



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE  
TERPENOS AISLADOS DE *Diospyros anisandra*

Tesis que presenta

GLORIA LIZETH JIMÉNEZ ALCALÁ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2022

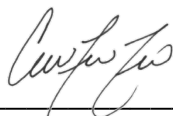
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Gloria Lizeth Jiménez Alcalá** titulado “**Evaluación de la actividad antiviral de Terpenos aislados de Diospyros anisandra**”, fue realizado en la **Unidad de Biotecnología, Línea de Biotecnología de Productos naturales, laboratorio de Química orgánica** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera**, dentro de la opción de **Biotecnología**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



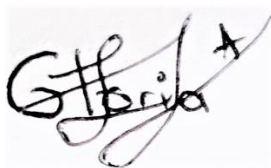
---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de febrero 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 registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Gloria Lizeth Jiménez Alcalá

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Aislamiento y evaluación antiviral de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* y *Caesalpinia yucatanensis* (Proyecto con clave A1-S-27652) en el que participé bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca otorgada No. 947028 para la realización de la presente tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y al Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, por la infraestructura e instalaciones proporcionadas para realizar el presente trabajo.

A mis asesoras de tesis Dra. Rocío Borges y Dra. Guadalupe Ayora, por su comprensión, consejos y apoyo otorgado, permitiéndome desarrollar profesionalmente y adquirir nuevos conocimientos.

A mi Comité Tutorial integrado por el Dr. Felipe Vázquez y Dra. Luisa López por sus consejos y valioso tiempo concedido.

A mi Comité Revisor formado por el Dr. Felipe Vázquez, Dra. Luisa López y Dra. Durcy Ruiz Ciau, por sus acertadas observaciones para mi tesis.

Al Biólogo Francisco Chi May por su apoyo en la colecta del material vegetal.

A QBB Mirbella Cáceres Farfán por su apoyo técnico en el uso del equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) y consejos del laboratorio.

A la Maestra en Educación Fabiola Escalante Erosa por su apoyo en Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Al técnico Miguel Baas por su apoyo en la realización de los espectros de Infrarrojo.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por permitirnos el uso del lector de placas multifuncional CYTATION 3.

A mis papás Raúl Jiménez y Luz Elena Alcalá por darme siempre su apoyo incondicional, comprensión y motivarme a cumplir mis metas.

A mis hermanas Vanessa y Ana Karen, por su cariño, apoyo y amistad.

A mi esposo Daniel Menchaca, por ser parte de esta etapa, comprenderme e impulsarme a cumplir mis objetivos.

A mis compañeros de laboratorio Mari Toña, Iván, Tania, Ernesto, Kenia, Nahomi, Claudia y Laura, por compartir una parte de su vida conmigo. A mis compañeros Mari Toña Juárez y Iván Humberto Chan por su amistad, consejos y apoyo.

Finalmente a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para el desarrollo de la presente tesis.



**ÍNDICE**

ABREVIATURAS .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XI
RESUMEN .....	XIII
ABSTRACT .....	XV

**CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO .....** 1

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1. Influenza .....	4
2.1.1. Estructura del virus de Influenza A .....	6
2.1.2. Epidemiología .....	8
2.1.3. Tratamientos .....	9
2.1.4. Extractos vegetales como tratamientos contra Influenza .....	12
2.2. Terpenos .....	12
2.2.1. Actividad anti-influenza de terpenos .....	13
2.3. <i>Diospyros anisandra</i> Blake .....	17
2.3.1. Género <i>Diospyros</i> .....	17
2.3.2. Descripción botánica y distribución de <i>Diospyros anisandra</i> .....	18
2.3.3. Fitoquímica de <i>Diospyros anisandra</i> .....	19
2.3.4. Usos etnobotánicos y actividad biológica .....	21
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS .....	24
5. OBJETIVOS .....	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	25

**CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS TERPÉNICOS DE CORTEZA DE *Diospyros anisandra* .....** 27

1. INTRODUCCIÓN .....	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27

2.1.	Material y equipo de laboratorio para la obtención de los extractos y aislamiento de compuestos terpénicos.....	27
2.2.	Equipo para la elucidación estructural.....	28
2.3.	Material vegetal.....	29
2.4.	Procesamiento de corteza.....	29
2.4.1.	Obtención del extracto hexánico de corteza.....	29
2.4.2.	Fraccionamiento del extracto orgánico hexánico DC.....	30
2.4.3.	Aislamiento y purificación de las fracciones con compuestos terpénicos.....	32
2.4.3.1.	Fraccionamiento de DCs14-15.....	32
2.4.3.2.	Fraccionamiento de DCu-5 y DCi-7c.....	34
2.4.3.3.	Fraccionamiento de DCt-7.....	35
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1.	Análisis de la muestra DCs14-15.....	37
3.2.	Análisis de la muestra DCu-5.....	40
3.3.	Análisis de la muestra DCi-7c.....	46
3.4.	Análisis de la muestra DCt-7.....	52
4.	CONCLUSIONES.....	60

<b>CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL E INHIBICIÓN DE NEURAMINIDASA DE COMPUESTOS TERPÉNICOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE <i>Diospyros anisandra</i>.....</b>	<b>61</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	61
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
2.1. Material y equipo de laboratorio.....	62
2.2. Cultivo celular y Cepa viral.....	63
2.3. Enzima Neuraminidasa y Sustrato 4-MUNANA.....	63
2.4. Muestras a evaluar.....	63
2.5. Bioensayo de citotoxicidad.....	64
2.5.1. Análisis de datos.....	65
2.6. Evaluación de la actividad antiviral: Reducción del Efecto Citopático (REC).....	65
2.6.1. Análisis de datos.....	66
2.7. Ensayo de Inhibición de la actividad de Neuraminidasa (NA).....	66
2.7.1. Análisis de datos.....	67



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	68
3.1. Evaluación de citotoxicidad y de Reducción del Efecto Citopático.....	68
3.2. Evaluación de inhibición de la actividad de Neuraminidasa (NA).....	72
5. CONCLUSIONES.....	77
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
1. DISCUSIÓN GENERAL .....	79
2. CONCLUSIONES GENERALES .....	80
3. PERSPECTIVAS.....	81
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>82</b>

**ABREVIATURAS**

$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
2D	Segunda dimensión
4-MUNANA	Sal sódica del ácido 2'-(4-metillumbeliferilo)- $\alpha$ -D-N-ácido acetilneuramínico
ACE2	Enzimas convertidoras de angiotensina 2
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido siálico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipo de Cultivo)
ATR	Reflectancia total atenuada
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCE	Cromatografía en columna de exclusión o permeación
CCF	Cromatografía en columna Flash
CCG	Cromatografía en columna por gravedad
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades)
$\text{CDCl}_3$	Cloroformo deuterado
$\text{CE}_{50}$	Concentración inhibitoria efectiva del virus al 50%

CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria celular del 50%
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica humana
COSY	Correlated Spectroscopy (Espectroscopia por correlación)
CPP	Cromatografía por placa preparativa
DL <sub>50</sub>	Dosis letal al 50%
DMAPP	Pirofosfato de 3,3'-dimeetilalilo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio Eagle modificado de Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
EPZ	Epóxido de zeylanona
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FT-IR	Infrarrojo por transformada de Fourier

GISRS	Global Influenza Surveillance and Response System (Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza)
HA	Hemaglutinina
HMDB	Human Metabolome Database
HSV-1	Virus de herpes simple
Hx	Hexano
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité Internacional de Taxonomía de Virus)
IS	Índice de selectividad
ITIS	Integrated Taxonomic Information System (Sistema Integrado de Información Taxonómica)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney (Madin-Darby de riñón canino)
MeOH	Metanol
MOI	Multiplicidad de infección
MU	4-metilumbeliferona
NA	Neuraminidasa
NANA	<i>N</i> -acetil- $\alpha$ - <i>D</i> -neuramínico
NP	Nucleoproteína

NS1 y NS2	Proteína no estructural 1 y 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PA	Polimerasa ácida
PB1 y PB2	Polimerasa básica 1 y 2
PBS	Phosphate buffered saline (amortiguador fosfato salino)
PEI	Porcentaje de inhibición de eclosión
REC	Reducción del efecto citopático
SDBS	Spectral Database for Organic Compounds (Base de datos espectral para compuestos orgánicos)
S-proteína	Proteína de espiga
T <sub>R</sub>	Tiempo de retención
UCI	Unidades de cuidados intensivos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
vRNP	Complejo de ribonucleoproteína viral
δ	Desplazamiento

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Gráfica de la curva epidémica de casos confirmados a influenza por semana epidemiológica en México (Secretaria de Salud, 2021). .....	6
<b>Figura 1.2.</b> Esquema de una partícula de virus de influenza A. ....	7
<b>Figura 1.3.</b> Estructura de tres triterpenos aislados de <i>Ganoderma pfeifferi</i> y un monoterpreno de <i>Melalueca alternifolia</i> (Garozzo <i>et al.</i> , 2011; Niedermeyer <i>et al.</i> , 2005) .....	14
<b>Figura 1.4.</b> Estructura de dos triterpenos derivados del ácido betulónico y dos saponinas triterpénicas derivados del ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil ursólico (Liao <i>et al.</i> , 2019; Baltina <i>et al.</i> , 2003). ....	17
<b>Figura 1.5.</b> Flores, frutos, hojas y ramas de <i>Diospyros anisandra</i> Blake (Fotografías: Germán Camevali Fernández-Concha; Herbario CICY, 2010) .....	18
<b>Figura 1.6.</b> Distribución en México de <i>Diospyros anisandra</i> Blake (Herbario CICY, 2010) .....	19
<b>Figura 1.7.</b> Estructuras de naftoquinonas aisladas de la corteza de <i>D. anisandra</i> (Cetina-Montejo, 2019; Uc-Cachón <i>et al.</i> , 2013b).....	20
<b>Figura 1.8.</b> Estructuras de triterpenos aislados de la corteza de <i>D. anisandra</i> (Uc-Cachón <i>et al.</i> , 2012).....	20
<b>Figura 1.9.</b> Estructuras de sesquiterpenos aislados de la corteza de <i>D. anisandra</i> (Arjona-Canul, 2011).....	21
<b>Figura 1.10.</b> Diagrama de estrategia experimental .....	26
<b>Figura 2.1.</b> CCD del fraccionamiento de DC.....	30
<b>Figura 2.2.</b> Diagrama de identificación y aislamiento de compuestos terpénicos en la corteza de <i>D. anisandra</i> .....	31
<b>Figura 2.3.</b> Fraccionamiento para obtener DCs14-15.....	33
<b>Figura 2.4.</b> Fraccionamiento para obtener DCu-5 y DCi-7c .....	34

---

<b>Figura 2.5.</b> Fraccionamiento para obtener DCt-7.....	36
<b>Figura 2.6.</b> Cromatograma de gases de la fracción DCs14-15 .....	37
<b>Figura 2.7.</b> Espectro de fragmentación de masas de DCs14-15.....	38
<b>Figura 2.8.</b> Estructura de 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol .....	38
<b>Figura 2.9.</b> Espectro H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCs14-15 con la estructura de 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando los protones de las señales características .....	39
<b>Figura 2.10.</b> Cromatograma de gases de la fracción DCu-5 .....	41
<b>Figura 2.11.</b> Estructura de <i>D</i> -Friendoolean-14-en-3-ona (taraxerona) .....	41
<b>Figura 2.12.</b> Espectro de fragmentación de masas de DCu-5 .....	42
<b>Figura 2.13.</b> Espectro H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCu-5 con la estructura de taraxerona indicando los protones de las señales características .....	44
<b>Figura 2.14.</b> Espectro 2D COSY de la muestra DCu-5 completo y su acercamiento en la zona con las señales principales.....	45
<b>Figura 2.15.</b> Cromatograma de gases de la fracción DCi-7c .....	47
<b>Figura 2.16.</b> Estructura de taraxerol .....	47
<b>Figura 2.17.</b> Espectro de fragmentación de masas de DCi-7.....	48
<b>Figura 2.18.</b> Espectro H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCi-7c con la estructura de taraxerol indicando los protones de las señales características.....	50
<b>Figura 2.19.</b> Espectro 2D COSY de la muestra DCi-7c. Espectro 2D COSY completo y su acercamiento en la zona con las señales principales. ....	51
<b>Figura 2.20.</b> Estructura del ácido betulínico.....	53
<b>Figura 2.21.</b> Espectro FT-IR de la muestra DCt-7 .....	54

