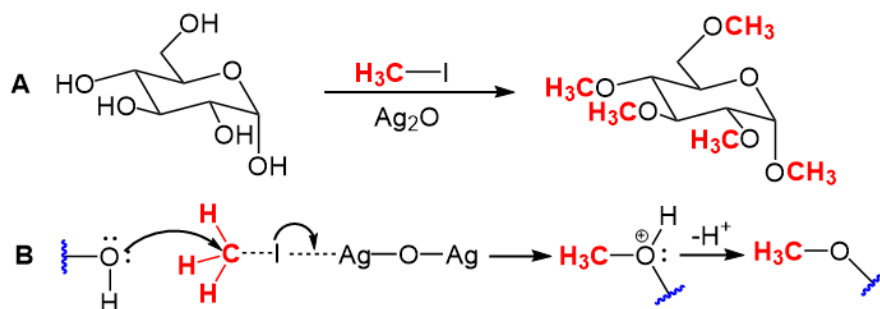


Figura 9 A) Síntesis de Williamson. B) Mecanismo de reacción de la síntesis de Williamson utilizando óxido de plata. (ChemDraw)

Justificación

La influenza continúa teniendo un gran impacto en todo el mundo, causando un considerable sufrimiento humano y pérdidas económicas. La recurrencia regular de las epidemias de influenza es causada por la variabilidad antigénica de las proteínas de superficie de dicho virus. Anualmente se realizan incontables esfuerzos para obtener vacunas o antivirales que mantengan la protección contra el virus. A pesar de esto, la aparición de nuevas variantes resistentes a estas vacunas y antivirales continúa cada año. Es por ello que el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban el virus de influenza A se hace muy necesario.

Recientemente se realizó un estudio de relación estructura-actividad de las antraquinonas aloesaponarina I y II y sus derivados acetilados, metilados y O-glicosilados contra el virus de influenza A. El mismo mostró que el residuo de glucosa tetraacetilada en posición 3 tiene un rol importante para la actividad antiviral; mientras que la glucosa tetraacetilada por sí sola no presenta actividad, y los residuos de glucosa en la antraquinona no son relevantes para la actividad antiviral. De forma análoga se espera que alguno de los derivados acetilados y metilados del ácido carmínico, una hidroxiantraquinona C-glicosilada, presenten actividad anti-influenza; ya que es posible que la derivatización del ácido carmínico provoque un incremento de dicha actividad. La ventaja de emplear una antraquinona C-glicosilada es que este tipo de enlace C-glicosídico no es hidrolizable, lo que hace que estos compuestos presenten una mayor estabilidad y menor posibilidad de degradación frente a enzimas hidrolasas, como la neuraminidasa.

Hipótesis

Los derivados acetilados y metil-acetilados del ácido carmínico poseen actividad anti-sialidasa.

Objetivos

General

Evaluar la actividad anti-sialidasa de derivados acetilados y metil-acetilados de ácido carmínico.

Específicos

Obtener los derivados acetilados y metil-acetilados caracterizados por métodos espectroscópicos.

Evaluar la actividad anti-sialidasa de los derivados químicos de ácido carmínico a partir del ensayo enzimático con MUNANA.

Realizar simulaciones de acoplamiento molecular de derivados activos de ácido carmínico en el sitio catalítico de la enzima NA.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DERIVATIZACIÓN DEL ÁCIDO CARMÍNICO

2.1.1 Reacción de acetilación del ácido carmínico

La reacción de acetilación se lleva a cabo empleando 34 mg (0,061 mmol) de ácido carmínico. Estos se transfieren a un balón de tres bocas de 100 mL, se disuelven en 2 mL de piridina, y 4 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y con agitación a 150 rpm durante 72 horas (Figura 10).

La recuperación de los productos se realiza añadiendo a la mezcla de reacción 50 mL de agua destilada, y se trasvasan a un embudo separador de 500 mL. Se realiza la extracción utilizando tres alícuotas de 50 mL de diclorometano. La capa orgánica se lava sucesivamente con dos alícuotas de 50 mL de HCl al 5%. La disolución resultante se seca con Na₂SO₄ anhidro.

El extracto de diclorometano (150 mL), se concentra y seca a vacío con el empleo de un equipo rotaevaporador. Luego se almacena la muestra seca en viales ámbar y se mantienen en refrigeración a 4 °C.

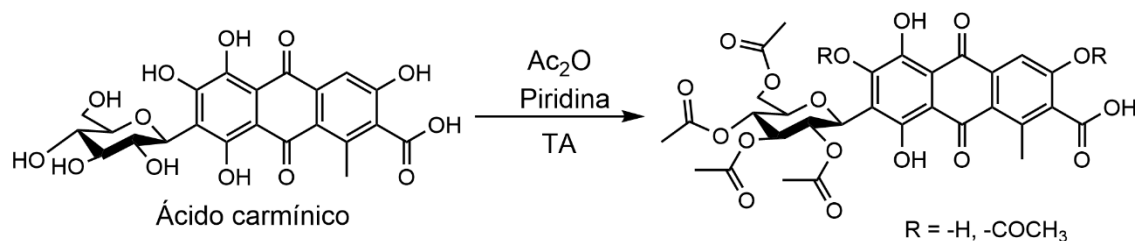


Figura 10 Reacción general de acetilación de ácido carmínico.

Este procedimiento se realiza en varias ocasiones y se obtienen los crudos acetilados ACI, ACII, ACIV y ACV, que se utilizarán posteriormente en procesos de purificación, caracterización estructural y ensayos enzimáticos.

El rendimiento de la reacción se calculó empleando la Ecuación (1), donde Rp es el rendimiento práctico de la reacción, o sea, la masa total de producto obtenida; Rt es el rendimiento teórico de la reacción. Este último se determinó mediante la Ecuación (2), donde m(AC) es la masa de ácido carmínico reaccionante; M(AC) es la masa molecular de ácido carmínico; y M(P) es la masa molecular del producto totalmente acetilado (con ocho grupos acetilo), que es 828 g/mol.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{Rp}{Rt} \times 100; \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$Rt = \frac{m(AC) \times M(P)}{M(AC)}; \quad \text{Ecuación (2)}$$

2.1.2 Obtención de derivados metil-acetilados

La reacción de metilación se llevó a cabo empleando 30 mg de ácido carmínico (0,061 mmol). Estos se transfirieron a un balón de tres bocas de 100 mL y se disolvieron en 8 mL de acetona. Se añadieron al balón 200 mg de K_2CO_3 y 2 mL de CH_3I . La mezcla de reacción se agitó a 200 rpm a temperatura ambiente durante 72 horas (Figura 11). Posterior al inicio de la reacción, se añadieron dos alícuotas de 1 mL de CH_3I , para compensar pérdidas por fotodegradación o evaporación. La recuperación de los productos de reacción consistió en realizar extracciones en 50 mL de agua con tres alícuotas de 50 mL de diclorometano en un embudo separador de 500 mL. La solución se secó empleando sulfato de sodio anhidro. El extracto se concentró en un rotoevaporador.

Posteriormente se realizó la acetilación de la mezcla de derivados metilados, siguiendo el mismo procedimiento empleado en la acetilación del ácido carmínico. Como material de partida se utilizaron 8 mg del crudo metilado obtenido.

2.1.3 Visualización de derivados

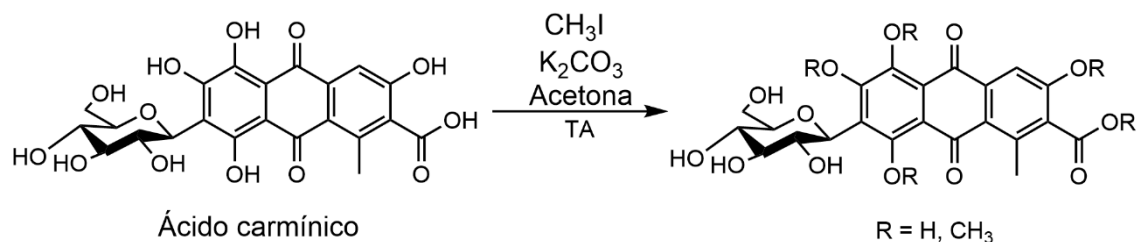


Figura 11 Reacción general de metilación de ácido carmínico.

La visualización de derivados acetilados y metil-acetilados se realizó empleando cromatografía de capa delgada (CCD) de fase normal con soporte de aluminio e indicador de fluorescencia ($F_{254 \text{ nm}}$). El sistema de disolventes empleado fue AcOEt:MeOH (8:2), y un volumen de fase móvil de 10 mL. Se emplearon los reveladores generales de luz UV a 254 nm y 365 nm, y revelador de quinonas de KOH al 5 % en metanol.

El cálculo del factor de retención (R_f) de cada banda observada en CCD se determinó empleando la Ecuación (3).

$$R_f = \frac{(\text{Distancia del origen al centro de la banda})}{(\text{Distancia del origen al frente del disolvente})}; \quad \text{Ecuación (3)}$$

2.1.4 Purificación del crudo acetilado

Para la purificación de los derivados acetilados se realizó Cromatografía preparativa con indicador de fluorescencia $F_{254\text{ nm}}$. Se purificaron 27.8 mg de muestra en dos placas. El sistema de disolventes empleados fue AcOEt:MeOH (8:2). El volumen de fase móvil utilizado fue de 200 mL. Luego de la separación, se seleccionaron tres de las bandas y se cortaron de la placa. Cada banda se trasvasó a Erlenmeyer de 125 mL y se añadieron 5 mL de acetato de etilo a cada uno. Las tres muestras se sonicaron durante 30 minutos. Luego se filtraron a vacío utilizando un filtro HyperSepC18 (Thermo Fisher). Las muestras concentradas se secaron y almacenaron en viales ámbar de 2 mL.

2.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

2.2.1 Caracterización por Espectrometría de Masas

Los espectros de masas se generaron con el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA), equipado con un sistema de ionización HESI-II, fuente de gas configurada a 60, el gas auxiliar a 20, y para el capilar una temperatura de 310 °C y un voltaje de 4 kV en modo positivo. Los solventes empleados fueron de grado espectrometría de masas. Las muestras fueron resuspendidas en metanol y suplementadas con 0.1 % de ácido fórmico. La fragmentación CID (collision energy dissociation) se utilizó para fragmentar los iones con Helio. La resolución en el analizador de masas de Orbitrap para la adquisición de espectros MS fue de 24000, y para los espectros MS/MS, de 12000. La separación cromatográfica se llevó a cabo en la columna Hypersil GOLD aQ (100 x 2.1 mm i.d., 3 μm). Un gradiente de 0.1% de ácido fórmico en agua (solvente A) y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B) fue empleado durante las separaciones cromatográficas con el sistema UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Se empleó un flujo de 0.2 mL/min y un volumen de inyección de 2 μL . El gradiente consistió en la variación de la proporción del solvente B desde 5 % hasta 20 % durante 1 min, y luego hasta 100% en 10 min, se mantuvo en 100% por 0.5 min, después se bajó a 10% en 1 min, y se mantuvo en 10% por 11.7 min. El procesamiento de los espectros se realizó con los programas Xcalibur y MassFrontier.

2.2.2 Caracterización por FTIR

Las fracciones de interés se analizaron mediante Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El equipo empleado fue un equipo marca BRUKER, modelo Tensor II, con un detector ATR de punta de diamante, los datos se colectaron usando un

intervalo de medición de 500-4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 scans en el intervalo de longitud de onda antes especificado. Se realizó una compensación por CO_2 atmosférico para cada espectro y también se realizó una corrección del ángulo del ATR de diamante empleado (estas correcciones las realiza el equipo). Para el tratamiento de datos y obtención de gráficos se empleó el programa OriginPro8.

2.2.3 Caracterización por RMN

Para la caracterización química, se obtienen espectros 1D RMN- ^1H (400 MHz) y RMN- ^{13}C , y espectros bidimensionales HSQC y HMBC (600 MHz) en un espectrómetro VARIAN/AGILENT, modelo 600 MHz AR Premium COMPACT, con un campo magnético de 14,4 T. Se utilizaron como referencias las señales residuales de CDCl_3 (7,26 ppm y 77,00 ppm para ^1H y ^{13}C respectivamente) y CD_3OD (3,35 ppm y 4,78 ppm para ^1H y 49,30 ppm para ^{13}C). Las muestras analizadas por RMN fueron el crudo acetilado disuelto en CDCl_3 , el crudo metil-acetilado disuelto en CDCl_3 y el ácido carmínico disuelto en CD_3OD como referencia.

2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-SIALIDASA DE DERIVADOS ACETILADOS Y METIL-ACETILADOS DE ÁCIDO CARMÍNICO

El ensayo de actividad anti-sialidasa se realizó empleando la metodología publicada por Uddin y col. (Uddin et al., 2016), con modificaciones. El método utilizado fue el ensayo de fluorescencia con MUNANA. El sustrato de sal de sodio del ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico hidratado (Sigma-Aldrich) se disolvió en tampón de acetato de sodio [acetato de sodio 50 mM (pH 5,0)], y la solución madre de sustrato se preparó a una concentración de 0,25 mM. La enzima neuraminidasa, procedente de *Clostridium perfringens*, se preparó a 0,2 U/ml en tampón de acetato de sodio (pH 5,0). Las soluciones madre de los compuestos de prueba se prepararon disolviéndolas en MeOH y diluyéndolas a sus concentraciones respectivas (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/mL).

El ensayo enzimático se realizó mezclando 110 μL de solución tampón [50 mM de acetato de sodio (pH 5,0)] con 10 μL de enzima y 10 μL de solución de inhibidor. Dicha mezcla se incubó a 37 °C durante 5 minutos con agitación, para obtener una mezcla homogénea. Se registró la fluorescencia emitida por la misma, que fungió como blanco para sustraer la fluorescencia de fondo. Posteriormente, se agregaron 20 μL de sustrato a cada pozo de la microplaca de 96 pocillos (SPL Life Sciences, Corea) y se monitoreó la emisión de fluorescencia del producto 4-MU (4-metilumbeliferona) a las longitudes de onda de emisión

y excitación de 450 y 365 nm, respectivamente, utilizando un lector de placas Cytation3 (BioTek, EE.UU.). Se realizaron lecturas cada 1 minuto, por un período de 20 minutos. Se mantuvo una temperatura de 37 °C durante el transcurso de la reacción enzimática.

Para el cálculo de las pendientes se seleccionó el rango lineal de cada curva obtenida, que fueron los primeros 5 minutos en todos los casos. Los potenciales inhibidores de los compuestos de prueba se determinaron como las concentraciones requeridas para inhibir al 50% la actividad sialidasa (CI_{50}) en las condiciones del ensayo. Las actividades inhibitorias se calcularon en GraphPad utilizando el módulo de regresión no lineal. Se utilizó quercetina (Sigma-Aldrich) como control positivo; también se utilizó un control negativo con enzima y sustrato, sin inhibidor. A los valores de fluorescencia del ensayo se les sustrajo la fluorescencia de las muestras evaluadas. Todos los experimentos se realizaron un mínimo de tres veces (por triplicado). Se utilizó OriginPro8 para el procesamiento de datos y GraphPad Prism9 para el cálculo de CI_{50} de inhibidores.