---

---

<b>Figura 2.22.</b> Espectro H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCt-7 con la estructura del ácido betulínico indicando los protones de las señales características .....	55
<b>Figura 2.23.</b> Espectro C <sup>13</sup> -RMN de la muestra DCt-7 con la estructura del ácido betulínico indicando los protones de las señales características .....	58
<b>Figura 2.24.</b> Espectro 2D COSY de la muestra DCt-7. Espectro 2D COSY completo y su acercamiento en la zona con las señales principales .....	59
<b>Figura 3.1.</b> Placas de 96 pocillos en prueba de citotoxicidad.....	64
<b>Figura 3.2.</b> Efecto citotóxico de los compuestos triterpénicos aislados de <i>Diospyros anisandra</i> .....	68
<b>Figura 3.3.</b> Efecto antiviral contra el virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 en ensayo REC de los compuestos triterpénicos aislados de <i>Diospyros anisandra</i> .....	70
<b>Figura 3.4.</b> Estructura de a) taraxerol y b) taraxerona .....	70
<b>Figura 3.5.</b> Estructura de Mahanina y su compuesto metilado en C7, Quercetina y su glucósido en C3, y Curcumina.....	71
<b>Figura 3.6.</b> El sustrato MUNANA escindido por NA para liberar NANA y el compuesto fluorescente MU (Grienke <i>et al.</i> , 2012).. .....	72
<b>Figura 3.7.</b> Cinética enzimática .....	73
<b>Figura 3.8.</b> Actividad enzimática relativa de NA con las muestras obtenidas del extracto hexánico de la corteza de <i>D. anisandra</i> ensayadas a solo una concentración .....	74
<b>Figura 3.9.</b> Comportamiento de la actividad enzimática relativa de NA con la muestra DCt-7 y Quercetina a diferentes concentraciones .....	75
<b>Figura 3.10.</b> Actividad enzimática relativa de NA de Quercetina a 60 µg/mL, mezclas 1:1 de lupeol:taraxerol, 1:1:1 de lupeol:taraxerol:DCt-7 y 1:1 de taraxerol:DCt-7 a 50 µg/mL de cada muestra .....	76



---

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.1.</b> Casos y defunciones positivas a influenza por temporada estacional (Secretaría de Salud, 2021) .....	6
<b>Cuadro 1.2.</b> Frecuencia de resistencia después del tratamiento con antivirales (Mifsud <i>et al.</i> , 2019).....	11
<b>Cuadro 1.3.</b> Terpenos sintéticos con actividad anti-influenza .....	16
<b>Cuadro 1.4.</b> Taxonomía de <i>Diospyros anisandra</i> Blake (California Academy of Sciences, National Geographic Society).....	19
<b>Cuadro 2.1.</b> Peso de hoja, corteza, raíz y ramas secundarias de <i>Diospyros anisandra</i> .....	29
<b>Cuadro 2.2.</b> Fracciones obtenidas de la CLV del extracto hexánico de corteza.....	30
<b>Cuadro 2.3.</b> Comparación de los datos de H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCs14-15 con 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Arjona-Canul, 2011).....	39
<b>Cuadro 2.4.</b> Comparación de los datos de H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCu-5 con taraxerona (Hernández-Chávez, 2011; Tareq <i>et al.</i> , 2009).....	43
<b>Cuadro 2.5.</b> Comparación de los datos de H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCi-7c con taraxerol (Hernández-Chávez, 2011; Tareq <i>et al.</i> , 2009).....	49
<b>Cuadro 2.6.</b> Comparación de los datos del espectro FT-IR de la muestra DCt-7 con Ácido betulínico (SDBS, 2021; Pai <i>et al.</i> , 2011). .....	54
<b>Cuadro 2.7.</b> Comparación de los datos de H <sup>1</sup> -RMN de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (Pérez-Valera,2018; Uc-Cachón, 2012).....	56
<b>Cuadro 2.8.</b> Comparación de los datos de C <sup>13</sup> -RMN de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (Pérez-Valera,2018; Uddin <i>et al.</i> , 2011). .....	57
<b>Cuadro 3.1.</b> Efecto citotóxico y actividad antiviral de los compuestos triterpénicos aislados de <i>Diospyros anisandra</i> .....	69

**Cuadro 3.2.** Valores de concentración de enzima, sustrato y buffer de acuerdo a lo reportado por distintos autores en ensayos de inhibición enzimática empleando NA de *C. perfringens* .....73

## RESUMEN

Los terpenos pertenecen a un grupo numeroso de metabolitos secundarios, algunos de los cuales han presentado actividad antiviral contra la influenza A. *Diospyros anisandra* (Fam. Ebenaceae) es una especie endémica de la península de Yucatán, rica en terpenos; entre los terpenos identificados en estudios previos (1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno, teucdiol A, selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol), ninguno ha sido evaluado contra cepas del virus de influenza A para determinar una posible actividad antiviral. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antiviral contra el virus de influenza A de los terpenoides aislados de corteza de *D. anisandra*.

Para el aislamiento de los terpenos se partió del extracto hexánico de hojas, raíz y corteza de *D. anisandra*, el cual fue fraccionado por diversas técnicas cromatográficas y las fracciones analizadas por CG-EM. Comparando el patrón de fragmentación obtenido en la base de datos del software NIST MS Search 2.0 y en la literatura se identificó en hoja los terpenos betulina y lupeol; en raíz taraxerol, lupeol y  $\beta$ -sitosterol; asimismo, en corteza se identificó 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno en DC; estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol y lupeol en la fracción DC5;  $\gamma$ -sitosterol en DC7; taraxerol en DC6-3; estigmastan-3,5-dieno, estigmasterol y  $\gamma$ -sitosterol en DCf-2; teucdiol A en DCd-1; y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol en DCe-2. Los compuestos 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, ácido betulínico, taraxerol y taraxerona fueron purificados y caracterizados mediante RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, FT-IR y COSY. Los terpenoides  $\gamma$ -sitosterol, estigmasterol, estigmastan-3,5-dieno, taraxerona y taraxerol no se han reportado anteriormente en *D. anisandra*.

Los compuestos taraxerol, taraxerona y la fracción rica en terpenos (DCt-7) fueron evaluados en cuanto a su citotoxicidad (en células MDCK) y actividad antiviral con la cepa del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 empleando el ensayo de reducción del efecto citopático (REC). Como resultado se encontró que ni taraxerol (CI<sub>50</sub> >117.37  $\mu$ M), taraxerona (CI<sub>50</sub> >117.92  $\mu$ M) y DCt-7 (CI<sub>50</sub>>50  $\mu$ g/mL) presentaron actividad citotóxica. Asimismo, en el ensayo REC taraxerol (CE<sub>50</sub> >117.37  $\mu$ M), taraxerona (CE<sub>50</sub> >117.92  $\mu$ M) y DCt-7 (CE<sub>50</sub> >50  $\mu$ g/mL) presentaron baja actividad antiviral.

En el ensayo de inhibición de NA se evaluaron los tres compuestos terpenoides y tres fracciones obtenidos del extracto hexánico de corteza de *D. anisandra*: lupeol (identificado en fracciones

hexánicas de hoja y corteza), taraxerol, taraxerona, DCt7, DCI11-12 (fracción semipura), DCs14-15 (fracción con compuesto mayoritario 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol). Además, como control positivo se empleó Carboxilato de Oseltamivir (CO) y Quercetina (Sigma-Aldrich,  $\geq 95\%$  pureza). Ninguna de las muestras presentó mayor actividad que CO y quercetina, utilizada como control positivo.

.

**ABSTRACT**

Terpenes belong to a large group of secondary metabolites, some of which have shown antiviral activity against influenza A. *Diospyros anisandra* (Fam. Ebenaceae) is an endemic species of the Yucatan peninsula, rich in terpenes; among the terpenes identified in previous studies (1 $\beta$ -hydroxy-4 (15), 5E, 10 (14) -germacatriene, teucdiol A, selin-4 (15) -en-1 $\beta$ , 11-diol, 1 $\beta$ , 6 $\alpha$ -dihydroxy-4 (15) -eudesmen and 7-epi-selin-4 (15) -en-1 $\beta$ , 11-diol), none have been tested against influenza A virus strains for possible antiviral activity. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the antiviral activity against the influenza A virus of the terpenoids isolated from the bark of *D. anisandra*.

For the isolation of the terpenes, we started from the hexane extract of leaves, roots and bark of *D. anisandra*, which was fractionated by various chromatographic techniques and the fractions analyzed by GC-MS. Comparing the fragmentation pattern obtained in the database of the NIST MS Search 2.0 software and in the literature, the terpenes betulin and lupeol were identified in leaves; in root taraxerol, lupeol and  $\beta$ -sitosterol; likewise, in the stem bark 1 $\beta$ -hydroxy-4 (15), 5E, 10 (14) -germacatriene was identified in DC; stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and lupeol in fraction DC5;  $\beta$ -sitosterol at DC7 fraction; taraxerol at DC6-3; stigmastan-3,5-diene, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol in DCf-2; teucdiol A at DCd-1; and 7-epi-selin-4 (15) -en-1 $\beta$ , 11-diol in DCe-2. The compounds 7-epi-selin-4 (15) -en-1 $\beta$ , 11-diol, betulinic acid, taraxerol and taraxerone were purified and characterized by NMR-<sup>1</sup>H, NMR-<sup>13</sup>C, FT-IR and COSY. The terpenoids  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, stigmastan-3,5-diene, taraxerone, and taraxerol have not been previously reported in *D. anisandra*.

The compounds taraxerol, taraxerone and the fraction rich in terpenes (DCt-7) were evaluated for their cytotoxicity (in MDCK cells) and antiviral activity with the influenza virus strain A / Yucatán / 2370/09 H1N1pdm09 using the cytopathic effect reduction (CPE) assay. As a result, it was found that neither taraxerol (IC<sub>50</sub> >117.37  $\mu$ M), taraxerone (IC<sub>50</sub> >117.92  $\mu$ M) and DCt-7 (IC<sub>50</sub> 50  $\mu$ g/mL) presented cytotoxic activity. Likewise, taraxerol (EC<sub>50</sub> >117.37  $\mu$ M), taraxerone (EC<sub>50</sub> >117.92  $\mu$ M) and DCt-7 (EC<sub>50</sub> >25  $\mu$ g/mL) showed low antiviral activity.

In the NA inhibition test, the three terpenoid compounds and three fractions obtained from the hexane extract of *D. anisandra* bark were evaluated: lupeol (identified in hexane fractions of leaf and bark), taraxerol, taraxerone, DCt7, DCI11-12 (fraction semi-pure), DCs14-15 (fraction with majority compound 7-epi-selin-4 (15) -en-1 $\beta$ , 11-diol). In addition, Oseltamivir carboxylate (CO) and Quercetin (Sigma-Aldrich,  $\geq$ 95% purity) were used as positive control. None of the samples presented greater activity than CO and quercetin, used as a positive controls.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

#### 1. INTRODUCCIÓN

La influenza es una infección vírica que afecta principalmente a la nariz, garganta, bronquios y, ocasionalmente, pulmones. El agente causal es un virus perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Existen cuatro tipos de virus de influenza estacional: A, B, C y D (OMS, 2018); de los cuales, los virus tipo A y B son los causantes de las epidemias estacionales (OPS, 2021). Además, la influenza tipo A es la principal causa de influenza en pacientes, aunque la proporción de la tipo B ha aumentado en las últimas décadas (OMS, 2021). En todo el mundo, se estima que estas epidemias anuales causan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedades graves, y entre 290,000 y 650,000 muertes respiratorias (OMS, 2018). En México, en el periodo de la semana epidemiológica 40 del año 2019 a la semana 20 del año 2020, se confirmaron 6,207 casos de influenza y 412 defunciones (Secretaría de Salud, 2021). Además, en el 2009, la cepa A H1N1 alcanzó proporciones pandémicas de entre 100,000 a 400,000 fallecimientos, siendo, la primera pandemia del siglo XXI. Este virus, designado hoy como A H1N1 pdm09, gradualmente pasó a convertirse en un virus estacional a partir de 2010, y como tal continúa circulando hasta la fecha (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Los virus de influenza A se caracterizan por la antigenicidad de su nucleocápside y de sus proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). HA es responsable de la unión a la célula hospedera, así como la fusión entre la envoltura del virión y la célula hospedera; y NA permite la eficiente liberación del virus. Por lo cual, les resulta útil para escapar a la respuesta inmune de sus huéspedes (Dou *et al.*, 2018; Córdova *et al.*, 2010). Debido a las mutaciones constantes del virus, es necesario actualizar la composición de las vacunas constantemente (Yamauchi, 2020). En el caso de los antivirales, existen cuatro medicamentos contra la influenza aprobados por la FDA. Tres son inhibidores de la neuraminidasa y actúan contra los virus de influenza A y B: fosfato de oseltamivir oral, zanamivir por inhalación y peramivir intravenoso. El cuarto medicamento es baloxavir marboxil oral que inhibe la endonucleasa impidiendo la replicación viral (CDC, 2021).

Sin embargo, los virus de influenza A no solo han desarrollado resistencia a los adamantanos, también se ha observado en pruebas clínicas que después del tratamiento con baloxavir, niños

y adultos inmunocompetentes presentan susceptibilidad reducida al baloxavir (CDC, 2021). También, se ha reportado resistencia al oseltamivir entre pacientes con sistema inmunitario gravemente deprimido en hospitales y en la comunidad (CDC, 2021). Además, se ha documentado mutaciones que confieren una menor sensibilidad al oseltamivir en cepas del virus de influenza B (Davidson, 2018).

Existen algunos terpenos que han mostrado importante actividad antiviral, como el terpeno ergosta-7,22-dieno-3 $\beta$ -ol con CE<sub>50</sub> de 0.78  $\mu$ g/mL y lucialdehído B con CE<sub>50</sub> de 3.0  $\mu$ g/mL contra la cepa de influenza A/WSN/33 H1N1 London, aislados de *Ganoderma pfeifferi* Bres. (Niedermeyer *et al.*, 2005). Así como la saponina triterpénica aislada de *Burkea africana* Hook, el ácido 3-O- $\alpha$ -L-Ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xilopiranosil-21-cinamoiloxioleanolico mostró CE<sub>50</sub> 0.05  $\pm$  0.02  $\mu$ M contra la cepa de influenza A/HK/68 H3N2 y CE<sub>50</sub> 0.27  $\pm$  0.13  $\mu$ M contra la cepa de influenza Jena/8178 H1N1 pdm09 (Mair *et al.*, 2018). Además, se han desarrollado derivados de triterpenos que han presentado alta actividad anti-influenza, como lo es el triterpenoide con sustitución 28-amida (el grupo carboxilo C-28 fue sustituido por un grupo CONH<sub>2</sub>) derivado del ácido betulónico y éster de betulina, el cual se evaluó *in vitro* contra la cepa de influenza A/FPV/Rostock/34 H7N1 y obtuvo un CE<sub>50</sub> de 0.7  $\mu$ M y un IS de 1333.3 (Baltina *et al.*, 2003). Otro es la saponina triterpénica pentacíclica, con una sustitución de la cadena lateral 17-COOH del ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil ursólico por una amina aromática (*N*-(2-metoxifenil)-3 $\beta$ -O-[2,4-di-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-urs-12-en-28-amida) con CE<sub>50</sub> 1.05  $\pm$  0.12  $\mu$ M, CI<sub>50</sub> > 1000  $\mu$ M e IS > 952.4 contra la cepa del virus de influenza A/Duck/Guangdong/99 H5N1 (Liao *et al.*, 2019).

Si bien, los metabolitos más estudiados en corteza son de tipo naftoquinonas, aún no se explora el potencial antiviral de sus componentes terpénicos, de los cuales es fuente rica. Un breve estudio de actividad antiviral con lupeol, aislado de la corteza de *D. anisandra* contra los virus de influenza A H1N1 pdm09, dio como resultado que este compuesto inhibía el efecto citopático del virus a nivel pos tratamiento (Datos no publicados). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue el aislamiento de compuestos terpenoides de hoja y corteza de *D. anisandra* y su evaluación antiviral contra el virus de influenza A H1N1 pdm09; así como, la exploración del potencial antineuraminidasa aislada de *Clostridium perfringens*.

El presente trabajo de investigación se organiza de la siguiente manera: el primer capítulo describe el planteamiento del trabajo con antecedentes e información teórica de relevancia al tema de estudio; el aislamiento y caracterización estructural de terpenos y algunas fracciones



semipuras se describe en el segundo capítulo; el tercer capítulo muestra los resultados de la evaluación de la actividad antiviral e inhibición de la neuraminidasa de los compuestos y fracciones ricas en terpenos obtenidos de esta especie; y finalmente, en el cuarto capítulo se discuten los resultados más relevantes, así como las conclusiones y perspectivas del trabajo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Influenza

La influenza es una infección vírica que afecta principalmente a la nariz, garganta, bronquios y, ocasionalmente, pulmones. El agente causal de la influenza es un virus perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Existen cuatro tipos de virus de influenza: A, B, C y D. Los causantes de las epidemias estacionales son los virus tipo A y B.

- Los virus tipo A (género *Alphainfluenzavirus*), se clasifican en subtipos en función de las combinaciones de las dos proteínas de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Los subtipos actualmente circulantes en humanos son A H1N1 y A H3N1. El subtipo A H1N1 también se conoce como A H1N1 pdm09, pues fue el causante de la pandemia de 2009 y posteriormente sustituyó al virus de influenza A H1N1 que circulaba hasta entonces.
- Los virus tipo B, (género *Betainfluenzavirus*), no se clasifican en subtipos, pero los circulantes actualmente pueden dividirse en dos linajes: B/Yamagata y B/Victoria.
- Los virus tipo C (género *Gammainfluenzavirus*), se detectan con menos frecuencia y suelen causar infecciones leves, por lo que carecen de importancia desde el punto de vista de la salud pública.
- Los virus tipo D (género *Deltainfluenzavirus*), afectan principalmente al ganado y no parecen ser causa de infección ni enfermedad en el ser humano (OPS, 2021; ICTV, 2020; OMS, 2018).

En todo el mundo, los virus de influenza A estacionales continúan representando la mayor causa de infecciones víricas por influenza en pacientes, aunque la proporción de virus de influenza B ha aumentado en las últimas décadas. En una prueba de recolección de datos obtenidos en 85 países, realizada por los laboratorios del Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza (GISRS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) evaluaron más de 291,427 muestras durante el período de tiempo del 1 de marzo al 14 de marzo de 2021, donde 375 muestras fueron positivas para virus de influenza, de los cuales 132 (35.2%) se tipificaron como influenza A y 243 (64.8%) como influenza B. De los virus de influenza A subtipificados, cinco (6.1%) fueron influenza A H1N1 pdm09 y 77 (93.9%) fueron influenza A H3N2. De los virus B caracterizados el 100% pertenecía al linaje B-Victoria (OMS, 2021).

Dentro de la influenza A se ha descrito al momento 18 subtipos de HA y 11 de NA. Existen potencialmente 198 combinaciones y solo se han detectado 131 subtipos en la naturaleza. Los virus de influenza A H3N2 tienden a cambiar con mayor rapidez, tanto genética como antigénicamente, formando varios clados independientes y diferentes desde el punto de vista genético. Los virus H1N1 han experimentado una gran cantidad de cambios genéticos y cambios en cuanto a sus propiedades antigénicas con el paso del tiempo (CDC, 2021). Se sabe que los virus tipo A infectan una amplia variedad de aves y mamíferos (Lycett *et al.*, 2019).

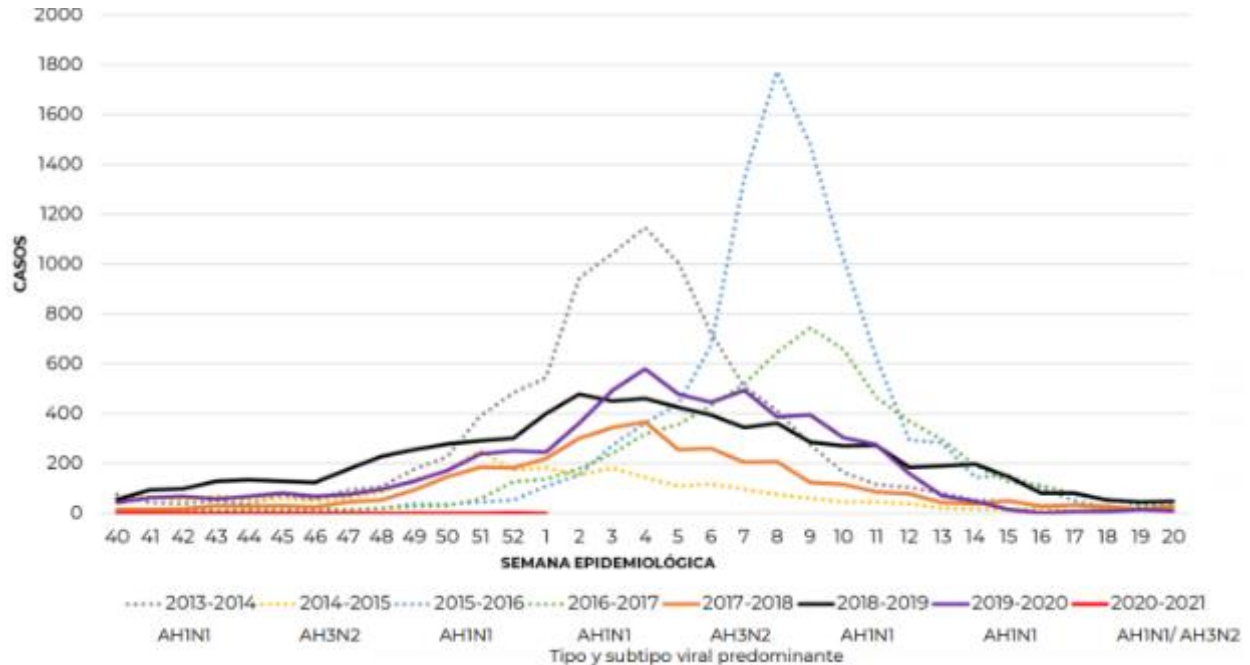
Por otra parte, los virus de influenza B por lo general cambian más lentamente respecto de sus propiedades genéticas y antigénicas que los virus de influenza A. Los datos de vigilancia de la influenza de los últimos años muestran una circulación de ambos linajes. No obstante, la proporción de virus de influenza B de cada linaje que circula varía según la ubicación geográfica (CDC, 2021). Los virus de influenza tipo B y C solo infectan a humanos. Mientras que el virus tipo D se informó por primera vez en el año 2011 en cerdos y luego se identificó en bovinos, ovinos y caprinos (Singh *et al.*, 2018).

En el siglo pasado, se presentaron tres pandemias denominadas: Influenza Española (1918) en Europa, la más devastadora de todas con la aparición del virus H1N1, que coincidió con el final de la Primera Guerra Mundial y se estima que infectó a 500 millones de personas y entre 20 y 100 millones de muertes en todo el mundo; seguida de la influenza Asiática (1957) en el este de Asia cuando el virus H1N1 fue reemplazado por H2N2 con 1 a 2 millones de muertes en todo el mundo; y en la influenza de Hong Kong (1968) el virus fue reemplazado por H3N2, causó cerca de 1 millón de muertes. En 1977 reapareció el subtipo H1N1 en Tiajín, China llamada la gripe Rusa o gripe Soviética, pero no reemplazó al subtipo circulante H3N2, sino que ambos subtipos circulan hasta nuestros días (Gutiérrez *et al.*, 2020; CDC, 2021; Arias y López, 2009; Barricarte, 2006; OMS, 1999).

En el 2009, la primera pandemia del siglo XXI, la cepa A H1N1 alcanzó proporciones pandémicas con una mortalidad entre 100,000 a 400,000 personas. Este virus, designado hoy como A H1N1 pdm09, gradualmente pasó a convertirse en un virus estacional a partir de 2010 y como tal continúa circulando hasta la fecha (Gutiérrez *et al.*, 2020).

En el año 2018, la influenza ocupó el quinto lugar en causas de mortalidad en México; de estos, el tercer lugar en niños de 1 a 4 años y en personas de 15 años en adelante; y el segundo en niños de 5 a 14 años (Secretaría de Salud, 2021). En el **Cuadro 1.1** se observa el número de

casos y defunciones confirmados de influenza a nivel nacional, agrupados anualmente de la semana epidemiológica 40 a la 20, y en la **Figura 1.1** se compara cada temporada estacional de acuerdo a sus causas confirmadas (Secretaría de Salud, 2021).