2.4 ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

2.4.1 Calibración del método de acoplamiento molecular

Se realizó la calibración del método de acoplamiento molecular utilizando las estructuras cristalográficas de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (PDB ID: 2BF6) con el ligando ácido siálico, y la N1 del virus de influenza A (PDB ID: 2HU0) con el ligando oseltamivir. Se separaron en archivos independientes las estructuras de receptor y ligando. No se aplicó ningún tipo de optimización a la estructura cristalográfica del ligando. Las estructuras de receptores y ligandos se prepararon para el acoplamiento empleando el software AutoDock Tools (Holt et al., 2008), en el que se añaden hidrógenos polares y cargas de Gasteiger. La caja de búsqueda se situó en el sitio activo de cada enzima neuraminidasa, con dimensiones 22 x 22 x 22. Se realizó acoplamiento molecular semiflexible (proteína rígida y ligando flexible) utilizando AutoDock Vina v1.1.2 (Trott and Olson, 2009), obteniéndose un total de 100 conformaciones por ligando. El parámetro de exhaustividad se fijó en 32. Los resultados de las simulaciones se analizaron empleando el programa PyMOL (Schrödinger, 2020). El programa LigPlot (Laskowski and Swindells, 2011) se utilizó para la representación de las interacciones receptor-ligando. Se consideró que el método era válido si lograba reproducir la pose cristalográfica y las interacciones con los residuos clave.

2.4.2 Acoplamiento molecular

Las simulaciones de acoplamiento molecular se realizaron empleando las estructuras cristalográficas de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (PDB ID: 2BF6), y la N1 del virus de influenza A (PDB ID: 2HU0). La estructura de la quercetina se descargó de PubChem. Las estructuras tridimensionales de los posibles compuestos activos de la muestra AC.C, se modelaron empleando el programa MOE (Chemical computing Group, 2014), y se optimizó su estructura 3D utilizando el campo de fuerza MMFF94. Las estructuras de receptores y ligandos se prepararon para el acoplamiento empleando el software AutoDock Tools (Holt et al., 2008), en el que se añaden hidrógenos polares y cargas de Gasteiger. Se utilizó la misma caja de búsqueda que la empleada para la calibración del método. Se obtuvieron, igualmente, un total de 100 conformaciones por ligando. Los resultados de las simulaciones se analizaron empleando el programa PyMOL (Schrödinger, 2020). El programa LigPlot (Laskowski and Swindells, 2011) se utilizó para la representación de las interacciones receptor-ligando. Los criterios utilizados para seleccionar las mejores conformaciones por ligando fueron el valor de la función de puntuación y las interacciones de las moléculas con los residuos clave del sitio catalítico de cada enzima.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDO CARMÍNICO

3.1.1 Obtención de derivados acetilados

La acetilación utilizando anhídrido acético y piridina es una reacción útil para acetilar grupos hidroxilo tanto de alcoholes como fenoles. El ácido carmínico contiene cuatro grupos hidroxilo en la glucosa y otros cuatro grupos fenólicos. Los hidroxilos de fenol son más ácidos que los de alcohol, por lo que reaccionan fácilmente frente a estos reactivos. Sin embargo, los hidroxilos de alcohol también presentan cierto grado de acidez y son capaces de reaccionar igualmente bajo estas condiciones.

De la reacción de acetilación se obtuvieron 47 mg de mezcla de derivados acetilados, que representa un 82 % de rendimiento aproximadamente. Este rendimiento se debe a que se obtuvo una mezcla con diferente grado de acetilación.

El sistema de disolventes que logró una mejor separación entre los diferentes derivados acetilados fue acetato de etilo y metanol, en proporciones 8:2 (AcOEt:MeOH 8:2). Se observaron tres bandas con Rf de 0.2, 0.5 y 0.8.

3.1.2 Obtención de derivados metil-acetilados de ácido carmínico

La reacción de metilación produjo un rendimiento de 1.2 mg, correspondientes a la mezcla de los derivados metilados. Debido a este bajo rendimiento, se llevaron a cabo repetidas metilaciones utilizando cantidades de 30 mg de ácido carmínico, hasta alcanzar un rendimiento de 8 mg de crudo metilado. Luego se realizó la acetilación de los 8 mg obtenidos.

3.1.3 Purificación del crudo acetilado

La purificación del crudo acetilado se realizó empleando la muestra ACI. Se aplicaron en cada placa preparativa 14.3 mg y 13.5 mg de crudo acetilado respectivamente. Tras la separación cromatográfica, se aprecian tres bandas principales, las cuales se denominaron AC.A, AC.B y AC.C, con Rf de 0.2, 0.5 y 0.8, respectivamente (Figura 12A y B). Se obtuvieron en total 1,2 mg de la banda AC.A, 2,3 mg de AC.B y 5.3 mg de AC.C.

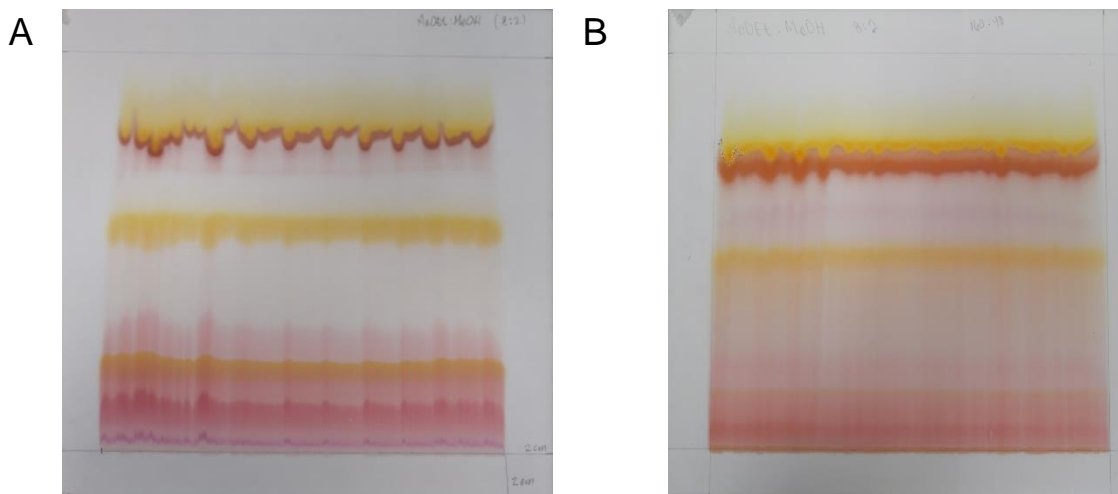


Figura 12 Cromatofolios obtenidos de la separación por placa preparativa del crudo acetilado ACI. A) Cromatofolio resultante de separar 14,3 mg de crudo acetilado; B) Cromatofolio resultante de separar 13,5 mg de crudo acetilado. Fase móvil AcOEt:MeOH (8:2).

3.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

3.2.1 Caracterización por Espectrometría de masas

3.2.1.1 Crudo acetilado ACV

Los iones moleculares de los derivados acetilados, que se obtienen empleando HESI-II como fuente de ionización, son de la forma $[M+H]^+$. Por tanto, cada señal del espectro corresponde a un ion molecular cuya masa será la del compuesto más una unidad ("Sonda H-ESI. Guía del usuario," 2008).

El espectro de masas obtenido corresponde al crudo acetilado ACV (Figura 13). La primera señal identificada como un componente de esta muestra es la de masa 829.18 m/z, que corresponde al derivado totalmente acetilado de ácido carmínico con ocho grupos acetilo. Los grupos acetilo se ubican en los sitios activos de la molécula de partida, o sea, en todos los grupos hidroxilo (-OH). Otra de las señales identificadas fue la del derivado con siete grupos acetilo, que corresponde a 787.17 m/z. Le sigue la señal en 745.15 m/z, que corresponde a uno de los derivados con seis grupos acetilo, de masa 744 g/mol. Los hidroxilos tanto de fenol como de alcohol presentan cierto grado de acidez. Esta característica los hace propensos a reaccionar en medio básico. Es por esto que bajo las condiciones de reacción empleadas, puede ocurrir la acetilación de estos grupos. Sin embargo, los hidroxilos en posiciones 5 y 8 están cercanos a los carbonilos de quinona, por lo que pueden formar enlace de hidrógeno. Dichos enlaces pueden dificultar la acetilación

en esas posiciones. Es por ello que se propone que la señal en 745.15 m/z, con seis grupos acetilo corresponda al derivado acetilado en las posiciones 3, 6, 2', 3', 4' y 6' (Figura 4).

Es importante destacar que dadas las condiciones de reacción, no es posible la acetilación del ácido carboxílico, porque daría como resultado la formación de un anhídrido. El anhídrido solo se formaría en presencia de un haluro de acilo, y este tipo de compuesto no se utiliza en la reacción. Además, no se encuentra ninguna señal de masa 871 m/z, que correspondería al derivado totalmente acetilado con nueve grupos acetilo, o sea, con el grupo ácido también acetilado.

Otros iones moleculares identificados son los de masas 703.14 m/z, 661.13 m/z y 619.19 m/z que corresponden a derivados de ácido carmínico de masas 702, 660 y 618, con cinco, cuatro y tres grupos acetilo. Los hidroxilo de fenol son más ácidos que los de alcohol, o sea, más reactivos. Por ello, es posible que los hidroxilos no acetilados sean los OH secundarios de la glucosa, que son menos ácidos que los OH primarios.

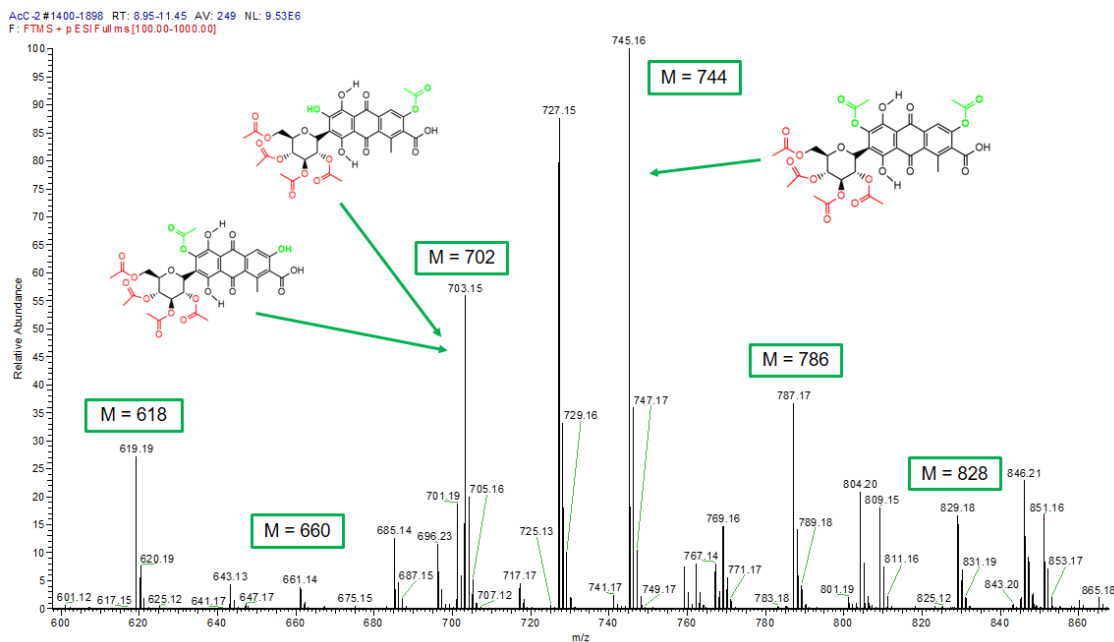


Figura 13 Espectro de masas de iones moleculares de la muestra acetilada ACV.

Por otra parte, no se detectaron señales correspondientes a iones moleculares con uno o dos grupos acetilos, ni la presencia de ácido carmínico.

Además de las señales de los iones moleculares de los derivados, se observan otras correspondientes a especies que perdieron una molécula de agua ($m/z = 811, 769, 727, 685$ y 643). Esto se debe a la presencia de un grupo ácido libre. Al hidroxilo libre de este grupo se adiciona un protón durante el proceso de formación del ion molecular. Una vez

protonado el hidroxilo, se puede liberar como una molécula de agua, para dar lugar a la especie de masa $[M-18]^+$ (“Sonda H-ESI. Guía del usuario,” 2008).

3.2.1.2 Muestra AC.C

La purificación del crudo acetilado permitió obtener las muestras AC.A, AC.B y AC.C. La muestra de mayor rendimiento fue la AC.C, con 5.3 mg. Este espectro permite conocer, según las masas de cada especie, cuántos grupos acetilo se han adicionado a la estructura del ácido carmínico. El espectro obtenido se muestra en la Figura 14.

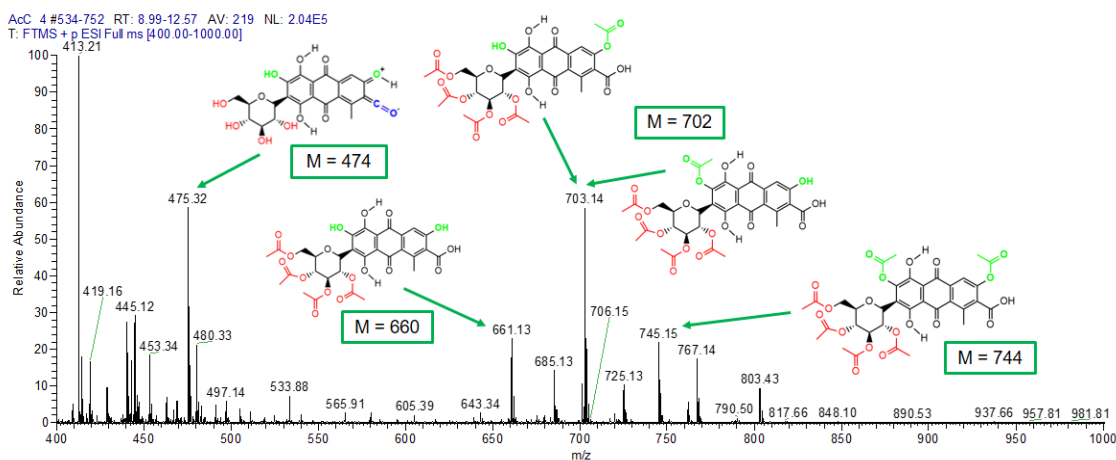


Figura 14 Espectro de masas de iones moleculares de la muestra acetilada AC.C.

El espectro de la muestra AC.C ofrece las señales de masas 745.15, 703.14 y 661 m/z, que corresponden a los derivados con seis, cinco y cuatro grupos acetilo. Esta conclusión se basa en el análisis realizado al espectro de masas del crudo acetilado.