**Figura 1.1.** Gráfica de la curva epidémica de casos confirmados a influenza por semana epidemiológica en México (Secretaría de Salud, 2021).

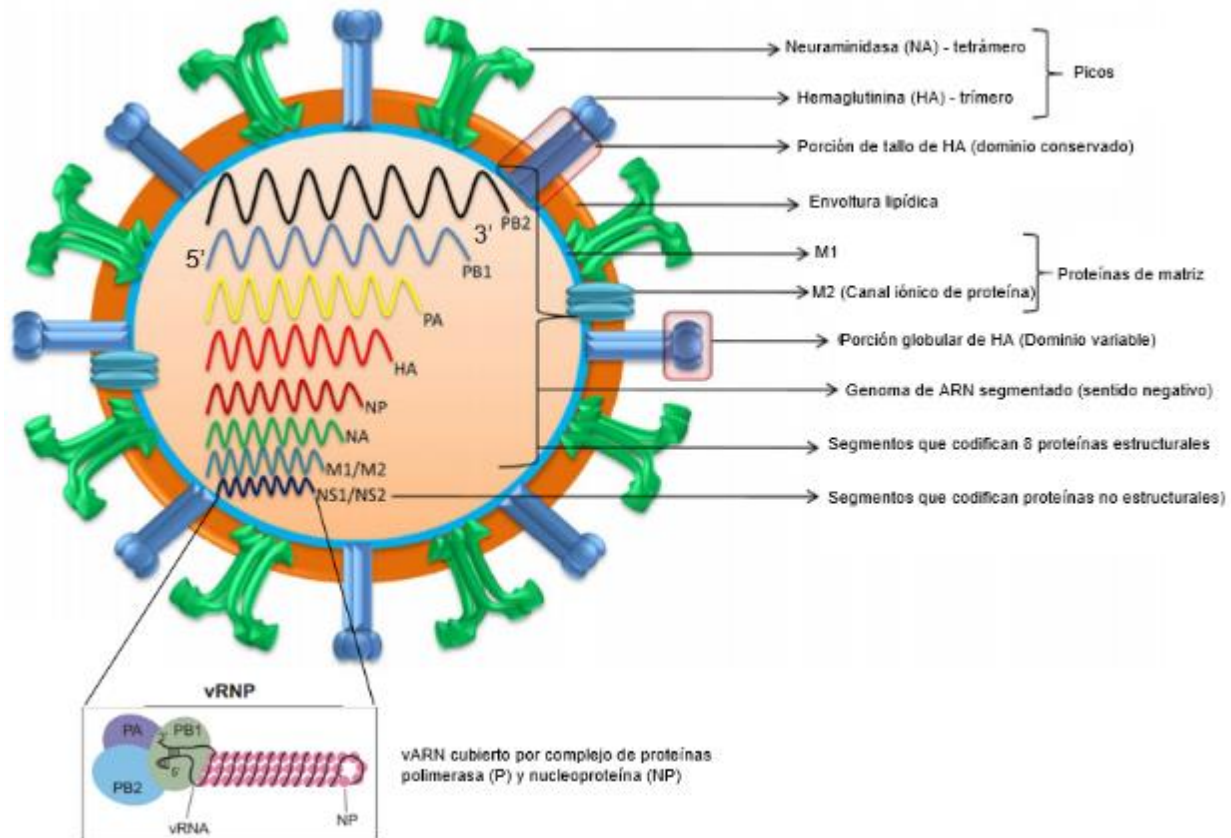
**Cuadro 1.1.** Casos y defunciones positivas a influenza por temporada estacional (Secretaría de Salud, 2021).

<i>Evento</i>	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	2019-2020
<i>Casos influenza</i>	7,317	2,945	9,131	2,836	9,641	6,371	3,692	7,467	6,207
<i>Defunciones</i>	345	60	1,112	85	703	528	160	848	412

### 2.1.1. Estructura del virus de Influenza A

Los virus de influenza A, morfológicamente, pueden formar esferas de ~100 nm de diámetro o filamentos de hasta 20 µm de longitud. Varios estudios han atribuido el cambio de morfología a la proteína matriz 1 (M1). Los virus de influenza A y B poseen una membrana lipídica con algunas proteínas derivadas del hospedador, denominada envoltura. La envoltura contiene en la superficie las proteínas de membrana viral, en mayor abundancia, HA, seguido de NA y, en menor medida la proteína de matriz 2 (M2). La proteína M1 da soporte a la envoltura, y en el interior, se encuentra la nucleocápside formada de ocho segmentos de ARNv envueltos por los complejos de ribonucleoproteína viral individual (vRNP). Los vRNP están compuestos de

nucleoproteína viral (NP) y complejos de polimerasas básicas (PB1 y PB2) y acida (PA). Las polimerasas unen a los ARNv en una horquilla helicoidal que resulta del emparejamiento de bases entre los extremos conservados semicomplementarios 5' y 3' (Dou *et al.*, 2018) (**Figura 1.2**). El tamaño de los segmentos de ARN varía de 890 nucleótidos hasta 2,350 nucleótidos, según cada polipéptido, y poseen polaridad negativa (-) (Carrada-Bravo, 2010).



**Figura 1.2.** Esquema del virus de influenza A. El virus de influenza posee ocho segmentos de ARN en sentido negativo, los cuales codifican ocho proteínas estructurales y al menos dos proteínas no estructurales (imagen modificada de: Dou *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018). Cada segmento de ARN se encuentra asociado con el complejo de la polimerasa (las proteínas PB1, PB2 y PA) y con monómeros de la NP, formando lo que se denominan ribonucleoproteínas virales (vRNP). El virus está cubierto por la membrana (envoltura lipídica), representada de color naranja, y la capa de proteína M1, en color azul; donde se localizan las proteínas asociadas a la membrana: HA, NA, M1 y M2 (Ortín, 2009).

Los genes ARNv del uno al seis son monocistronicos (contienen información para una sola cadena polipeptídica), siete y ocho sintetizan dos péptidos cada uno, en total el virión puede sintetizar diez péptidos funcionales (PA, PB1 y PB2, las proteínas HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2) (Carrada-Bravo, 2010), en total el genoma tiene 13,588 nucleótidos. Todos los segmentos tienen en sus extremos 5' y 3' regiones con las señales de unión para la ARN polimerasa del

virus, así como las señales necesarias para la encapsulación (empaquetamiento) del genoma viral (Arias y López, 2009).

El virus de influenza A se caracteriza por la antigenicidad de su nucleocápside y de sus proteínas de matriz (Córdova *et al.*, 2010). La proteína mejor caracterizada de los virus de influenza A es HA, dividida en dos dominios HA1 (de mayor tamaño e inmunodominante) y HA2 (mayor conservación de secuencia), creados por proteólisis. HA tiene dos funciones principales: iniciar la unión a la célula huésped mediante el receptor de HA1; y entregar los vRNP al citosol de la célula huésped fusionando la membrana viral y del endosoma, mediante el péptido de fusión en HA2 (Dou *et al.*, 2018).

La neuraminidasa (NA) es una sialidasa cuya función es remover los ácidos siálicos (AS) de las glicoproteínas virales de los virus recién sintetizados y los de la superficie celular, para permitir la eficiente liberación del virus. También, remueve los AS de la capa de mucina que recubre a las células epiteliales, permitiendo al virus llegar a sus células blanco. Y la proteína M2, presente solo en los virus de influenza A, funciona como canal iónico permitiendo la entrada de protones al interior de la partícula viral, lo que promueve la disociación de las nucleoproteínas que se encuentran unidas al genoma viral y la liberación de éste para que sea importado al núcleo e inicie su replicación (Carrada-Bravo, 2010).

### **2.1.2. Epidemiología**

La influenza es una enfermedad respiratoria contagiosa provocada por los virus de la influenza, este virus puede causar una enfermedad leve o grave y en ocasiones puede llevar a la muerte (CDC, 2021). El virus de influenza A no se puede replicar por sí solo, por lo que necesita de una célula huésped, las cuales las encuentra en el tracto respiratorio humano, el virus normalmente ingresa al organismo por nariz o boca. El ciclo de replicación del virus en la célula huésped se puede describir en 4 etapas: (1) adherencia y entrada, (2) replicación del ARN, (3) traducción y transporte de proteínas, y (4) ensamblado y liberación del virión (Carter y Venetia, 2013).

Al toser o estornudar, las personas infectadas dispersan en el aire, a distancias de hasta 1 metro, gotículas infecciosas (con virus), infectando así a las personas cercanas que inhalan esas gotículas. El virus también puede transmitirse por manos contaminadas al tocarnos la boca, nariz u ojos. En los climas templados las epidemias estacionales se producen sobre todo durante el invierno, mientras que en las regiones tropicales pueden aparecer durante todo el año, produciendo brotes más irregulares (OMS, 2018). En una localidad determinada, generalmente

la epidemia de influenza comienza de manera abrupta, alcanza su pico en tres semanas y termina en ocho más (Córdova *et al.*, 2010). Un estudio en población estadounidense sugiere que, en promedio, cerca del 8% de la población estadounidense contrae influenza cada temporada, con un rango de entre 3% y el 11%, según la temporada (CDC, 2021).

El periodo de incubación (tiempo transcurrido entre la infección y la aparición de la enfermedad) es de unos 2 días, pero oscila entre 1 y 4 días. (OMS, 2018). Las complicaciones por influenza pueden incluir neumonía bacteriana, infecciones del oído, sinusitis y agravamiento de las afecciones crónicas, como insuficiencia cardiaca congestiva, asma o diabetes (CDC, 2021).

En relación a la epidemiología del virus de influenza puede verse afectado cualquier grupo de edad, aunque unos corren más riesgos que otros. Las personas con mayor riesgo de enfermedad grave o complicaciones son embarazadas, menores de 59 meses, ancianos mayores de 65 años y pacientes con enfermedades crónicas (cardíacas, pulmonares, renales, metabólicas, del desarrollo neurológico, hepáticas o hematológicas) o inmunodepresión (por VIH/sida, quimioterapia, corticoterapia o neoplasias malignas) (OMS, 2018).

### **2.1.3. Tratamientos**

La primera forma de protección contra el virus de influenza es la vacunación, la efectividad de las vacunas contra la influenza varía según varios factores, como la edad y la salud del receptor, los tipos y subtipos de virus de influenza circulantes y el grado de similitud entre los virus circulantes y los incluidos en la vacuna. Sin embargo, la vacunación proporciona una protección importante contra la enfermedad de la gripe y sus posibles complicaciones (Grohskopf *et al.*, 2019).

Actualmente, existen cuatro antivirales contra la influenza aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Tres fármacos, que además, han recibido aprobación en Europa, Canadá, Australia, Japón, Taiwán y Corea, conocidos como inhibidores de NA, actúan imitando la unión del ácido siálico en el sitio activo de NA en los virus de influenza A y B: oseltamivir (disponible en versión genérica o con el nombre comercial Tamiflu®) administrado vía oral como el profármaco fosfato de oseltamivir, que se convierte en su forma carboxilato activo en el hígado; zanamivir (nombre comercial Relenza®) se inhala en forma de polvo (lo que limita su uso en personas con problemas respiratorios subyacentes); y peramivir (nombre comercial Rapivab®) se administra por vía intravenosa, lo que es importante para los pacientes que han sido hospitalizados (CDC, 2021; Krammer *et al.*, 2018). El oseltamivir

y el zanamivir son eficaces para la profilaxis y la profilaxis posterior a la exposición con individuos enfermos (Krammer *et al.*, 2018).

La mutación H275Y en NA viral ha causado resistencia al oseltamivir entre pacientes con sistema inmunitario gravemente deprimido en hospitales, y en la comunidad, pero actualmente al parecer es algo inusual (CDC, 2021). Además, se han informado mutaciones que confieren una menor sensibilidad al oseltamivir en cepas del virus de influenza B (Davidson, 2018). El oseltamivir actúa por medio de su grupo hidrofóbico 3-pentiloxi que induce a una reposición de la cadena lateral Glu276 para lograr interacciones hidrofóbicas óptimas, esto se logra por reordenamientos causados por el aminoácido E276 que gira y se une a R224. La mutación H275Y inhibe esta rotación del residuo E276 evitando así la formación de estos sitios de unión y bloqueando los cambios conformacionales de la cadena lateral, por lo tanto, reduce la eficacia de unión al fármaco del oseltamivir (Davidson, 2018; Zuyuan *et al.*, 2015). Mientras que el resto de glicerol hidrofílico en zanamivir interactúa en Glu276 a través de hidrógeno unido, sin requerir reordenamiento conformacional. La mutación H275Y no causa resistencia al zanamivir. Por otra parte, como el peramivir comparte la interacción hidrofoba Glu276 al igual que el oseltamivir, la mutación H275Y también puede reducir la sensibilidad al peramivir (Zuyuan *et al.*, 2015).

El cuarto medicamento es el baloxavir marboxil oral (nombre comercial Xofluza®), aprobado por la FDA en octubre de 2018 para usar en Estados Unidos durante la temporada 2018-2019, actúa contra los virus de influenza A y B. Baloxavir es un inhibidor de la endonucleasa dependiente de la cápsula que interfiere en la transcripción del ARN viral e impide la reproducción del virus. Pero, se ha observado en pruebas clínicas que después del tratamiento con baloxavir, se genera una susceptibilidad reducida (CDC, 2021). Se estima una mutación I38T en el sitio de endonucleasa que puede surgir durante el tratamiento, reduciendo significativamente la susceptibilidad al fármaco (Wandzik *et al.*, 2020). En el **Cuadro 1.2** se muestra una comparación de la frecuencia de resistencia después del tratamiento con algunos antivirales contra la influenza.



**Cuadro 1. 2.** Frecuencia de resistencia después del tratamiento con antivirales (Mifsud *et al.*, 2019).

Compuesto antiviral	Grupo de edad del paciente	Virus de influenza predominante	Frecuencia de mutación	Aminoácido sustituido
<i>Rimantadina</i>	1-15 años	Influenza A	27% (10/37)	M2/S31N
	17-75 años	Influenza A	39.3% (26/66)	M2/S31N
<i>Oseltamivir</i>	1-5 años	A H1N1 pdm09	16.1% (20/124)	NA/H275Y
		A H3N2	7.7% (10/129)	NA/R292K
		Influenza B	0% (0/40)	
	>5 años	A H1N1 pdm09	1.7% (7/403)	NA/H275Y
		A H3N2	1.2% (6/506)	NA/R292K
		Influenza B	0% (0/178)	
<i>Baloxavir</i>	<12 años	A H1N1 pdm09	0% (0/2)	
		A H3N2	19.5% (15/77)	PA/I38T, PA/I38M
		Influenza B	0% (0/6)	
	>12 años	A H1N1 pdm09	3.6% (4/112)	PA/I38T, PA/I38F
		A H3N2	10.9% (36/330)	PA/I38T
		Influenza B	0.8% (1/131)	PA/I38T
<i>Pimodivir</i>	18-65 años	Influenza A	6.4% (11/172)	PB2/S324K/N/R, PB2/F325I, PB2/S337P, PB2/K376N/R, PB2/T378S, PB2/N510T

Otro medicamento antiviral, aprobado en Japón en el 2011 contra el virus de influenza que involucra cepas resistentes a los antivirales disponibles, es el favipiravir (T-705), que inhibe la ARN polimerasa dependiente de ARN de múltiples virus de ARN. Al igual que los otros antivirales, tienen el potencial de causar efectos secundarios indeseables, incluidos eventos psiquiátricos o neurológicos inusuales como alucinaciones, confusión, delirio y comportamiento anormal, principalmente en niños, aunque estos son casos raros (Ju *et al.*, 2017).

#### 2.1.4. Extractos vegetales como alternativa para el tratamientos contra Influenza

De acuerdo con Porter y Bode (2017), la resistencia viral puede desarrollarse fácilmente con el uso de medicamentos que se utilizan de forma innecesaria o preventiva, especialmente en dosis bajas durante largos periodos de tiempo. Por lo que, el empleo de extractos vegetales con efectos preventivos podría ser una alternativa en el tratamiento de influenza.

Ejemplo de extractos vegetales para tal uso son los extractos de *Sambucus nigra L.* (anciano negro) (Porter y Bode, 2017). Otro extracto vegetal es de las raíces de *Eleutherococcus senticosus* de la familia *Araliaceae*, el cual mostró actividad antiviral contra influenza A H1N1 mediante la inhibición de la replicación del virus de influenza en cultivos celulares infectados por el virus (Akram *et al.*, 2018; Glatthaar-Saalmüller *et al.*, 2001).

También, el fitofarmaco Antiwei (compuesto por diversas especies vegetales) de la receta tradicional china reduce la pirexia en pacientes con influenza. En ensayos clínicos Antiwei aumentó la recuperación de los pacientes con influenza A y B en un 17%, y redujo la gravedad de la enfermedad de acuerdo a los síntomas (fiebre, tos y expectoración) en un 50% en comparación con el placebo (Lei *et al.*, 2010).

## 2.2. Terpenos

Los terpenos se caracterizan por tener en su estructura la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas de 2-metil-1,3-butadieno (isopreno), según formen parte de su esqueleto hidrocarbonado 1, 2, 3, 4, 5, 6 u 8 unidades pentacarbonadas (C<sub>5</sub>). Todas las plantas sintetizan una gama diversa de metabolitos terpenoides, algunos son producto de taxones específicos. Actualmente, se conocen más de 80,000 compuestos terpénicos, y se sospecha la existencia de muchos más (Zhou y Pichersky, 2020). Los terpenoides comprenden la clase de sustancias químicas más grande, estructural y funcionalmente diversa de los organismos vivos (Rouf-Wani *et al.*, 2021). Además, debido a las modificaciones bioquímicas de dichas moléculas se ha generado el uso del término “terpenoide”, ya que la terminación -eno denota hidrocarburos (Marcano y Hasegawa, 2002).

La frecuencia y abundancia de los terpenoides están íntimamente ligados a factores genéticos y climáticos (Marcano y Hasegawa, 2002). Las plantas emiten cantidades elevadas de terpenos al aumentar la luz y la temperatura, así como en situaciones de contaminación atmosférica y sequía moderada (Ormeño y Fernández, 2012). Son compuestos de bajo peso molecular, con olor poco

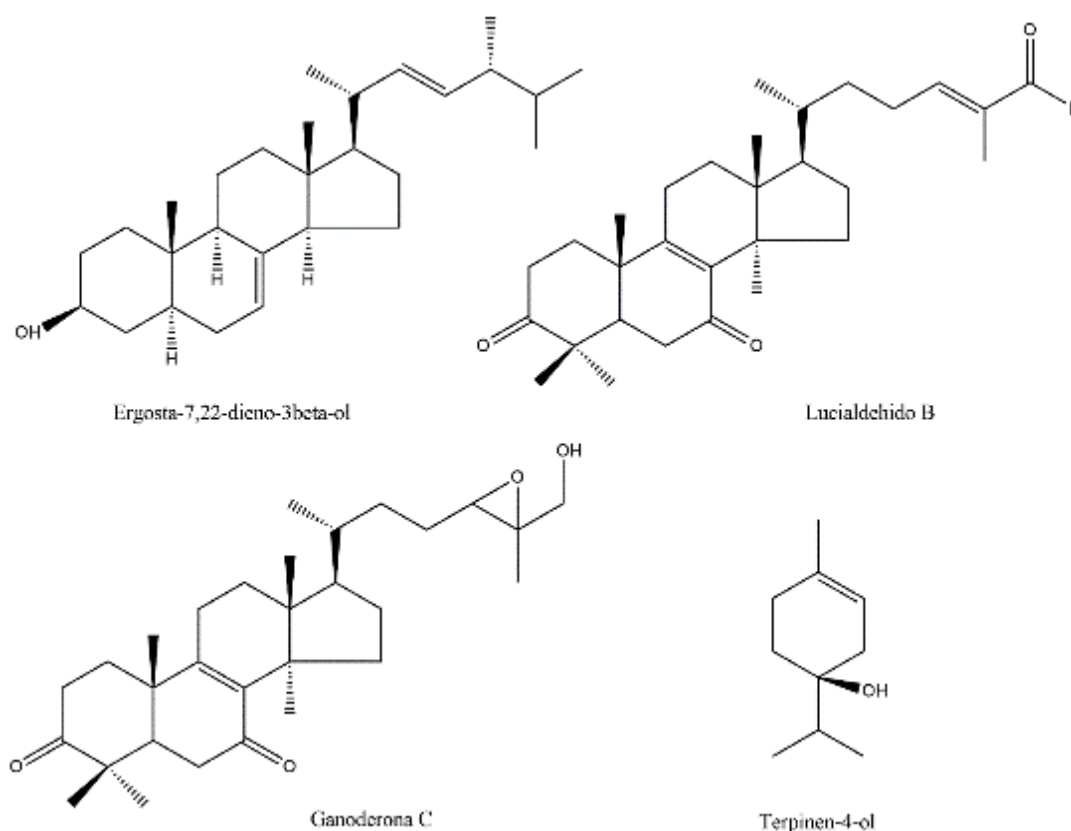
intenso para el olfato humano (Ormeño y Fernández, 2012), suelen ser insolubles en agua (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009), pueden ser o no volátiles (Tholl, 2006) y son los principales componentes de los aceites esenciales (Rouf-Wani *et al.*, 2021). Además, la inmensa mayoría de los terpenos son compuestos específicos del reino vegetal, pero también pueden encontrarse en organismos marinos como es el caso de los diterpenos, incluidos algas, esponjas, corales, moluscos y peces (Gershenzon y Dudareva, 2007).

Los terpenos desempeñan funciones como hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardíacos), látex y aceites esenciales (proporcionan olor y sabor característico de las plantas). Aunque las citocininas y clorofilas no son terpenos contienen en su estructura una cadena lateral terpenoide (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009). Así mismo, la gran mayoría de los terpenos sirven en una multitud de roles ecológicos, como monoterpenos volátiles atrayendo polinizadores; sesquiterpenos en aromas florales (Zhou y Pichersky, 2020); agentes de defensa de la planta, ya sea como fitoalexinas, antialimentarios de insectos; están implicados en la atracción de depredadores de herbívoros; y protegen contra el estrés fotooxidativo en la medición de termotolerancia (Tholl, 2006). También, los terpenos volátiles actúan como medio de comunicación entre organismos, mutualista, involucrados en interacciones mutuamente beneficiosas (Gershenzon y Dudareva, 2007). Por otra parte, en el comercio, muchos terpenoides son usados como aromas y fragancias en la alimentación y cosmética, también ayudan a mejorar la calidad de productos agrícolas y presentan gran importancia medicinal (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009).

### 2.2.1. Actividad anti-influenza de terpenos

Diversos estudios han descubierto terpenos de origen natural y sintético con actividad anti-influenza. Uno de ellos son los triterpenos aislados del hongo *Ganoderma pfeifferi* Bres. (**Figura 1.3**), de los cuales destaca su actividad anti-influenza A en concentraciones no tóxicas. Como lo es, el compuesto ergosta-7,22-dieno-3 $\beta$ -ol, lucialdehido B y ganoderona C presentaron actividad anti-influenza con valores de CE<sub>50</sub> de 0.78  $\mu$ g/mL, 3.0  $\mu$ g/mL y 2.6  $\mu$ g/mL contra la cepa de influenza A/WSN/33 H1N1 London. Este último compuesto fue identificado de cuerpos fructíferos recién recolectados. Los tres compuestos tuvieron mejor actividad anti-influenza que el sulfato de amantadina (CE<sub>50</sub> de 15.0  $\mu$ g/mL) evaluado en este trabajo (Niedermeyer *et al.*, 2005).

En otro estudio con extractos vegetales se evaluó la actividad anti-influenza A H1N1 del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* y seis terpenos aislados de este árbol. Del aceite esencial se obtuvo  $CE_{50}$  de 0.0006 %v/v y  $CI_{50}$  de 0.025 %v/v (IS de 42), y de los seis componentes presentes en esta especie, destacó la actividad del terpinen-4-ol con  $CE_{50}$  0.0025 %v/v y  $CI_{50}$  0.05 %v/v (IS de 20) (**Figura 1.3**), lo que indica que la actividad del aceite esencial ha sido principalmente atribuido a este compuesto como principal componente activo pero teniendo mayor efecto como aceite (Garozzo *et al.*, 2009). En otros ensayos se indica que el aceite esencial de *M. alternifolia* y terpinen-4-ol interfieren en una etapa temprana del ciclo de replicación viral del virus de influenza (Garozzo *et al.*, 2011).