Un último ion molecular detectado, de masa 475.32 m/z, se espera que corresponda al ácido carmínico, todavía remanente en la muestra. La masa molecular del ácido carmínico es 492.39 g/mol; por tanto la señal que se observa corresponde al ion molecular del tipo $[M+H-H_2O]^+$ (Figura 13). Esta especie se forma a causa de la fuente de ionización HESI-II empleada en el análisis. Esta utiliza un gas auxiliar calentado, que permite una mejor desolvatación de las moléculas y formación de los iones. La temperatura a la que ocurre este proceso es mayor de 300 °C, lo que propicia la formación de especies del tipo $[M+H-H_2O]^+$ como forma más estable del ion. Este tipo de iones son menos comunes en ESI, ya que la ionización ocurre en ausencia de gas calentado y a temperaturas más bajas, alrededor de 20 °C (“Sonda H-ESI. Guía del usuario,” 2008).

3.2.2 Caracterización por FTIR

3.2.2.1 Derivados metilados

La reacción de metilación permite obtener derivados de ácido carmínico con grupos metilos en su estructura. El espectro IR permite determinar qué grupos funcionales están presentes en la muestra y, por ende, saber si ocurrió reacción.

Una vez realizada la metilación del ácido carmínico, y dado el bajo rendimiento de la misma,

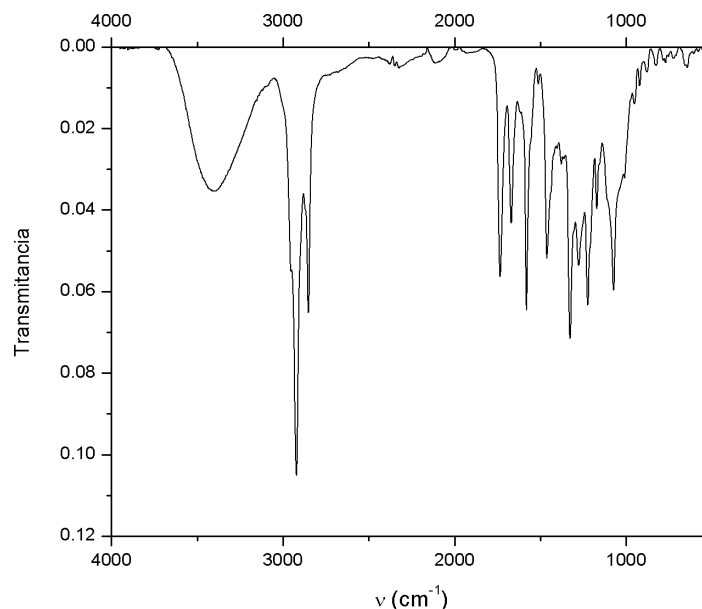


Figura 15 Espectro FTIR de crudo metilado de ácido carmínico.

se analizó el crudo metilado utilizando la técnica espectroscópica FTIR. El espectro obtenido se observa en la Figura 15.

Entre 3600 y 3100 cm^{-1} se observan la banda ancha que corresponde a vibraciones de enlace de grupo $-\text{OH}$ libre. A 2919 y 2844 cm^{-1} se aprecian las vibraciones de enlace $\text{Csp}^3\text{-H}$, típicas de carbonos de la glucosa y de grupos metilo. Otra señal característica de esta estructura es la vibración de enlace $\text{C}=\text{O}$ a 1673 cm^{-1} , correspondiente a carbonilo de quinona.

Una señal que indica metilación del ácido carboxílico es la que se observa a 1740 cm^{-1} , y corresponde a la vibración de valencia de ésteres fenólicos de ácido aromático, o sea, al grupo $-\text{COOCH}_3$ unido a la antraquinona. Además, no se observa una banda ancha de intensidad baja con máximo en 3000 cm^{-1} , que indicaría presencia de grupo $-\text{COOH}$ libre. Por esto, se considera que el ácido se ha esterificado.

3.2.3 Caracterización por RMN

3.2.3.1 Derivados acetilados

La muestra acetilada obtenida se analizó mediante las técnicas espectroscópicas 1D de RMN-¹H y RMN-¹³C, así como las técnicas bidimensionales HSQC y HMBC. Las mismas permitirán identificar la estructura de los derivados acetilados obtenidos. Se empleó como referencia una muestra de ácido carmínico, cuyos espectros se muestran en Figura A1 y A.2. La Figura 16 muestra la estructura del derivado totalmente acetilado con los carbonos principales numerados.

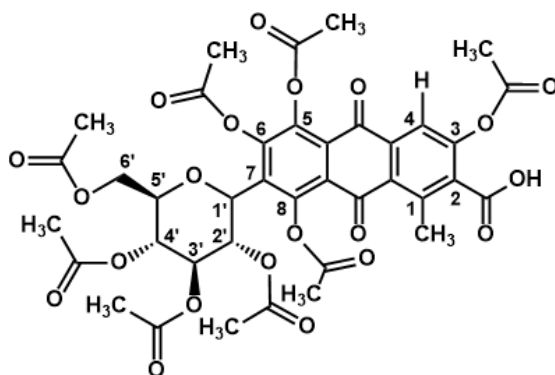


Figura 16 Estructura de ácido carmínico totalmente acetilado.

En el espectro RMN-¹H del crudo acetilado en CDCl₃ (Figura A.3), se observa una señal simple a campo alto con un desplazamiento químico de 1.25 ppm que indica la presencia del grupo metilo en posición C1. Luego se observa un cúmulo de señales entre 1.80 ppm y 2.70 ppm, que corresponden a los grupos metilo de acetilo. En la región desde 3.55 ppm hasta 5.90 ppm, se encuentran los protones del anillo de glucosa, que presentan un mayor desplazamiento que en el ácido carmínico porque ocurrió acetilación de los hidroxilos del azúcar.

En la región de los protones aromáticos (7-8 ppm) se aprecia la señal del único protón aromático presente en la estructura, unido a C4, con un desplazamiento de 7.88 ppm. Este desplazamiento es superior al de este protón en AC, debido a la presencia del grupo acetilo en posición 3.

Por último, a campo bajo se observan dos señales simples, a 12.63 ppm y 12.88 ppm, que pertenecen a protones de grupos hidroxilo en posiciones C5 y C8. Ambos forman enlace de hidrógeno con los carbonilos de quinona adyacentes.

Tabla 2 Datos espectroscópicos de RMN-¹H de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico

Asignación	Crudo acetilado RMN- ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, I)	Desplazamiento calculado	Ácido carmínico (referencia) RMN- ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) δ (m, J, I)	Ácido carmínico metil-acetilado RMN- ¹ H δ (ppm)
1'	4.81 (d,)	-	4.93 (d, 9.9 Hz, 1H)	-
2'	5.81 (dd)	-	3.45 (m)	-
3'	5.34 (dd)	-	-	-
4'	5.17 (dd)	-	-	-
5'	3.79 (m)	-	4.21 (m)	-
6'a	4.41 (dd)	-	3.90 (dd, 12.1 Hz, 1H)	-
6'b	3.99 (dd)	-	3.73 (dd, 11.9 Hz, 4.9 Hz, 1H)	-
1-CH ₃	1.25 (s, 3H)	-	2.72 (s, 3H)	2.64**
4	7.87 (s, 1H)	7.73	7.57 (s, 1H)	7.70*, 7.78**
CH ₃ CO	-2	-	-	1.83, 2.03, 2.07**
5-OH	12.63, 12.88			
8-OH				

* Desplazamiento en RMN-¹H del Ácido carmínico, en DMSO-d₆.(Schmitt et al., 1984)

** Desplazamiento en RMN-¹H del Ácido carmínico acetilado en la glucosa, en DMSO-d₆.(Yamada et al., 1993)

En el espectro RMN-¹³C del crudo acetilado en CDCl₃ (Figura A.4), se observa la señal de metilo unido a C1 a δ 29.91. Las señales alrededor de δ 20 corresponden a los grupos metilo de acetilo; mientras que las señales alrededor de δ 170 representan los carbonilos de acetilo. En la región entre 60 y 80 ppm se localizan los carbonos del anillo de glucosa (Tabla 3). El desplazamiento de estos carbonos difiere del desplazamiento que presentan en el AC a causa de la presencia de grupos acetilo en el azúcar.

En la región de 100 a 150 ppm se aprecian las señales de Csp² aromáticos, de la unidad de antraquinona (Tabla 3). Las señales de carbonilos de quinona se observan a 187.14 y 187.46 ppm.

Tabla 3 Datos espectroscópicos de RMN-¹³C de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico

Asignación	Crudo acetilado RMN- ¹³ C (600 MHz, CDCl ₃) δ (ppm)	Desplazamiento calculado	Ácido carmínico RMN- ¹³ C (600 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm)	Ácido carmínico metil-acetilado RMN- ¹³ C δ (ppm)
CH ₃	29.91	-	20.79	19.8*
1	141.62	141.0	148.56	140.1*
2	128.17	127.6	133.12	131.9*
3	155.04	155.8	160.80	159.8*
4	119.21	119.6	112.69	111.4*
5	N/A	-	142.81	147.6*
6	142.49	140.7	155.38	154.0*
7	131.07	131.5	113.27	121.3*
8	N/A	-	159.63	157.9*
9	187.56	-	188.09	186.2*

10	187.14	-	188.02	186.0*
4a	149.95	144.9	137.61	135.6*
4b	134.5	133.0	121.24	111.3*
8a	N/A	130.7	107.06	105.0*
8b	137.70	136.8	125.17	123.1*
1'	73.01	-	75.33	-
2'	70.18	-	72.64	-
3'	74.10	-	80.22	-
4'	67.90	-	82.80	-
5'	76.49	-	72.01	-
6'	61.70	-	63.14	-
COOH	180.99	-	171.64	167.9*
CH ₃ CO	19.57, 20.80, 20.83, 20.99, 21.67, 21.75	-	-	-
CH ₃ CO	168.10, 169.13, 169.73, 170.06, 170.46, 170.80	-	-	-

* Desplazamiento en RMN-¹³C del Ácido carmínico, en DMSO-d₆.(Schmitt et al., 1984)

** Desplazamiento en RMN-¹³C del Ácido carmínico acetilado en la glucosa, en DMSO-d₆.(Yamada et al., 1993)

N/A No asignado

El análisis del espectro de HSQC del crudo acetilado (Figura A.5) permitió realizar una mejor asignación de las señales observadas en RMN-¹H y RMN-¹³C mediante las siguientes correlaciones:

- Una correlación a $^1J_{CH}$ entre el protón aromático H4 a δ 7.88 y el C4 a δ 119.21.
- Una correlación a $^1J_{CH}$ entre el protón del metilo unido a C1 a δ 1.25 con el carbono geminal a δ 29.53.
- Siete correlaciones a $^1J_{CH}$ entre protones y carbonos del anillo de glucosa: (5.81, 70.18), (5.16, 67.90), (5.30, 74.10), (4.81, 73.01), (3.79, 76.49) y los protones H6'a y H6'b con C6' (4.41, 61.70) y (3.99, 61.70).
- Múltiples correlaciones a $^1J_{CH}$ entre protones y carbonos de metilo de acetilo, señales alrededor de δ 2 para protón y δ 20 para carbono.

De acuerdo a estos datos espectroscópicos de HSQC se identificaron señales correspondientes a correlaciones geminales de C-H en el anillo de glucosa, con desplazamientos diferentes a los encontrados para AC. Esto indica una vez más, que ocurrió acetilación en todos los hidroxilos de la unidad de glucosa. Además, se encontraron numerosas señales de correlación geminal C-H de metilos de acetilo. Igualmente este resultado apunta a la presencia de un gran número de acetilos añadidos a la estructura de AC.

El análisis del espectro de HMBC del crudo acetilado (Figura A.6) evidenció la presencia de grupos acetilo tanto en la glucosa como en la antraquinona, y permitió realizar una correcta asignación mediante las siguientes correlaciones:

a) Una correlación a $^3J_{CH}$ entre el protón anomérico de la glucosa (H1') a δ 4.81 y carbonos del núcleo de la antraquinona a δ 131.00 y δ 142.49.

b) Cuatro correlaciones a $^3J_{CH}$ entre el protones del anillo de glucosa y carbonilos de acetilo a δ 4.42 y el carbonilo a δ 170.29; δ 5.17 y δ 169.44; δ 5.34 y δ 169.39; δ 5.81 y δ 171.65. Estas correlaciones sugieren, nuevamente, que ocurrió acetilación en todos los hidroxilos de la glucosa.

c) Cuatro correlaciones del protón aromático H4 a δ 7.88 con carbonos aromáticos a δ 130.85, δ 134.81, δ 149.90 y δ 187.52. Esta última corresponde a $^3J_{CH}$ entre el protón H4 y el carbono carbonílico de quinona adyacente.

d) Correlaciones a $^2J_{CH}$ entre los protones del anillo de glucosa con carbonos vecinales del anillo de glucosa. El H1' a δ 4.82 correlaciona únicamente con C2' a δ 70.18. A su vez, el H2' correlaciona con C1' a δ 73.07, y con C3' a δ 74.03. También se observa la correlación de H3' a δ 5.32 con C4' a δ 67.80, y con C2' a δ 70.17. Además, se aprecia correlación de H4' a δ 5.17 con C5' y C3' a δ 76.44 y δ 74.01, respectivamente; así como la correlación a $^3J_{CH}$ con C6' a δ 61.69. Por último, se aprecian correlaciones de H6'a a δ 4.00 con C5' a δ 76.21, así como a $^3J_{CH}$ con C4' a δ 67.86. Dichas correlaciones permitieron asignar correctamente las señales de carbono e hidrógeno de la unidad de glucosa, y corroborar que ocurrió acetilación en todos los hidroxilos de la misma.

e) Dos correlaciones a $^4J_{CH}$ de protones de acetilo con carbonos aromáticos. Una de estas correlaciones es la de protón de acetilo en posición 3 con Csp² a δ 130.93, δ 134.47 y δ 141.46. La otra correlación es la de protón de acetilo en posición 6 con Csp² a δ 128.85 y δ 137.70.

f) Múltiples señales de carbono carbonílico que se agrupan alrededor de δ 170 y correlacionan con señales de protón de metilo de acetilo entre δ 1.80 y δ 2.70. Basado en estos datos espectroscópicos y en los del acápite e), se confirma la presencia de dos grupos acetilos unidos a carbonos de antraquinona. Este resultado no implica que haya ocurrido acetilación únicamente en posiciones 3 y 6 de la unidad de antraquinona; sino que esta se produjo en la mayoría de los derivados obtenidos.

g) Correlaciones a $^1J_{CH}$ de metilos de acetilos, de protones entre δ 1.80 y δ 2.70 con C_{sp^3} alrededor de δ 20, que indican, una vez más, presencia de grupos acetilo en los derivados obtenidos.

El espectro de masas indica que el compuesto mayoritario del crudo acetilado es el de masa 745 m/z, con seis grupos acetilo. Los datos espectroscópicos señalan que los grupos acetilo se encuentran en posiciones 2', 3', 4' y 6' de la glucosa, y 3 y 6 de la antraquinona. En cuanto a la muestra purificada AC.C, el compuesto mayoritario es de masa 703 m/z, con cinco grupos acetilo. Estos pueden estar localizados en posiciones 2', 3', 4' y 6' de la glucosa, al igual que en el crudo acetilado; y otro de los acetilo puede estar en posición 3 o 6 de la antraquinona.