**Figura 1.3.** Estructuras de tres triterpenos aislados de *Ganoderma pfeifferi* y un monoterpene de *Melaleuca alternifolia* (Garozzo *et al.*, 2011; Niedermeyer *et al.*, 2005).

Por otra parte, las saponinas triterpénicas aisladas del árbol de *Burkea africana* Hook (*Leguminosae*) así como su extracto, mostraron actividad anti-influenza contra el virus de influenza H3N2. En el ensayo de reducción del efecto citopático (REC) en células MDCK para el extracto de *B. africana* se obtuvo una  $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  y  $CE_{50} 5.5 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ . Del extracto etanólico de la corteza de *B. africana* se aislaron 8 saponinas triterpénicas con estructura base de lupano y oleanano, y sustituyentes *D*-glucosa, *L*-ramnosa, *D*-xilosa y además el ácido

cinámico. Los 8 compuestos y sus agliconas se evaluaron en ensayo REC contra las cepas del virus de influenza A/HK/68 H3N2 y Jena/8178 H1N1 pdm09. Destacando el ácido 3-O- $\alpha$ -L-Ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xilopiranosil-21-cinamoiloxioleanólico con  $CI_{50}$  de  $1.5 \pm 0.80 \mu\text{M}$ ,  $CE_{50}$  de  $0.05 \pm 0.02 \mu\text{M}$  para H3N2 y de  $0.27 \pm 0.13 \mu\text{M}$  para H1N1 pdm09, IS de 31 para H3N2 y de 6 para H1N1 pdm09; y el ácido 3-O- $\alpha$ -L-Ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]-  $\beta$ -D-xilopiranosil-21-cinamoiloxioleanólico con  $CI_{50}$  de  $1.2 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ,  $CE_{50}$  de  $0.17 \pm 0.18 \mu\text{M}$  para H3N2 y de  $0.16 \pm 0.07 \mu\text{M}$  para H1N1 pdm09, y IS de 7 para H3N2 y de 7 para H1N1 pdm09. En comparación con su aglicona, ácido 21-cinamoiloxi-oleanólico, que mostró  $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ ,  $CE_{50}$  de  $8.9 \pm 3.95 \mu\text{M}$  para H3N2 y de  $6.8 \pm 4.12 \mu\text{M}$  para H1N1 pdm09, IS  $> 11$  para H3N2 y  $> 15$  para H1N1 pdm09. El compuesto aglicona demuestra una citotoxicidad menor pero con actividad más baja (Mair *et al.*, 2018).

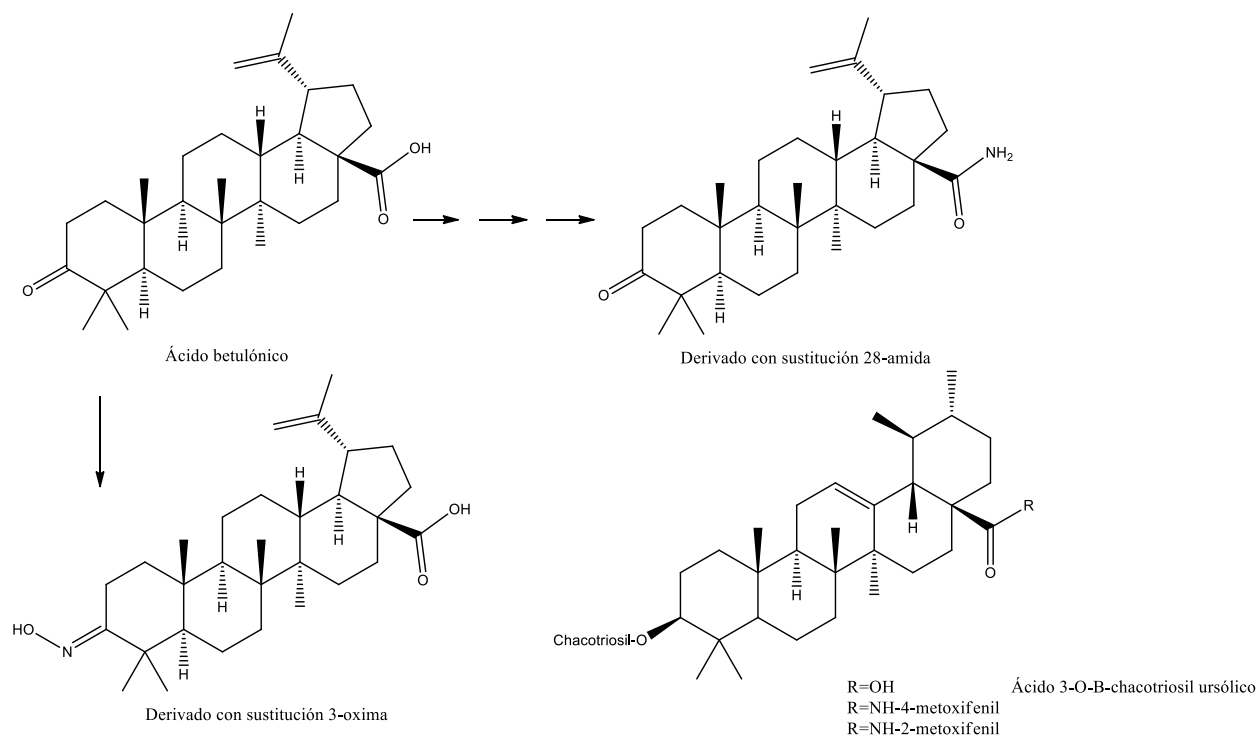
Algunos otros terpenoides que presentaron actividad contra el virus de influenza A H1N1, son: germacrona con IS  $> 41$  y  $CE_{50}$  de  $6.03 \mu\text{M}$ ; eugenol con  $CE_{50} < 3.1 \mu\text{g/mL}$ ; y carvacrol con IS  $< 0.15$  y  $CE_{50}$  de  $2.6 \mu\text{g/mL}$  (Rouf-Wani *et al.*, 2021). Así también, eugenol aislado de *Syzygium aromaticum* y evaluado en ensayos *in vitro* contra cepas del virus de influenza A H1N1, H3N2, H9N2 y H5N1 presento actividad anti-influenza, el cual interrumpe la replicación viral, inhibe o reduce la interacción de las proteínas NA y HA, y prolonga la proliferación celular; germacrona aislado de *Eryngium maritimum* evaluado en ensayos *in vitro* e *in vivo* contra el virus de influenza A H1N1, H3N2 e influenza B, interfiere en la transcripción y en la unión de las proteínas del virus antes y durante el proceso infeccioso; patchoulol aislado de *Pogostemon cablin* en ensayos *in vitro* e *in vivo* contra el virus de influenza A H1N1, H2N1, H3N2 e Influenza B interrumpe la replicación viral, e inhibe o reduce la interacción de las proteínas NA y H;  $\beta$ -santalol aislado de *Santalum album*, en ensayos *in vitro* contra el virus de influenza A H3N2 y H1N1 interactúa con el proceso de traducción del genoma viral para reducir la cantidad de ARNm producido; terpinen-4-ol aislado de *Melaleuca alternifolia*,  $\alpha$ -terpineol aislado de *Pinus sylvestris*, y terpinoleno aislado de *Syringa vulgaris*, en ensayos *in vitro* contra el virus de influenza A H1N1, interfieren en la acidificación del virus en la célula (Al-Salihi y Alberti, 2021).

También se ha evaluado la actividad anti-influenza de compuestos terpenoides modificados químicamente, algunos se muestran en el **Cuadro 1.3**. De los derivados de terpenos encontrados en la literatura, destaca el triterpenoide con sustitución 28-amida (el grupo carboxilo C-28 fue sustituido por un grupo  $\text{CONH}_2$ ) derivado del ácido betulónico, que a su vez fue derivado de betulina; y el triterpenoide con sustitución 3-oxima (el hidrógeno C-3 fue sustituido por un grupo NOH) derivado directo del ácido betulónico (**Figura 1.4**); ambos se evaluaron *in vitro* contra la

cepa del virus de influenza A/FPV/Rostock/34 H7N1. En este mismo ensayo, también se evaluó ácido betulónico mostrando alta toxicidad con  $CE_{50}$  de 5.7  $\mu\text{M}$  y IS de 9.6, así mismo, ácido betulínico mostró baja actividad,  $CE_{50}$  de  $>219 \mu\text{M}$  y IS de  $<1$  (Baltina *et al.*, 2003). Otros compuestos que destacan en el **Cuadro 1.3** por su actividad anti-influenza son las saponinas triterpénicas pentacíclicas, los cuales consisten en una sustitución de la cadena lateral 17-COOH del ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil ursólico por una amina aromática (**Figura 1.4**). Destacando contra cepas de influenza A/Duck/Guangdong/99 H5N1 el triterpénico *N*-(4-metoxifenil)- $\beta$ -O-[2,4-di-O-(*a*-L-ramnopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-urs-12-en-28-amida y *N*-(2-metoxifenil)- $\beta$ -O-[2,4-di-O-(*a*-L-ramnopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-urs-12-en-28-amida, este último compuesto además bloquea la interacción del virus con el receptor del ácido siálico, proteína HA, impidiendo la entrada del virus a la célula (Liao *et al.*, 2019).

**Cuadro 1.3.** Terpenos sintéticos con actividad anti-influenza.

Terpeno	Derivado de	Influenza	$EC_{50}$	$IC_{50}$	IS	Referencia
Ácido betulónico	Betulina	Tipo A H7N1	5.7 $\mu\text{M}$		9.6	Baltina <i>et al.</i> , 2003
Triterpenoide 28-amida	Ácido betulónico y este de betulina	Tipo A H7N1	0.7 $\mu\text{M}$	933.31 $\mu\text{M}$	1333.3	Baltina <i>et al.</i> , 2003
Triterpenoide con oxima de aldehído	Ácido betulónico y betulina	Tipo A	2.2 $\mu\text{M}$		392.2	Baltina <i>et al.</i> , 2003
Triterpeno lupano con 2,3-secoaldoxima	Ácido betulónico	Tipo A	22.7 $\mu\text{M}$		35.4	Grishko <i>et al.</i> , 2014
Triterpeno lupano con cetoxina	Ácido betulónico	Tipo A	12.9 $\mu\text{M}$		64.1	Grishko <i>et al.</i> , 2014
Diaza-adamantano con resto de monoterpeno	Diaza-adamantano con citronelaico	Tipo A H1N1	8 $\pm$ 2 $\mu\text{M}$	239 $\pm$ 21 $\mu\text{M}$	30	Suslov <i>et al.</i> , 2017
Cumarina con monoterpeno	Umbeliferona con (-) – mirtenol	Tipo A H1H1pdm09	36 $\pm$ 5 $\mu\text{M}$	982 $\pm$ 47 $\mu\text{M}$	28	Khomenko <i>et al.</i> , 2017
Cumarina con monoterpeno	Umbeliferona con nopol	Tipo A H1H1pdm09	21 $\pm$ 3 $\mu\text{M}$	$> 857 \mu\text{M}$	41	Khomenko <i>et al.</i> , 2017
Triterpenoide de lupano con amida	Ácido betulónico nitrogenado	Tipo A H1N1	10 $\mu\text{M}$	$> 200 \mu\text{M}$	20	Smirnova y Kazakova, 2018
Saponina triterpénica pentacíclica 4-metoxifenil	Ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil ursólico	Tipo A H5N1	2.12 $\pm$ 0.33 $\mu\text{M}$	$> 1000 \mu\text{M}$	$> 471.7$	Liao <i>et al.</i> , 2019
Saponina triterpénica pentacíclica 2-metoxifenil	Ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil u.	Tipo A H5N1	1.05 $\mu\text{M}$	$> 1000 \mu\text{M}$	$> 952.4$	Liao <i>et al.</i> , 2019



**Figura 1.4.** Estructuras de dos triterpenos derivados del ácido betulónico y dos saponinas triterpénicas derivados del ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil ursólico (Liao *et al.*, 2019; Baltina *et al.*, 2003).

## 2.3. *Diospyros anisandra* Blake

### 2.3.1. Género *Diospyros*

La familia *Ebenaceae* consiste de 755 especies, dividida en 3 géneros: el género *Diospyros* con 731 especies existentes, *Eyclea* con 16 especies y *Lissocarpa* con 8 especies (ITIS, 2021). El nombre genérico *Diospyros* significa: “fruto divino o fruto de los dioses”; sin embargo, solo *D. campechiana*, *D. nigra* y *D. yatesiana* poseen frutos considerados comúnmente como comestibles (Borges-Argaéz *et al.*, 2021). Sin, embargo, las especies del género *Diospyros* tienen usos versátiles que incluyen frutas comestibles, madera valiosa y usos ornamentales. Este género muestra componentes fitoquímicos como terpenoides de tipo ursano, lupano, así como polifenoles, taninos, hidrocarburos y lípidos, benzopironas, naftoquinonas, oleananos y taraxeranos, los cuales se han aislado de diferentes especies. Las partes de estas plantas se han utilizado como remedios en diversas prácticas de curación popular, que incluyen terapia para hemorragias, incontinencia, insomnio, hipo, diarrea, etc. Se han estudiado estos efectos biológicos, verificando que los miembros del género *Diospyros* incluyen antioxidantes, hepatoprotectores, antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos, antihipertensivos, antidiabéticos,

neuroprotectores, antimicrobianos, antiprotozoarios, fungicidas, antihelmínticos, insecticidas, molusquicidas, citotóxicos, antitumorales, también actúan contra enfermedades resistentes a múltiples fármacos y como sedantes (Rauf *et al.*, 2017).

### 2.3.2. Descripción botánica y distribución de *Diospyros anisandra*

*Diospyros anisandra* es un árbol o arbusto pequeño de hasta 6 m de altura, con ramas cortas y hojas agrupadas de 2 a 6 cm de largo y de 1.2 a 3 cm de ancho (**Figura 1.5**). Las inflorescencias tienen de una a dos flores y los frutos tienen forma de globo de aproximadamente 1 cm de diámetro (Borges-Argaéz *et al.*, 2021) de color café-oscuro o negros. Su hábitat es la selva caducifolia (Ochoa-Ganoa *et al.*, 2018).



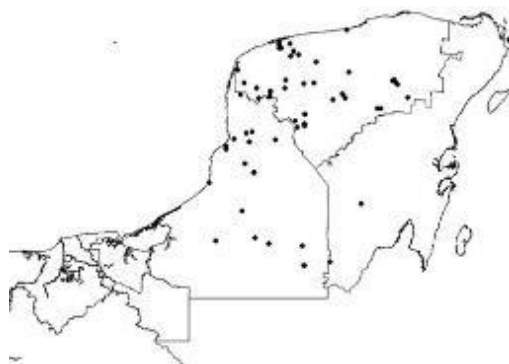
**Figura 1.5.** Flores, frutos, hojas y ramas de *Diospyros anisandra* Blake (Fotografías: Germán Camevali Fernández-Concha; Herbario CICY, 2010).

El nombre común de *Diospyros anisandra* Blake es k'aakalche', k'ab che', xanob che' (maya) que significa "madera amarga" (Borges-Argaéz *et al.*, 2021), su taxonomía se muestra en el **Cuadro 1.4**. Esta especie de planta es cuasi-endémica de la Península de Yucatán, México (Juárez-Méndez *et al.*, 2021); en México, se encuentra distribuida principalmente en la Península de Yucatán (**Figura 1.6**), pero también se extiende su distribución a Guatemala (Petén) y Cuba (Borges-Argaéz *et al.*, 2021). Crece en clima cálido subhúmedo con temperatura media (Herbario CICY, 2010).



**Cuadro 1.4.** Taxonomía de *Diospyros anisandra* Blake (California Academy of Sciences, National Geographic Society).

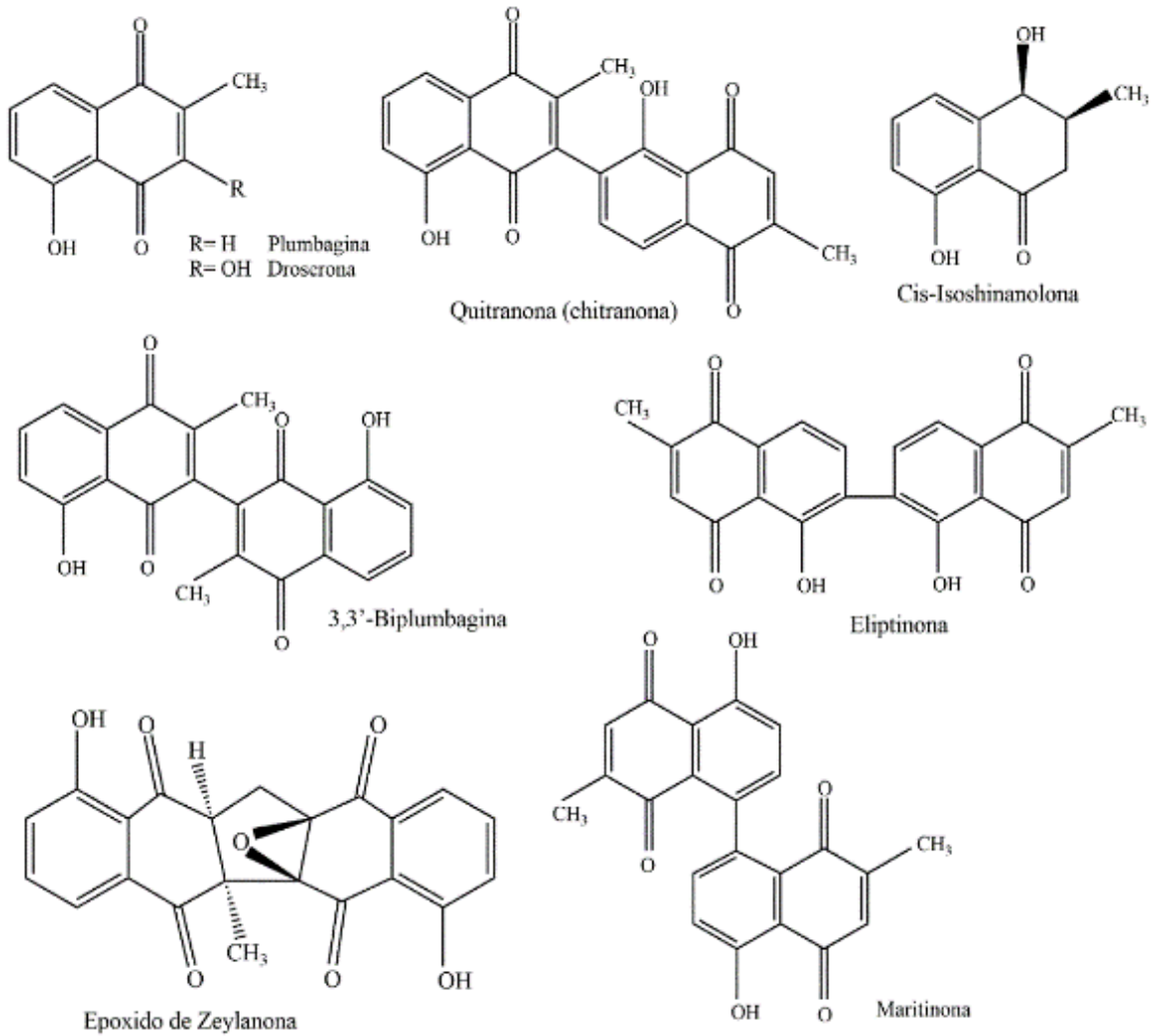
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Tracheophyta</i>
Subfilo	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Ericales</i>
Familia	<i>Ebenaceae</i>
Género	<i>Diospyros</i>
Especie	<i>Diospyros anisandra</i> Blake



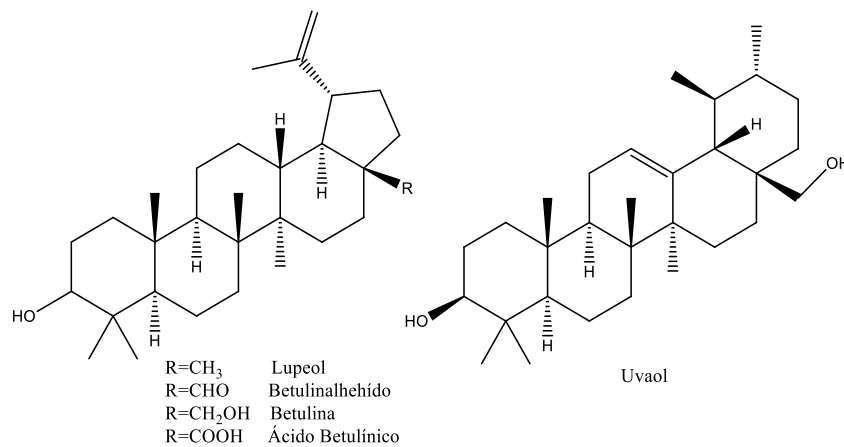
**Figura 1.6.** Distribución en México de *Diospyros anisandra* Blake (Herbario CICY, 2010).

### 2.3.3. Fitoquímica de *Diospyros anisandra*

Durante diversos estudios fitoquímicos de *D. anisandra* se ha reportado de la corteza del tallo algunos compuestos quinónicos y terpénicos característicos del género. Ejemplo de los compuestos quinónicos se encuentran ocho naftoquinonas: plumbagina, maritrona, 3,3'-biplumbagina, quitrona (chitrona), cis-isoshinanolona, eliptinona, droserona y epóxido de zeylanona (**Figura 1.7**). Y dentro de los compuestos terpénicos se encuentran cuatro triterpenos y cinco sesquiterpenos; entre los triterpenos tenemos (**Figura 1.8**): lupeol, betulinaldehído, betulina, ácido betulínico y uvaol; y entre los sesquiterpenos (**Figura 1.9**): 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, teucdiol A, selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Juárez-Méndez, 2021, Cetina-Montejo *et al.*, 2019; Uc-Cachón *et al.*, 2012; Arjona-Canul, 2011).



**Figura 1.7.** Estructuras de naftoquinonas aisladas de la corteza de *D. anisandra* (Uc-Cachón *et al.*, 2013b).



**Figura 1.8.** Estructuras de triterpenos aislados de la corteza de *D. anisandra* (Juárez-Méndez, 2021; Uc-Cachón *et al.*, 2012).

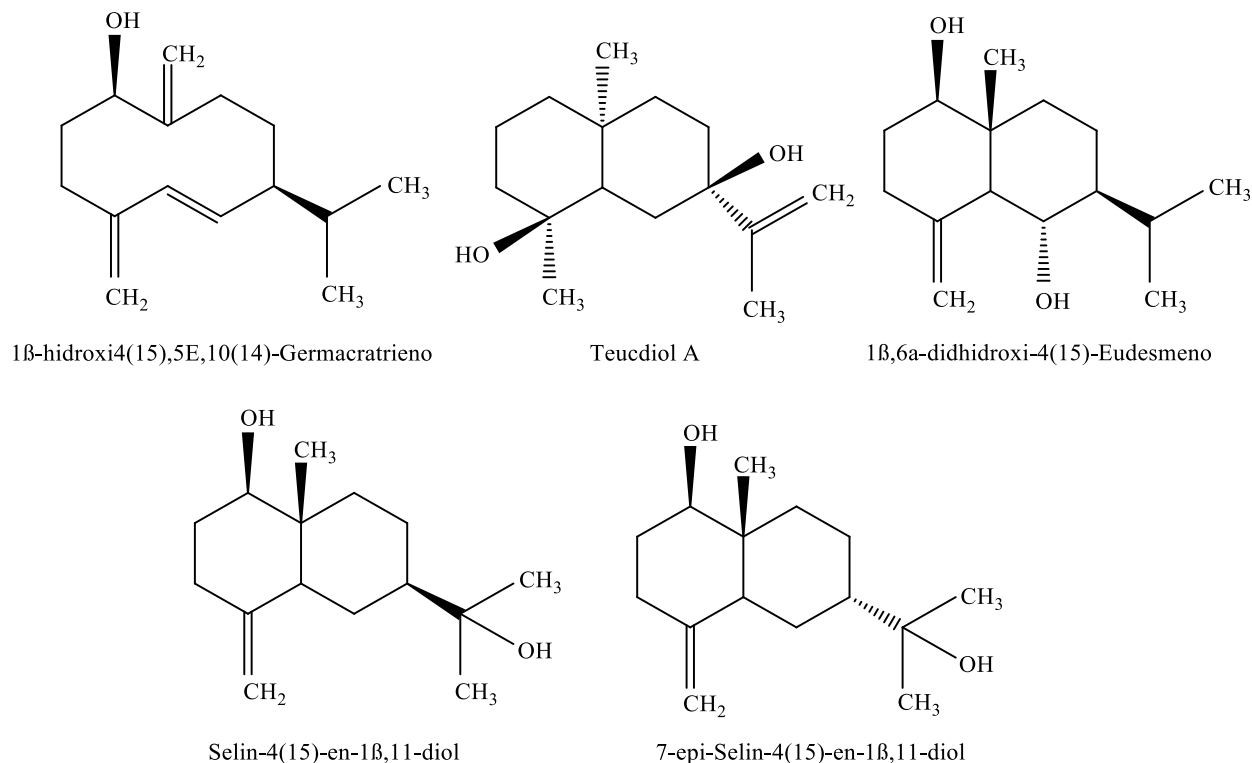


Figura 1.9. Estructuras de sesquiterpenos aislados de la corteza de *D. anisandra* (Arjona-Canul, 2011).