3.2.3.2 Derivados metilados

La elucidación de espectros de resonancia, tanto de protón como de carbono, de mezclas de compuestos es compleja (Figuras A.7-10). Por esta razón, se registraron espectros 1D y bidimensionales (HSQC y HMBC), que aportan información acerca de la muestra. El espectro RMN- 1H del crudo metilado de ácido carmínico mostró varias señales de protón de metoxilo a δ 3.92 (Tabla 4).

En los espectros HSQC y HMBC del crudo metilado se observaron las siguientes correlaciones:

a) Tres correlaciones a $^1J_{CH}$ de protones de metoxilo a δ 3.92 con carbonos de metoxilo a δ 52.64, δ 56.27 y δ 61.54. Estas tres correlaciones corresponden a tres grupos metilo añadidos a la estructura de AC.

b) Dos correlaciones a $^3J_{CH}$ de protones de metoxilo a δ 3.92 con carbonos aromáticos a δ 149.86 y δ 158.31, y una correlación de dichos protones con carboxilo a δ 167.40. Estas indican que las metilaciones ocurrieron en dos de los hidroxilos fenólicos y otra en el ácido carboxílico. Esto coincide con el resultado obtenido mediante FTIR, donde se encontró que, igualmente, se había metilado el grupo ácido.

c) Una correlación a $^1J_{CH}$ de protones de metilo unido a C1 a δ 1.25 con carbono geminal a δ 29.06. Dicho protón también correlaciona a $^4J_{CH}$ con carbono de ácido carboxílico a δ 167.40.

d) Una correlación a $^1J_{CH}$ de protón aromático H4 a δ 7.49 con carbono aromático geminal C4 a δ 105.87.

Tabla 4 Datos espectroscópicos de RMN- 1H de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico

Asignación	Crudo metilado RMN- 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ (m, J, I)	Ácido carmínico (referencia) RMN- 1H (600 MHz, CD_3OD) δ (m, J, I)	Ácido carmínico metil-acetilado RMN- 1H δ (ppm)
1'	4.87	4.93 (d, 9.9 Hz, 1H)	-
2'	3.46 (q)	3.45 (m)	-
3'	3.47		-
4'	3.55		-
5'	3.67	4.21 (m)	-
6'a	3.87	3.90 (dd, 12.1 Hz, 1H)	-
6'b	3.75	3.73 (dd, 11.9 Hz, 4.9 Hz, 1H)	-
1- CH_3	1.23	2.72 (s, 3H)	2.64**
4	7.49	7.57 (s, 1H)	7.70*, 7.78**
3- OCH_3	3.92	-	3.98 (s)**
6- OCH_3	3.92	-	4.02 (s)**
$COOCH_3$	3.92	-	3.90 (s)**

* Desplazamiento en RMN- ^{13}C del Ácido carmínico, en $DMSO-d_6$. (Schmitt et al., 1984)

** Desplazamiento en RMN- ^{13}C del Ácido carmínico metilado en la antraquinona, en $DMSO-d_6$. (Yamada et al., 1993)

La escasa cantidad y complejidad de la muestra fueron factores críticos para extraer mayor información de los espectros. Las señales correspondientes a protones y carbonos de la unidad de glucosa son ínfimas y de muy baja intensidad. A pesar de esto se lograron asignar las señales correspondientes a protones y carbonos de la glucosa, cuyos desplazamientos se corresponden con los del ácido carmínico. Esto permitió confirmar que no había ocurrido derivatización de los grupos OH del azúcar.

Los espectros permitieron determinar que ocurrió metilación en dos hidroxilos fenólicos, al igual que en el ácido carboxílico. El desplazamiento de los carbonos de metoxilo obtenido experimentalmente coincidió con el reportado por Yamada y col. (Yamada et al., 1993), como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5 Datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C de crudo acetilado y compuesto de referencia ácido carmínico

Asignación	Crudo metilado RMN- ^{13}C (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)	Ácido carmínico RMN- ^{13}C (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm)	Ácido carmínico metil-acetilado RMN- ^{13}C δ (ppm)
CH_3	29.06	20.79	19.8*, 19.75**
3	158.31	160.80	159.8*
4	105.87	112.69	106.95**
6	149.86	155.38	154.0*
1'	74.13	75.33	-
2'	71.41	72.64	-
3'	79.40	80.22	-
4'	80.16	82.80	-

5'	70.28	72.01	-
6'	64.52	63.14	-
COOH	-	171.64	167.9*
COOCH ₃	52.64	-	52.69**
3-OCH ₃	61.54	-	61.44**
6-OCH ₃	56.27	-	56.62**
COOCH ₃	167.40	-	166.55**

* Desplazamiento en RMN-¹³C del Ácido carmínico, en DMSO-d₆.(Schmitt et al., 1984)

** Desplazamiento en RMN-¹³C del Ácido carmínico metilado en la antraquinona, en DMSO-d₆.(Yamada et al., 1993)

3.2.3.3 Derivados metil-acetilados

Los derivados metil-acetilados (M-Ac) se obtuvieron mediante acetilación del crudo metilado. La reacción de acetilación se realizó utilizando el mismo procedimiento que el empleado para obtener el crudo acetilado.

Se registró el espectro RMN-¹H del crudo metil-acetilado (Figura A.11). Este mostró señales características como la de protón aromático H4 a δ 7.49 y la de protones de metilo unido a C1 a δ 1.25, al igual que en el espectro del crudo metilado.

También se observaron las señales correspondientes a protones de metoxilo en posiciones 3 y 6 a δ 3.92 y δ 4.03, respectivamente. Además, el espectro muestra las señales de protones del anillo de glucosa entre δ 3.49 y δ 5.98. La asignación de estas señales se realizó teniendo en cuenta los desplazamientos de protones del azúcar en el crudo acetilado (Tabla 6). Los desplazamientos de protones del azúcar, tanto para el crudo acetilado como para el metil-acetilado, son muy similares y difieren del desplazamiento de estos protones en el ácido carmínico y en el crudo metilado.

Tabla 6 Datos espectroscópicos de RMN-¹³C de crudo acetilado y compuestos de referencia ácido carmínico y ácido carmínico metil-acetilado

Asignación	Crudo metil-acetilado RMN- ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, l)	Crudo acetilado RMN- ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, l)	Ácido carmínico (referencia) RMN- ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) δ (m, J, l)	Ácido carmínico metil-acetilado RMN- ¹ H δ (ppm)
1'	4.70	4.81 (d,)	4.93 (d, 9.9 Hz, 1H)	-
2'	5.98	5.81 (dd)	3.45 (m)	-
3'	5.30	5.34 (dd)	-	-
4'	5.04	5.17 (dd)	-	-
5'	3.49	3.79 (m)	4.21 (m)	-
6'a	4.31	4.41 (dd)	3.90 (dd, 12.1 Hz, 1H)	-
6'b	3.96	3.99 (dd)	3.73 (dd, 11.9 Hz, 4.9 Hz, 1H)	-
CH ₃	1.25	1.25 (s, 3H)	2.72 (s, 3H)	2.64**
4	7.49	7.87 (s, 1H)	7.57 (s, 1H)	7.70*, 7.78**
3-OCH ₃	3.92	-	-	3.98 (s)**
6-OCH ₃	4.03	-	-	4.02 (s)**
COOCH ₃	3.91	-	-	3.90 (s)**

* Desplazamiento en RMN-¹H del Ácido carmínico, en DMSO-d₆.(Schmitt et al., 1984)

** Desplazamiento en RMN-¹H del Ácido carmínico acetilado en la glucosa y metilado en la antraquinona, en DMSO-d₆.(Yamada et al., 1993)

3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-SIALIDASA DE DERIVADOS ACETILADOS Y METIL-ACETILADOS DE ÁCIDO CARMÍNICO

Entre las muestras evaluadas se encuentra ACV (Figura 17B), que es una mezcla de derivados acetilados de ácido carmínico; AC.C (Figura 17C), una fracción de ACV purificada por cromatografía en placa preparativa; y M-Ac (Figura 17A), que corresponde al crudo metil-acetilado. Estas muestras se evaluaron a concentraciones desde 800 µg/mL hasta 12.5 µg/mL, o más diluidas para algunas muestras. La unidad de concentración escogida fue µg/mL en lugar de µM, porque estamos en presencia de mezclas de compuestos y no muestras puras. En la Figura 17D se muestra la estructura química de la quercetina, utilizada en este ensayo como control positivo.

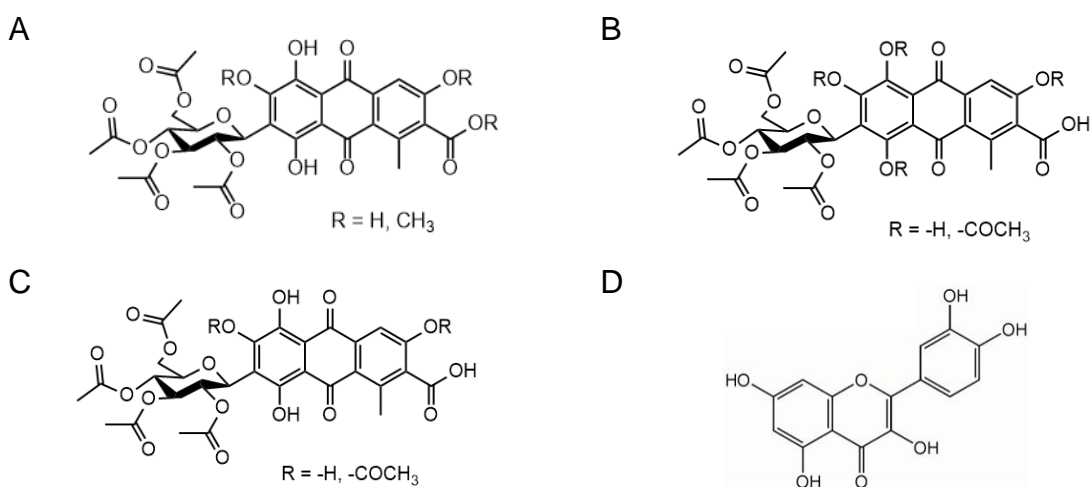


Figura 17 Estructura química de las muestras evaluadas en el ensayo enzimático de actividad anti-sialidasa. A) *Crudo metil-acetilado M-Ac*, B) *Crudo acetilado ACV*, C) *muestra AC.C* y D) *quercetina*.

Las muestras evaluadas disminuyeron gradualmente la actividad enzimática con un aumento constante de la concentración del inhibidor, mientras que los inhibidores no afectaron la concentración del sustrato, lo que indica claramente que la inhibición enzimática fue causada únicamente por los compuestos de prueba en un nivel dependiente de la concentración. Entre las muestras evaluadas, AC.C mostró mejor actividad frente a la BNA, con un CI₅₀ de 22.59 µg/mL, respecto a los crudos acetilado y metil-cetilado. Estos últimos mostraron una baja actividad, con CI₅₀ de 495.4 µg/mL y 413.5 µg/mL, respectivamente. La Tabla 7 muestra la CI₅₀ de las muestras evaluadas.

Tabla 7 Actividad inhibitoria media de las muestras evaluadas

Muestras	CI ₅₀
ACV	495.4 µg/mL
AC.C	22.59 µg/mL
M-Ac	413.5 µg/mL
Quercetina	8.89 µM

Para determinar el CI₅₀ de las muestras evaluadas, se construyen curvas dosis-respuesta. Estas son curvas que presentan forma sigmoide, y se definen, fundamentalmente, mediante cuatro parámetros: superior, inferior, pendiente y CI₅₀.

Los parámetros superior e inferior indican los valores asintóticos límite cuando no hay inhibición y cuando esta es total, respectivamente. La zona con pendiente describe el rango de concentraciones a las que la molécula o especie presenta cierto grado de inhibición. La CI₅₀ se refiere a la concentración de inhibidor necesaria para reducir la actividad enzimática al 50% de su valor máximo.

La Figura 18 muestra las curvas dosis-respuesta obtenidas para las muestras evaluadas. En el caso de M-Ac y ACV (Figura 18A y B), se obtuvieron curvas sigmoideas incompletas; porque no se logró alcanzar la meseta inferior del sigmoide. Esto se debe a que se necesita evaluar disoluciones más concentradas de ambas muestras, hasta alcanzar una actividad inhibitoria máxima de las mismas.

El gráfico dosis-respuesta de la muestra AC.C revela una curva sigmoide completa (Figura 18C), que alcanza los valores límite superior e inferior. Esto permite que la determinación de la CI₅₀ sea más exacta. De igual forma ocurre con la quercetina (Figura 18D), donde se alcanzó la meseta inferior correspondiente a la concentración inhibitoria máxima.

A

B

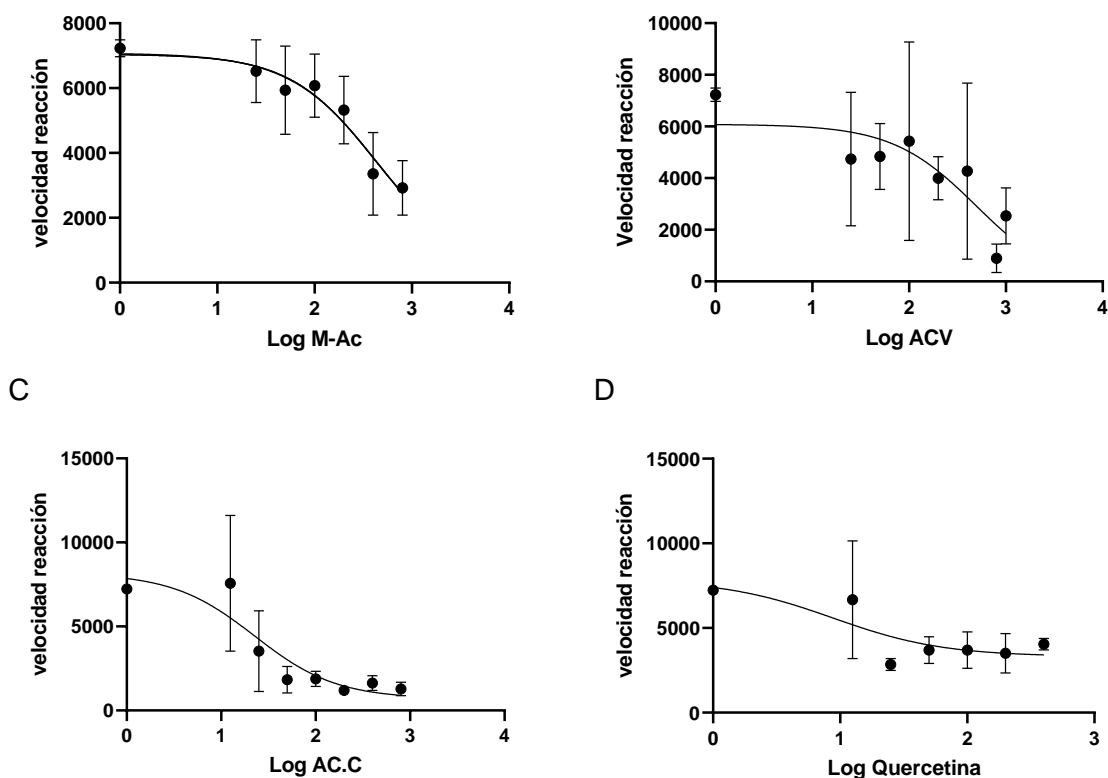


Figura 18 Curvas de dosis-respuesta de A) crudo metil-acetilado, B) crudo acetilado, C) Muestra AC.C y D) quercetina.

En las curvas dosis-respuesta presentadas destaca la desviación que existe entre los valores de velocidad inicial para cada concentración de inhibidor evaluada. Dicha desviación se debe a la rapidez y sensibilidad de la reacción enzimática.

3.4 ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

3.4.1 Calibración del método y acoplamiento molecular

El ensayo enzimático de actividad anti-sialidasa reveló que la muestra AC.C tuvo el mejor valor de CI_{50} , entre todas las evaluadas. Los análisis espectroscópicos y espectrométricos de dicha fracción indicaron la presencia de un compuesto mayoritario con grupos acetilo en posiciones 2', 3', 4' y 6' de la glucosa, y en posiciones alternas 3 y 6 de la antraquinona, con 702 m/z (Figura 14). Ambos compuestos se proponen como potenciales inhibidores de NA, y se seleccionaron para realizar el acoplamiento molecular.

El ácido siálico fue la molécula escogida para calibrar el método de acoplamiento, debido a que es el ligando cristalográfico de la neuraminidasa bacteriana (PDB ID: 2BF6), y como control para verificar los resultados del acoplamiento. En la Tabla 8 se muestran los valores de energía de afinidad obtenidos para cada ligando.

La representación fue generada por el programa LigPlot+. Los aminoácidos de la enzima que interactúan con el ligando por enlace de hidrógeno están representados con el modelo de bolas y barras; las líneas discontinuas de color verde representan los enlaces de hidrógeno, con distancias incluidas; los arcos con rayos representan los aminoácidos de la enzima con contactos hidrofóbicos con el ligando. Leyenda de colores por átomo: oxígeno en rojo, nitrógeno en azul, carbono en negro. Ligandos representados con barras color violeta, enzima representada con barras café.

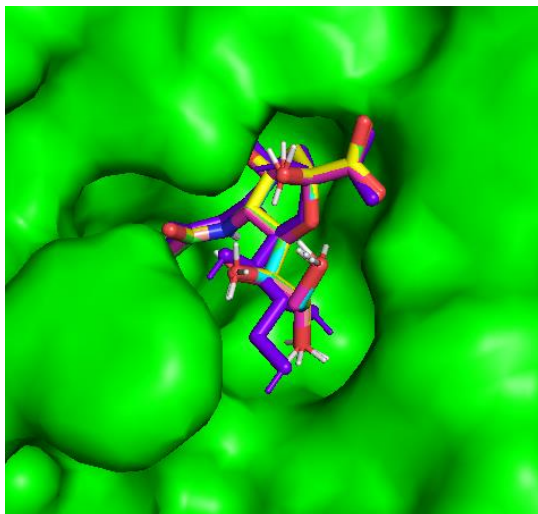


Figura 21 Superposición de la pose cristalográfica con las cinco mejores conformaciones del acoplamiento entre el ácido siálico y la enzima bacteriana.

La representación fue generada por el programa PyMOL. La enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* se representa en superficie color verde, estructura cristalográfica de AS en morado, estructuras de AS productos del acoplamiento, en cian, amarillo, azul, rosa y magenta.

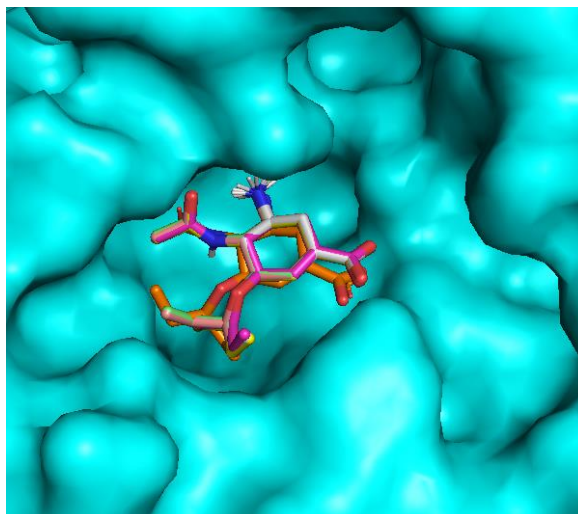


Figura 22 Superposición de la pose cristalográfica con las cinco mejores conformaciones del acoplamiento entre el oseltamivir y la N1 de influenza A.

La representación fue generada por el programa PyMOL. La enzima neuraminidasa de N1 de influenza A se representa en superficie color cian, estructura cristalográfica de oseltamivir en naranja, estructuras de oseltamivir productos del acoplamiento, en verde, amarillo, gris, rosa y magenta.

Las figuras 21 y 22 muestran cómo se superponen las estructuras cristalográficas de ácido siálico y oseltamivir con las mejores poses generadas durante el acoplamiento. Esta superposición indica que el método empleado para el acoplamiento molecular logra reproducir la pose cristalográfica y las interacciones con residuos claves de la proteína.

En la Figura 23 se muestran las interacciones de los residuos del sitio catalítico de la N1 de influenza con el compuesto 3-AC. En esta imagen, se observa un gran número de argininas formando enlace de hidrógeno con carbonilos de acetilo (Arg156, Arg224 y Arg430), con hidroxilo de antraquinona (Arg118) y con oxígeno de acetilo (Arg152 y Arg292). También forman enlace de hidrógeno con la molécula otros residuos como Ser246, Asn294 y Tyr406. Las interacciones hidrofóbicas están conformadas por los residuos Glu119, Asp151, Trp178, Ile222, Glu276, Tyr347 y Pro431, en contacto con metilos de acetilo y los anillos condensados de la antraquinona. La Figura 25 muestra cómo la glucosa tetraacetilada ocupa la cavidad 150.

Por otra parte, la molécula 6-AC muestra un modo de unión diferente con la NA viral, donde la antraquinona en este caso ocupa la cavidad 150 (Figura 26). Sin embargo, se establece un gran número de interacciones proteína-ligando. Entre estas destacan los enlaces de hidrógeno formados por Arg292, Tyr347 y Arg371 con el carbonilo de quinona en posición 10. También se observan otros enlaces de hidrógeno de Arg118, Arg152, Gln136, Arg371 y Arg430 con carbonilos de acetilo. Se aprecian igualmente, numerosos contactos hidrofóbicos de Arg224, Tyr406, Pro431, Val149, Asp151, Gly147, Thr439, Arg156 e Ile427, con grupos acetilo y los anillos condensados de la antraquinona (Figura 24).

Es importante tener en cuenta que las moléculas 3-AC y 6-AC son de mayor peso molecular y más voluminosas que las moléculas utilizadas como control. De ahí que no necesariamente se reproduzcan las interacciones con los mismos residuos ni la misma cantidad de estos. Sin embargo, ambas moléculas muestran interacciones con residuos clave del sitio activo, como el grupo tri-arginal (Arg118, Arg292 y Arg371), los residuos del bolsillo hidrofóbico Ile222, Arg224, Glu276 Glu277 y Tyr406, así como otros residuos importantes Asp151, Arg152, Asn294 y Tyr347.

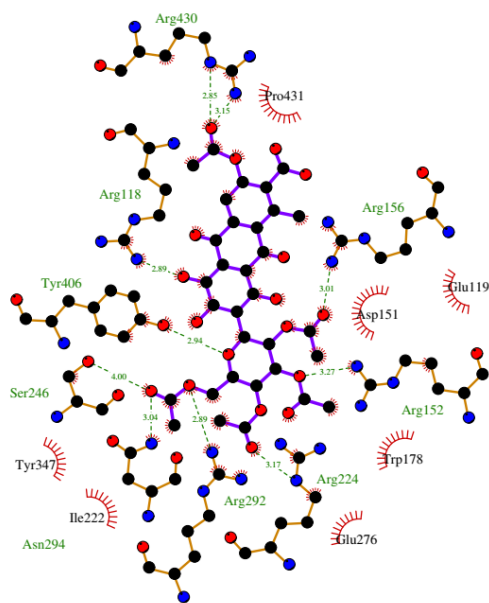


Figura 23 Interacciones de la NA viral con el derivado 3-AC.

La representación fue generada por el programa LigPlot+. Los aminoácidos de la enzima que interactúan con el ligando por enlace de hidrógeno están representados con el modelo de bolas y barras; las líneas discontinuas de color verde representan los enlaces de hidrógeno, con distancias incluidas; los arcos con rayos representan los aminoácidos de la enzima con contactos hidrofóbicos con el ligando. Leyenda de colores por átomo: oxígeno en rojo, nitrógeno en azul, carbono en negro. Ligandos representados con barras color violeta, enzima representada con barras café.

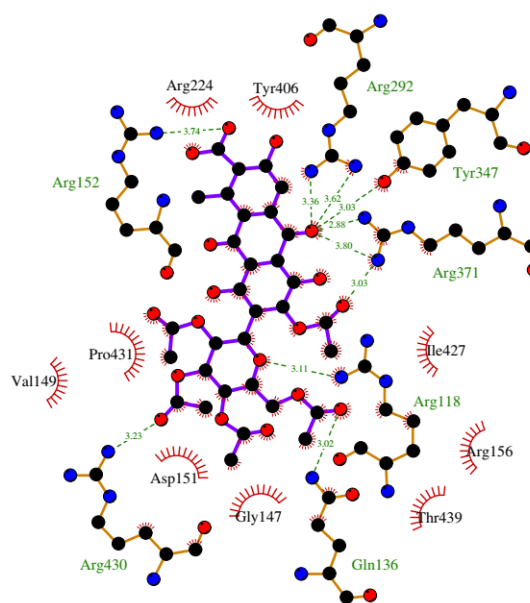


Figura 24 Interacciones de la NA viral con el derivado 6-AC.

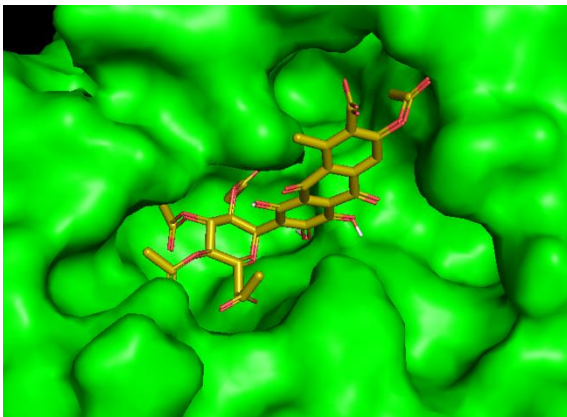


Figura 25 Representación en superficie de la NA viral con ligando 3-AC en su sitio catalítico.

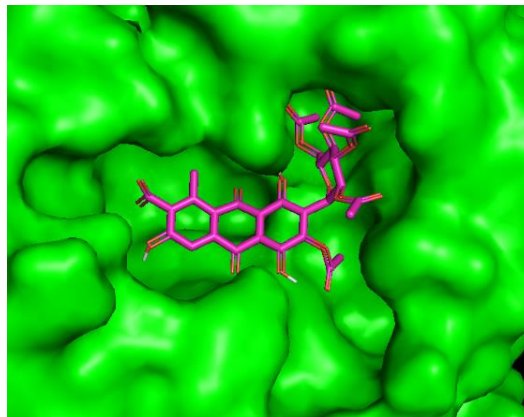


Figura 26 Representación en superficie de la NA viral con ligando 6-AC en su sitio catalítico.

Es posible que la presencia del grupo acetilo en posición 3 o 6 sea causante de los diferentes modos de unión de ambas moléculas y la enzima viral. Posteriores ensayos y purificación de la muestra evaluada son necesarios para comprobar esta hipótesis.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se obtuvieron derivados acetilados y metil-acetilados de ácido carmínico, y se evaluó la actividad antisialidasa de los mismos empleando el ensayo enzimático con MUNANA y la neuraminidasa bacteriana de *Clostridium perfringens*. Además, se realizó el acoplamiento molecular de las moléculas con posible actividad con las enzimas neuraminidasas de *C. perfringens* y la N1 de influenza A, para explicar las interacciones proteína-ligando.

Las sialidasas (neuraminidasas, NA) son glicosidasas responsables de la eliminación de residuos de AS (desialilación) de las porciones de glicano de glicoproteínas o glicolípidos. Las enzimas sialidasas poseen especificidad por determinados sustratos, rasgo este que determina su actividad biológica. Los ensayos basados en la función sialidasa se utilizan comúnmente para seleccionar inhibidores eficaces de estas enzimas con fines terapéuticos. Según su acción hidrolítica sobre los enlaces sialil-glicosídicos, se clasifican en exosialidasas y endosialidasas. Las exosialidasas catalizan la hidrólisis de enlaces α -2,3-, α -2,6-, α 2,8-glucosídicos de residuos terminales de AS en glucoproteínas y glicolípidos (Glanz et al., 2019).

La neuraminidasa de *Clostridium perfringens* utilizada en el ensayo, la NanI, 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 (Air, 2012; McAuley et al., 2019). Dado que ambas enzimas presentan especificidad por la catálisis de enlaces de AS α -2,3, se utilizó la enzima bacteriana en el ensayo enzimático para evaluar la actividad inhibitoria de los derivados de ácido carmínico, y predecir si pudieran tener actividad contra la neuraminidasa N1 de influenza A.

Existen diferentes tipos de ensayos para evaluar la susceptibilidad de los virus de la gripe a los inhibidores de la NA. Sin embargo, los ensayos de inhibición de la enzima usando un sustrato fluorescente o quimioluminiscente son los más ampliamente empleados y recomendados (Hřasová et al., 2019).

Uno de los sustratos marcados fluorescentemente, más comúnmente utilizado en ensayos de actividad anti-sialidasa es el reactivo 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (MUNANA) (Figura 27). Este sustrato es frecuentemente empleado para describir la cinética enzimática y determinar la actividad de las neuraminidasas de *Clostridium perfringens* (Kim et al., 2011; Uddin et al., 2016; Ullah et al., 2019) y de influenza A (Huang et al., 2019; Jia et al., 2021).

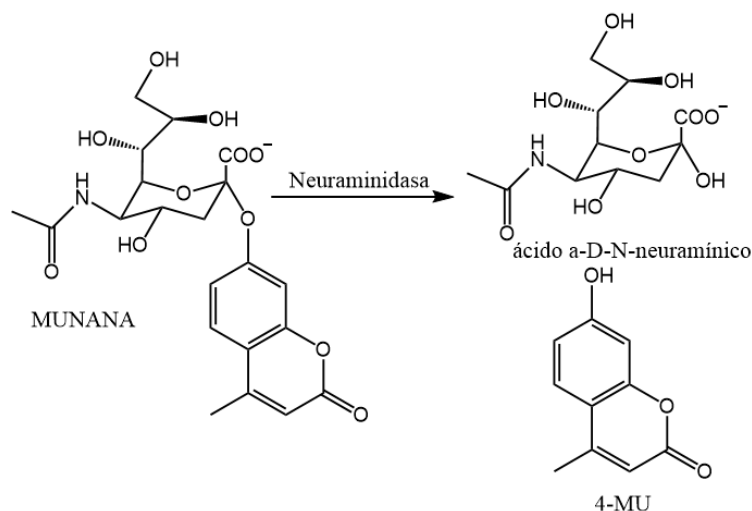


Figura 27 Reacción enzimática entre la enzima neuraminidasa y el sustrato MUNANA.

En el ensayo se empleó como control positivo la quercetina, cuyo CI_{50} es de $21.4 \pm 0.9 \mu M$ (Ullah et al., 2019), según reportan Ullah y col. Este compuesto disminuye la emisión de fluorescencia de 4-MU, a diferencia del blanco, donde la fluorescencia aumenta progresivamente. Se han reportado otros inhibidores de la neuraminidasa de *C. perfringens*, como siastatina B y ácido N-acetil-2,3-dehidro-2-desoxineuramínico (NADNA) (Li and McClane, 2014).

El análisis del acoplamiento molecular mostró que las moléculas 3-AC y 6-AC, con posible actividad anti-sialidasa, interactúan con residuos clave del sitio catalítico de la neuraminidasa viral. Entre estos residuos se encuentran el grupo triarginal (Arg292, Arg118 y Arg371) y otros residuos importantes como Tyr406 y Arg152. Dichas interacciones muestran que estas moléculas pudieran presentar actividad frente a la neuraminidasa viral en un ensayo *in vitro*. Sin embargo, para demostrar esta hipótesis es necesario purificar la muestra ACC y evaluar la actividad de las moléculas individualmente.

Además, es necesario destacar que solo se tuvieron en cuenta para el análisis de acoplamiento, dos de las posibles moléculas presentes en la muestra AC.C, dado que resultaron los componentes mayoritarios. Es posible que la actividad de dicha muestra esté dada por alguno o algunos de los componentes minoritarios, o sea, moléculas con un menor grado de acetilación.

4.2 CONCLUSIONES

Se obtuvieron 47 mg de mezcla de derivados acetilados a partir de 34 mg de ácido carmínico, que representan un 82 % de rendimiento.

Se determinó mediante espectrometría de masas, la presencia de al menos seis derivados acetilados diferentes, con iones moleculares de masas 619, 661, 703, 745, 787 y 829 m/z, que poseen desde tres hasta ocho grupos acetilo.

Se comprobó la presencia de grupos acetilo en todos los hidroxilos de la glucosa, y en posiciones 3 y 6 de la unidad de antraquinona, mediante técnicas espectroscópicas 1D y 2D.

Se comprobó la presencia de grupos metoxilo en posiciones 3 y 6 de la antraquinona, y la esterificación del ácido carboxílico, mediante técnicas FTIR y RMN.

Se comprobó la acetilación de la unidad de glucosa del crudo metil-acetilado, mediante RMN-¹H.

AC.C mostró una inhibición significativa de BNA, con un CI_{50} de 22.59 $\mu\text{g/mL}$, siendo la de mayor actividad. Su valor de CI_{50} es comparable con el de la quercetina.

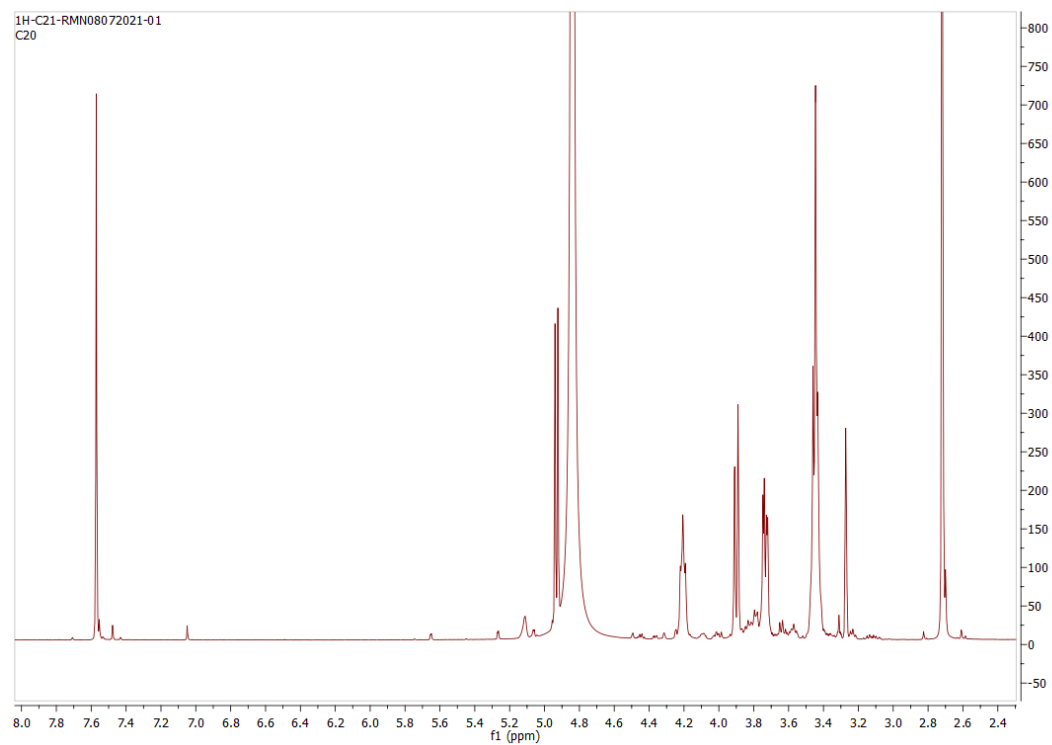
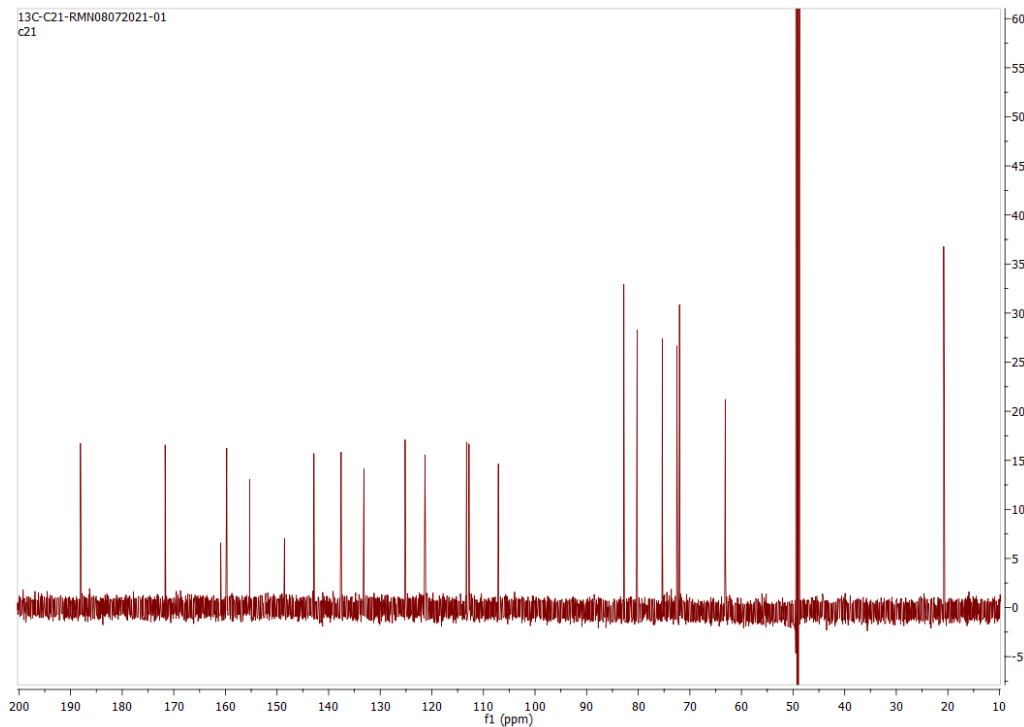
Pese a que las moléculas 3-AC y 6-AC presentan modos de unión diferentes con la enzima neuraminidasa N1, ambas muestran interacciones con residuos clave del sitio activo, como el grupo tri-arginal (Arg118, Arg292 y Arg371), los residuos del bolsillo hidrofóbico Arg224, Glu276, Glu277, Asn294 y Tyr406, y otros residuos importantes como Arg152 y Tyr347.

4.3 PERSPECTIVAS

Purificar los diferentes compuestos presentes en la muestra AC.C y evaluar su actividad anti-sialidasa individual, tanto en ensayo enzimático con MUNANA, como empleando el virus de influenza AH1N1.

Determinar parámetros cinéticos de la reacción enzimática y realizar un estudio cinético en general de dicha reacción.

ANEXOS

Figura A.1 Espectro RMN-¹H Ácido carmínico (CD₃OD)Figura A.2 Espectro RMN-¹³C Ácido carmínico (CD₃OD)

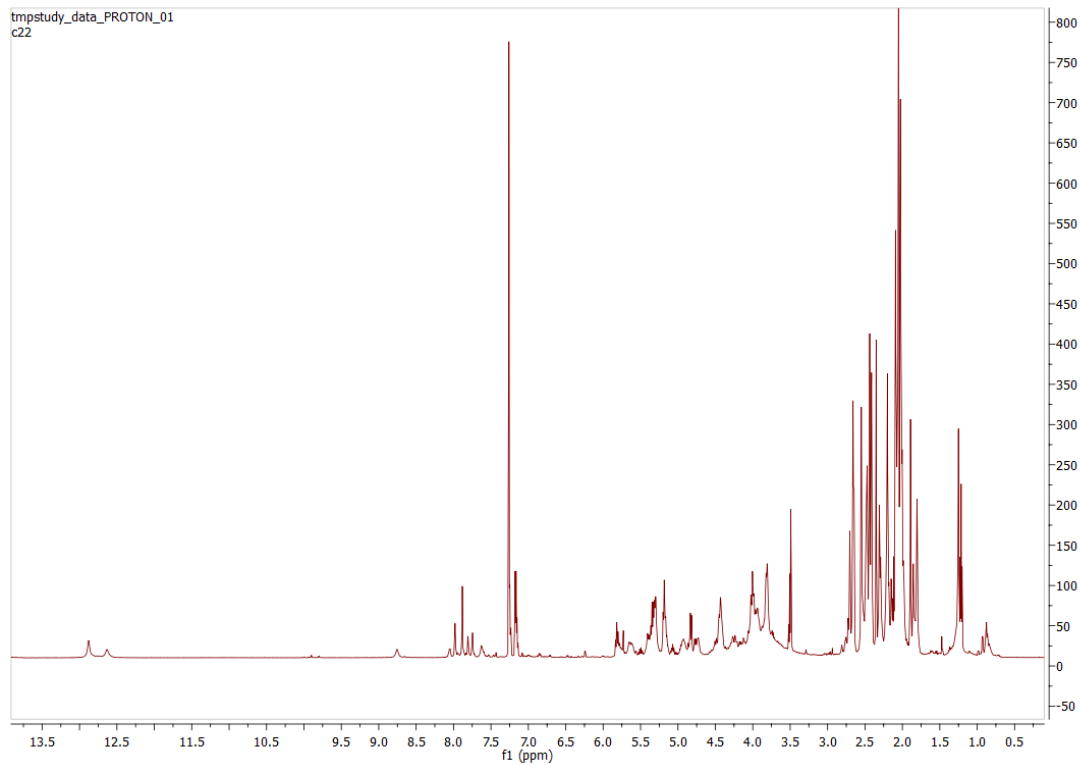


Figura A.3 Espectro RMN-¹H Crudo acetilado (CDCl₃).

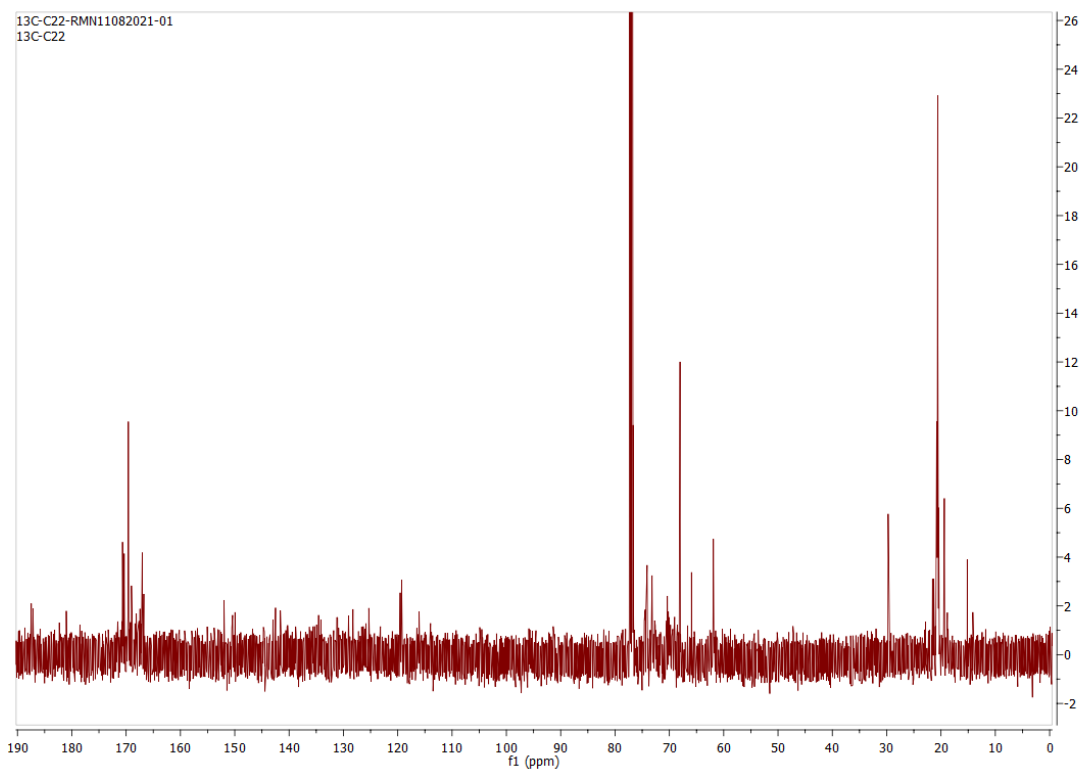


Figura A.4 Espectro RMN-¹³C Crudo acetilado (CDCl₃).

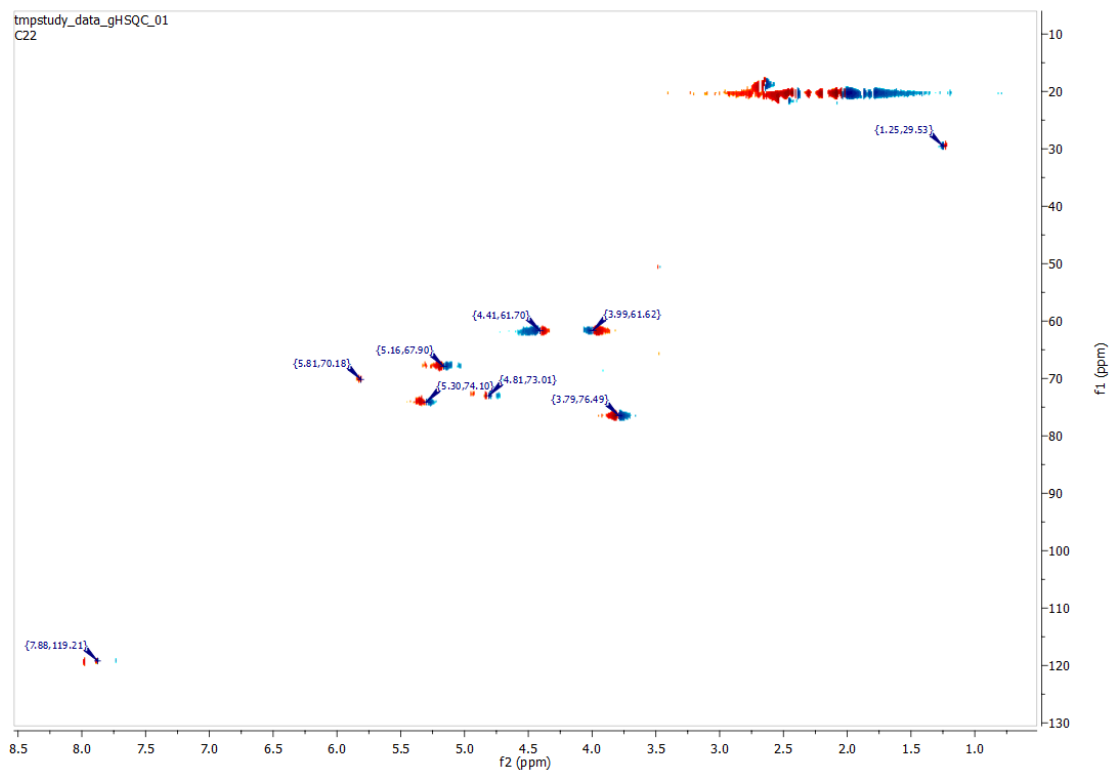


Figura A.5 Espectro HSQC Crudo acetilado (CDCl_3).

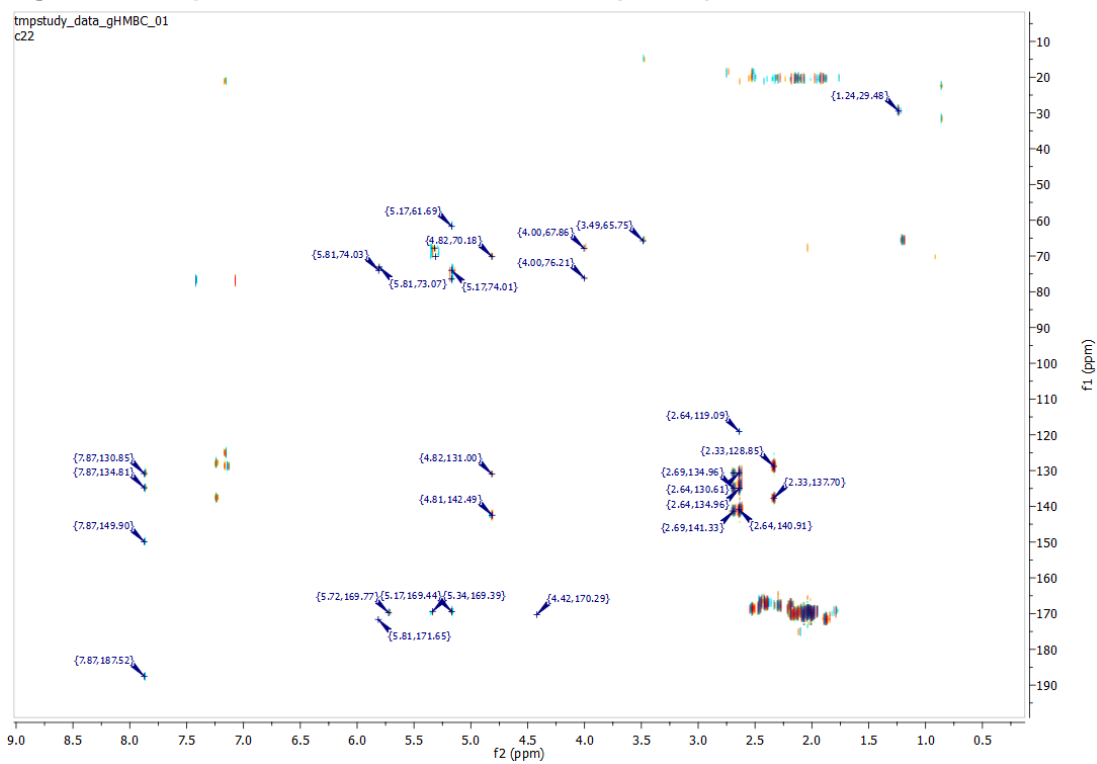


Figura A.6 Espectro HMBC Crudo acetilado (CDCl_3).

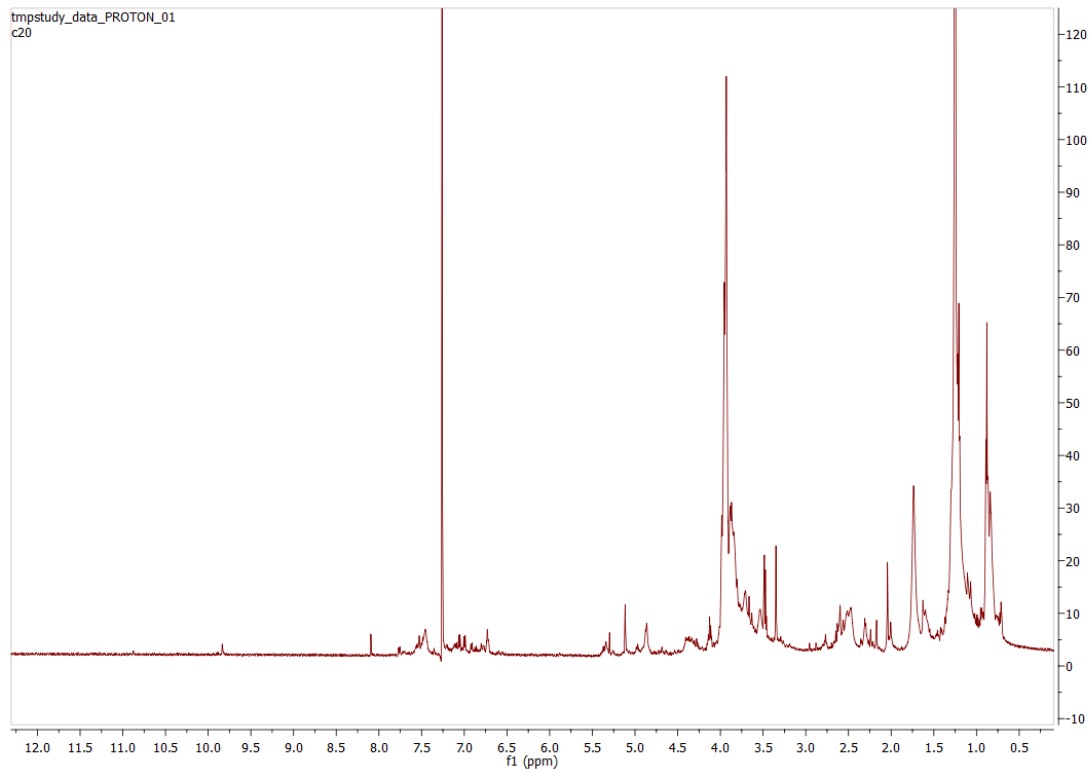


Figura A.7 Espectro RMN-¹H Crudo metilado (CDCl₃).

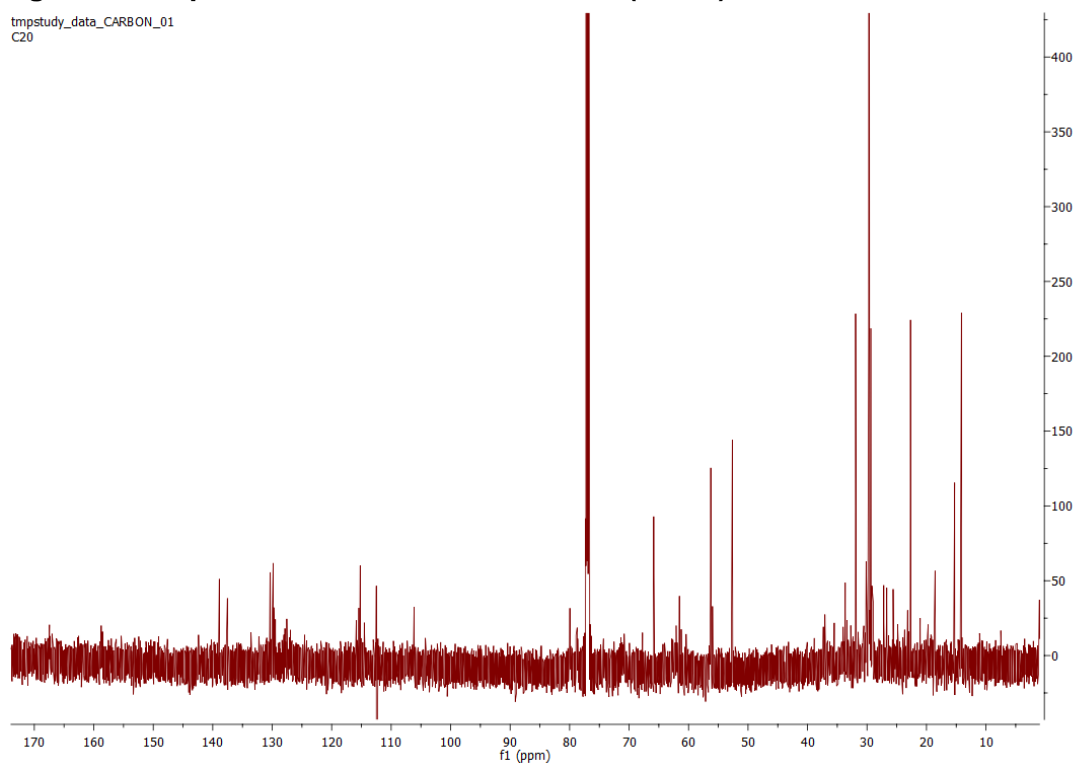


Figura A.8 Espectro RMN-¹³C Crudo metilado (CDCl₃).

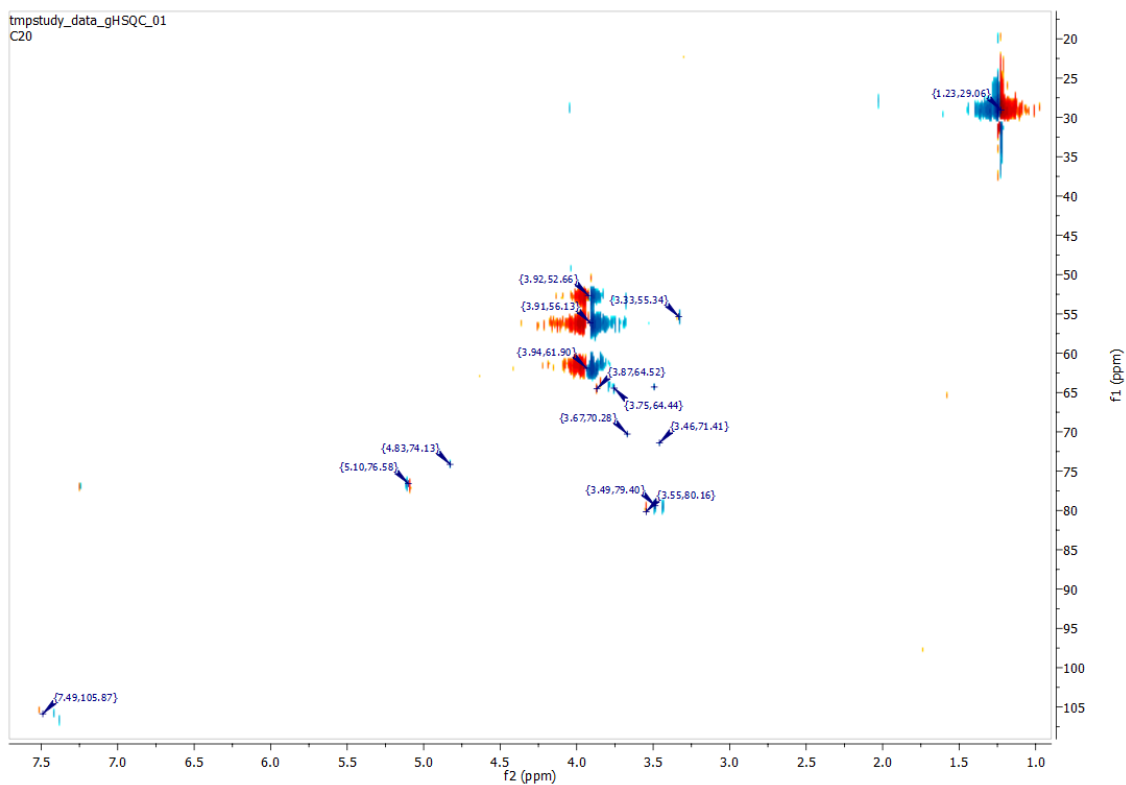


Figura A.9 Espectro HSQC Crudo metilado (CDCl_3).

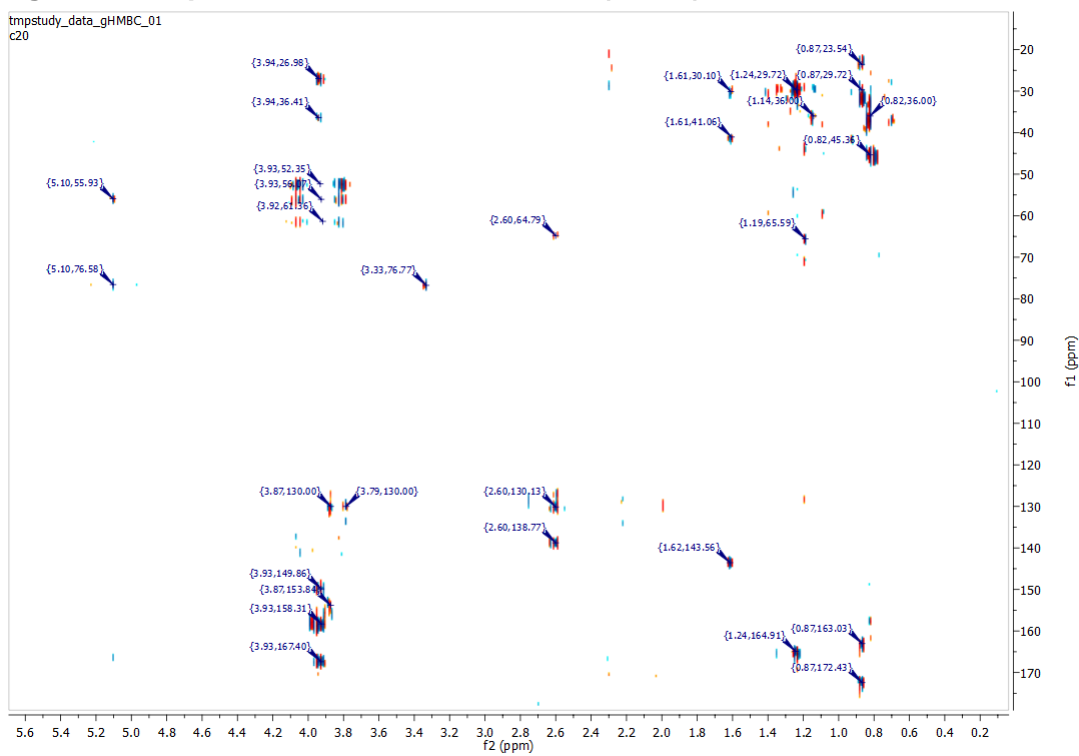


Figura A.10 Espectro HMBC Crudo metilado (CDCl_3).

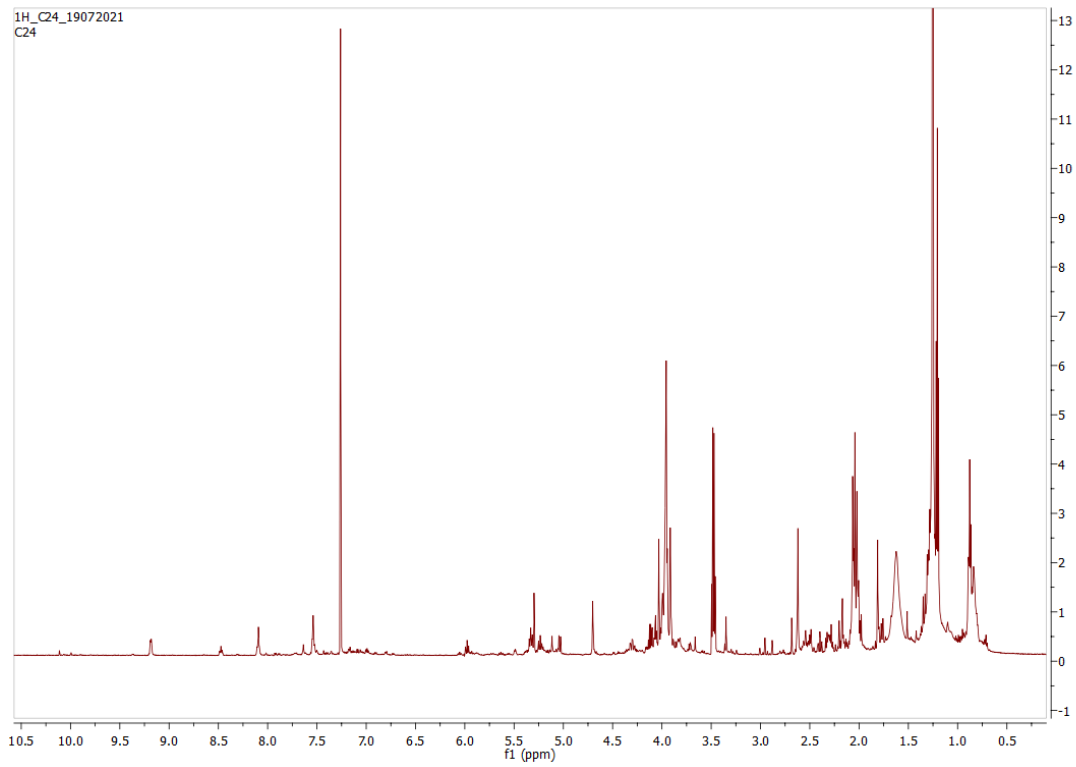


Figura A.11 Espectro RMN- ^1H Crudo metil-acetilado (CDCl_3).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Air, G.M., 2012. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir. Viruses* 6, 245–256.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00304.x>
- Alame, M.M., Massaad, E., Zaraket, H., 2016. Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections. *Front Microbiol* 7, 450–463.
- Bernini, R., Crisante, F., Ginnasi, M.C., 2011. A Convenient and Safe O-Methylation of Flavonoids with Dimethyl Carbonate (DMC). *Molecules* 16, 1418–1425.
<https://doi.org/10.3390/molecules16021418>
- Borges Argáez, R., Chan-Balan, R., Cetina-Montejo, L., Ayora-Talavera, G., Sansores-Peraza, P., Gómez-Carballo, J., Cáceres-Farfán, M., 2019. In vitro evaluation of anthraquinones from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) roots and several derivatives against strains of influenza virus. *Ind. Crops Prod.* 132, 468–475.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.056>
- Carrat, F., Flahault, A., 2007. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25, 6852–6862. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Chemical computing Group, 2014. *Molecular Operating Environment*. Montreal, QC, Can.
- Colman, P.M., Varghese, J.N., Laver, W.G., 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303, 41–44.
- Color Index, 1971. *Natural Organic Coloring Matters*.
- Cox, N.J., Subbarao, K., 2000. Global epidemiology of influenza: Past and present. *Annu Rev Med* 51, 407–421.
- Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X.Y., Bridges, C.B., Uyeki, T.M., 2009. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. *N Engl J Med* 360, 2605–2615.
- De Vlugt, C., Sikora, D., Pelchat, M., 2018. Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. *Viruses* 10, 641. <https://doi.org/10.3390/v10110641>
- Dunn, C.J., Goa, K.L., 1999. Zanamivir -A review of its use in influenza. *Drugs* 58, 761–784.
- Eisner, T., Nowicki, S., 1980. Red Cochineal Dye (Carminic Acid): Its Role in Nature. *Science* 208, 1039–42.
- Feng, H., Yamashita, M., Wu, L., Jose da Silva Lopes, T., Watanabe, T., Kawaoka, Y., 2019. Food Additives as Novel Influenza Vaccine Adjuvants. *Vaccines* 7, 127.
<https://doi.org/10.3390/vaccines7040127>
- Forrest, H.L., Webster, R.G., 2010. Perspectives on influenza evolution and the role of research. *Anim. Health Res. Rev.* 11, 3–18. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000071>
- Gibaja Oviedo, S., 1998. *Pigmentos Naturales Quinónicos*. Fondo Editorial, Perú.
- Glanz, V.Yu., Myasoedova, V.A., Grechko, A.V., Orekhov, A.N., 2019. Sialidase activity in human pathologies. *Eur. J. Pharmacol.* 842, 345–350.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.11.014>
- Gong, J., Xu, W., Zhang, J., 2007. Structure and Functions of Influenza Virus Neuraminidase. *Curr. Med. Chem.* 14, 113–122. <https://doi.org/10.2174/092986707779313444>
- Gottschalk, A., 1958. The influenza virus neuraminidase. *Nature* 181, 377–378.
- Hideyuki, I., Naoki, K., 2011. Laninamivir octanoate: a new long-acting neuraminidase inhibitor for the treatment of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9, 851–857.
- Hřasová, Z., Košík, I., Ondrejovič, M., Miertuš, S., Katrlík, J., 2019. Methods and Current Trends in Determination of Neuraminidase Activity and Evaluation of Neuraminidase Inhibitors. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 49, 350–367. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1531692>

- Holt, P.A., Chaires, J.B., Trent, J.O., 2008. Molecular Docking of Intercalators and Groove-Binders to Nucleic Acids Using Autodock and Surflex. *J. Chem. Inf. Model.* 48, 1602–1615. <https://doi.org/10.1021/ci800063v>
- Huang, C.-T., Hung, C.-Y., Hseih, Y.-C., Chang, C.-S., Velu, A.B., He, Y.-C., Huang, Y.-L., Chen, T.-A., Chen, T.-C., Lin, C.-Y., Lin, Y.-C., Shih, S.-R., Dutta, A., 2019. Effect of aloin on viral neuraminidase and hemagglutinin-specific T cell immunity in acute influenza. *Phytomedicine* 64, 152904. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152904>
- Jamison, J., Krabill, K., Flowers, D., Tsai, C., 1990. Polyribonucleotide — Anthraquinone interactions: In vitro antiviral activity studies. *Cell Biol. Int. Rep.* 14, 219–228. [https://doi.org/10.1016/S0309-1651\(05\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1651(05)80004-9)
- Jamison, J.M., Flowers, D.G., Jamison, E., Kitareewan, S., Krabill, K., Rosenthal, K.S., Tsai, C., 1988. Enhancement of the antiviral and interferon-inducing activities of poly r(A-U) by carminic acid. *Life Sci.* 42, 1477–1483.
- Jia, R., Zhang, Jian, Bertagnin, C., Cherukupalli, S., Ai, W., Ding, X., Li, Z., Zhang, Jiwei, Ju, H., Ma, X., Loregian, A., Huang, B., Zhan, P., Liu, X., 2021. Discovery of highly potent and selective influenza virus neuraminidase inhibitors targeting 150-cavity. *Eur. J. Med. Chem.* 212, 113097. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113097>
- Kaplan, B.S., Webby, R.J., 2013. The avian and mammalian host range of highly pathogenic avian H5N1 influenza. *Virus Res* 178, 3–11.
- Kim, Y.S., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Yuk, H.J., Cho, J.K., Kim, J.Y., Kim, K.D., Lee, W.S., Park, K.H., 2011. Flavanones and rotenoids from the roots of *Amorpha fruticosa* L. that inhibit bacterial neuraminidase. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1849–1856. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.038>
- Krabill, K., Jamison, J.M., Gilloteaux, J., Summers, J.L., 1993. Subcellular localization and antiviral activity of carminic acid/poly r(A-U) combinations. *Cell Biol. Int.* 17, 919–934.
- Krammer, F., Palese, P., 2015. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 167–182. <https://doi.org/10.1038/nrd4529>
- Lamoureux, G., Agüero, C., 2009. A comparison of several modern alkylating agents. *Arkivoc* 2009, 251–264. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.108>
- Landolt, G.A., Olsen, C.W., 2007. Up to new tricks – A review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 1–21. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001272>
- Laskowski, R.A., Swindells, M.B., 2011. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- 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>
- Li, S.-W., Yang, T.-C., Lai, C.-C., Huang, S.-H., Liao, J.-M., Wan, L., Lin, Y.-J., Lin, C.-W., 2014. Antiviral activity of aloe-emodin against influenza A virus via galectin-3 up-regulation. *Eur. J. Pharmacol.* 738, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.028>
- Li, Y.H., Yao, H.P., Hu, C.Y., Cheng, L.F., Wu, X.X., Weng, T.H., Wu, N.P., Li, L.J., 2020. Highly pathogenic H7N9 avian influenza virus infection associated with upregulation of PD-1/PD-Ls pathway-related molecules. *Int Immunopharmacol.* 85.
- Lown, J.W., Chen, H.-H., Sim, S.-K., Plambeck, J.A., 1979. Reactions of the antitumor agent carminic acid and derivatives with DNA. *Bioorganic Chem.* 8, 17–24. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(79\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0045-2068(79)90032-4)

- 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>
- McClellan, K., Perry, C.M., 2001. Oseltamivir -A review of its use in influenza. *Drugs* 61, 263–283.
- McMurry, J., 2012. *Química Orgánica*, 8va ed.
- Mihail, N., Craciun, C., 1970. *Naturwissenschaften* 50.
- Newstead, S.L., Potter, J.A., Wilson, J.C., Xu, G., Chien, C.-H., Watts, A.G., Withers, S.G., Taylor, G.L., 2008. The Structure of Clostridium perfringens NanI Sialidase and Its Catalytic Intermediates. *J. Biol. Chem.* 283, 9080–9088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710247200>
- Ohuchi, M., Asaoka, N., Sakai, T., Ohuchi, R., 2006. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect.* 8, 1287–1293. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.008>
- 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>
- Principi, N., Camilloni, B., Alunno, A., Polinori, I., Argentiero, A., Esposito, S., 2019. Drugs for Influenza Treatment: Is There Significant News? *Front. Med.* 6, 109. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00109>
- Rao, P.S., Reddy, P.P., Seshadri, T.R., 1940. Methylation of hydroxy flavonols using methyl iodide and potassium carbonate. *Proc. Indian Acad. Sci. - Sect. A* 12, 495. <https://doi.org/10.1007/BF03170712>
- Roggentin, P., Rothe, B., Kaper, J.B., Galen, J., Lawrisuk, L., Vimr, E.R., Schauer, R., 1989. Conserved sequences in bacterial and viral sialidases. *Glycoconj. J.* 6, 349–353. <https://doi.org/10.1007/BF01047853>
- Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y., Boivin, G., 2013. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antivir. Res* 98, 174–185.
- Schmitt, P., Günther, H., Hägele, G., Stilke, R., 1984. A1H and 13C NMR study of carminic acid. *Org. Magn. Reson.* 22, 446–449. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270220710>
- Schrödinger, 2020. The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger LLC.
- Secretaría de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010. *Rendición de cuentas en salud 2009*.
- Selvaraj, G.F., Piramanayagam, S., Devadasan, V., Hassan, S., Krishnasamy, K., Srinivasan, S., 2020. Computational analysis of drug like candidates against Neuraminidase of Human Influenza A virus subtypes. *Inform. Med. Unlocked* 18, 100284. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2019.100284>
- Shao, W., Li, X., Goraya, M., Wang, S., Chen, J.-L., 2017. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
- Smith, M.B., March, J., 2006. *March's Advanced Organic Chemistry*, 6th ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/0470084960>
- Solomons, G., Fryhle, C.B., 2011. *Organic Chemistry*, 10th ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Sonda H-ESI. *Guía del usuario*, 2008.
- Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., Veit, M., 2017. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* 8, 1580–1591. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>
- Szewczyk, B., Bieńkowska-Szewczyk, K., Król, E., 2014. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochim. Pol.* 61. https://doi.org/10.18388/abp.2014_1857

-
-
- Tatsuzaki, J., Ohwada, T., Otani, Y., Inagi, R., Ishikawa, T., 2018. A simple and effective preparation of quercetin pentamethyl ether from quercetin. *Beilstein J. Org. Chem.* 14, 3112–3121. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.291>
- Taylor, G.L., 1996. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 830–837.
- Trott, O., Olson, A.J., 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Uddin, Z., Song, Y.H., Curtis-Long, M.J., Kim, J.Y., Yuk, H.J., Park, K.H., 2016. Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from *Polygonum cuspidatum* and their inhibitory mechanism. *J. Ethnopharmacol.* 193, 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.026>
- 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>
- Varki, A., Gagneux, P., 2012. Multifarious roles of sialic acids in immunity: Roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 16–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x>
- Wade, L.G., Simek, J.W., 2016. *ORGANIC CHEMISTRY*, 9th ed. Pearson.
- Wasik, B.R., Barnard, K.N., Parrish, C.R., 2016. Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection. *Trends Microbiol.* 24, 991–1001. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.07.005>
- Yamada, Sadaji., Noda, Naoki., Mikami, Eiichi., Hayakawa, Junko., 1993. Analysis of natural coloring matters in food. 4. Methylation of cochineal color with diazomethane for the analysis of food products. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1071–1075. <https://doi.org/10.1021/jf00031a011>
- Yang, J., Jiang, S., Du, L., Liu, S., 2016. A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Rev Med Virol* 26, 242–250.
- Zhang, S.-P., Huang, R., Li, F.-F., Wei, H.-X., Fang, X.-W., Xie, X.-S., Lin, D.-G., Wu, S.-H., He, J., 2016. Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora* sp. from *Aconitum carmichaeli*. *Fitoterapia* 112, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.013>