### 2.3.4. Usos etnobotánicos y actividad biológica

*Diospyros anisandra* (hojas) es una de las especies de plantas utilizadas por los mayas yucatecos para afecciones dermatológicas (granos, sarna, inflamación), es un triturado fuerte y se usa por vía tópica. Estudios de Ankli *et al.* (2002) han demostrado la actividad antibiótica y antifúngica del extracto no polar de hojas de *D. anisandra*, Ankli *et al.* señalan que dichas actividades podrían ser responsables de la inhibición del crecimiento de la infección bacteriana y fúngica de la sarna y las espinillas. Así como, la actividad inhibidora del factor nuclear κB (NF-κB) que se da del resultado de la citotoxicidad no específica del extracto, según Ankli *et al.* podría ser la razón de su uso antiinflamatorio entre los mayas (Ankli *et al.*, 2002). Otra aplicación tradicional es la corteza hervida en agua para aliviar hemorragias fuertes (Borges-Argaéz *et al.*, 2021).

También se ha demostrado alta eficacia acaricida en hojas y corteza de *D. anisandra* con  $87.9 \pm 8.6$  y  $98.8 \pm 1.0$  % de mortalidad de larvas de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a las 48 horas, respectivamente (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010). En otro estudio, los extractos de la

estación lluviosa y de sequía de hoja y corteza de *D. anisandra* fueron ensayados contra huevos de tres nematodos: *Ancylostoma caninum* (canino), *Haemonchus placei* (bovino) y ciatostominas (equino); donde el extracto de corteza de la estación lluviosa mostró el mayor porcentaje de inhibición de eclosión (PEI) de  $\geq 90$  a 75%  $\mu\text{g/mL}$ , y una alta actividad ovicida de 90 a 93.4%  $\mu\text{g/mL}$  para los tres nematodos. Al continuar con el fraccionamiento se demostró que la actividad biológica provenía de la fracción no polar de *n*-hexano, con plumbagina como el principal componente. Y la purificación biodirigida confirmó que la plumbagina es responsable de la actividad antihelmíntica con PEI  $\geq 90\%$  a 2.3  $\mu\text{g/mL}$  en los tres nematodos evaluados, representando ser una alternativa potencial para el control de nematodos gastrointestinales canino, bovino y equino dado el escenario actual de resistencia antihelmíntica (Flota-Burgos *et al.*, 2020).

En otros estudios, se ha demostrado que la raíz y corteza de esta planta tiene fracciones ricas en quinonas que poseen actividad antimicobacteriana y antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*. También en la corteza, su fracción hexánica ha mostrado una gran actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Colletotrichum gloeosporioides*, donde la naftoquinona plumbagina fue uno de los metabolitos responsables de la actividad biológica (Borges-Argáez *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los metabolitos más activos (contra *M. tuberculosis*) de la corteza del tallo de *D. anisandra* son las naftoquinonas plumbagina, maritinona y 3,3'-biplumbagina, poseen un potencial muy importante para el desarrollo como nuevos fármacos principalmente en cepas de perfil resistentes, ambos dímeros resultaron ser no tóxicos contra células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) y células Vero (Uc-Cachón *et al.*, 2013b).

Al estudiar la bioactividad de *D. anisandra*, Cachón y colaboradores (2013) investigaron los componentes fitoquímicos del extracto hexánico de la corteza del tallo de la planta, e identificaron un nuevo derivado dimérico de tipo naftoquinona (dímero de plumbagina, epóxido de zeylanona). Esta nueva molécula se aisló y se obtuvo su elucidación estructural con la fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{O}_7$  (Uc-Cachón *et al.*, 2013a).

Este nuevo dímero, epóxido de zeylanona (EPZ), junto con otras seis naftoquinonas, fueron evaluados, y solo EPZ inhibió la replicación del virus de la influenza A H1N1 pdm09. Es importante destacar que se descubrió que EPZ también era eficaz contra los virus H1N1 pdm-H275Y, H3N2 e influenza B, lo que sugiere una actividad anti-influenza de amplio espectro. Los resultados sugirieron que este compuesto inhibe la exportación nuclear de la proteína NP

(inhibiendo al interferir con las etapas tempranas y medias del ciclo de vida del virus), reduciendo así el número de partículas virales (Cetina-Montejo *et al.*, 2019).

Recientemente, se ha estudiado los extractos metanólicos de hoja, raíz, corteza y fruto de *D. anisandra*, los cuales a su vez fueron fraccionados en extractos de *n*-hexano, acetato de etilo, y acuoso. Destacando el extracto *n*-hexano de frutas, el cual exhibe actividad contra HA del virus de influenza AH1N1pdm09 a su más alta concentración testeada, 50 µg/mL (Juárez-Méndez *et al.*, 2021).

En resumen, *D. anisandra* es una especie con un alto contenido de terpenos y quinonas, y con una gran variedad de actividades biológicas, entre estas la actividad antiviral. El presente trabajo no sólo representa una contribución al conocimiento de la actividad biológica de esta especie, sino también al conocimiento de la diversidad química de ésta especie, siendo una de las especies del género presentes en la Península de Yucatán con escasos estudios fitoquímicos y biológicos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El virus de influenza ha ocasionado grandes pandemias en todo el mundo, gracias a su facilidad de contagio y su gran capacidad mutante para inhibir los medicamentos (OMS, 2019). Actualmente, existen cuatro medicamentos aprobados por la FDA y que actúan contra los virus de influenza A y B. Tres son inhibidores de la neuraminidasa: oseltamivir, zanamivir y peramivir; y el cuarto es baloxavir marboxil que inhibe la endonucleasa e impide la replicación del virus. Sin embargo, se ha reportado resistencia al oseltamivir entre pacientes con sistema inmunitario gravemente deprimido (CDC, 2021), y se han informado mutaciones que confieren una menor sensibilidad al oseltamivir en cepas del virus de influenza B (Davidson, 2018). Por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos posibles candidatos contra el virus de la influenza. Una opción son los productos naturales, como los compuestos terpenoides, ya que existen terpenoides con actividad contra el virus de influenza A. Por otra parte, en la corteza del tallo de *Diospyros anisandra* se han encontrado compuestos de este tipo que aún no se ha evaluado su actividad anti-influenza (Cetina-Montejo *et al.*, 2019; Uc-Cachón *et al.*, 2013a; Arjona-Canul, 2011). Adicionalmente, estudios previos realizados por el grupo de trabajo encontraron que el lupeol, aislado de la corteza del tallo, presento actividad antiviral contra el virus de influenza A H1N1. Además, estos compuestos terpenicos u otros encontrados podrían presentar actividad antiviral contra cepas del virus de la influenza A H1N1pmd09.

### 4. HIPÓTESIS

Existe evidencia de compuestos terpenoides sintéticos y de origen natural con actividad inhibitoria contra diferentes cepas del virus de influenza. Por lo que se espera que los metabolitos de tipo terpenoide presentes en corteza de *Diospyros anisandra* presenten actividad contra el virus de influenza A H1N1pmd09 (A/Yucatán/2370/09) así como inhibición de la actividad de la enzima neuraminidasa *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral contra el virus de influenza A H1N1pdm09 (A/Yucatán/2370/09) de terpenoides aislados de corteza de *Diospyros anisandra*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar y aislar al menos tres compuestos terpénicos de la corteza de *D. anisandra* por medio de distintos métodos cromatográficos.
- Evaluar la actividad citotóxica de los tres compuestos terpenoides aislados de la corteza de *D. anisandra* en células de riñón canino Madin Darby (MDCK).
- Evaluar la actividad antiviral de los tres compuestos terpenoides aislados de la corteza de *D. anisandra* contra cepas del virus de influenza A H1N1pmd09 (A/Yucatán/2370/09).
- Evaluar la actividad inhibitoria de compuestos terpénicos y fracciones hexánicas de la corteza de *D. anisandra* contra la Neuraminidasa de *Clostridium*.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se muestra en la **Figura 1.10**. La parte experimental comenzó con la obtención del extracto hexánico a partir de la corteza de dos árboles pequeños de *Diospyros anisandra*. Del extracto obtenido se procedió al aislamiento de compuestos terpenoides por técnicas cromatográficas, seguido de la elucidación estructural por métodos espectroscópicos de los compuestos terpenoides. Posteriormente, se evaluó la actividad citotóxica y actividad antiviral contra la cepa del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pmd09 de los compuestos terpenoides. Adicionalmente, se evaluó la actividad neuraminidasa de compuestos terpénicos y fracciones hexánicas.

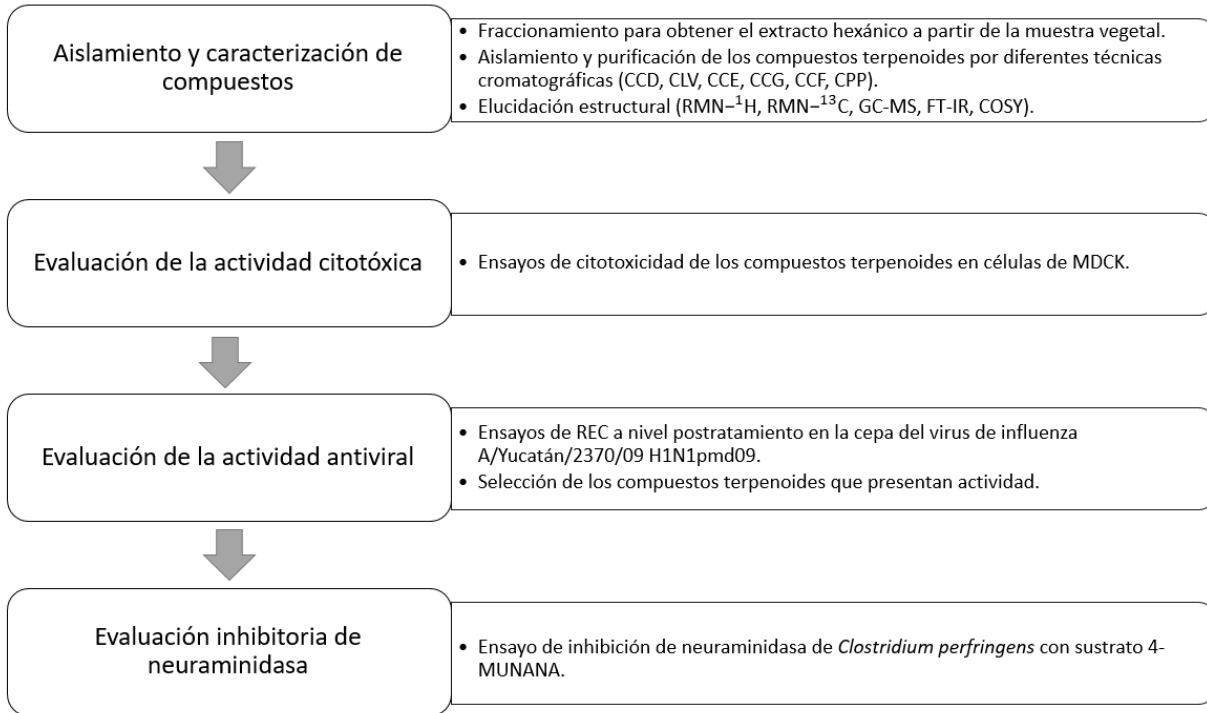


Figura 1.10. Diagrama de estrategia experimental.



## CAPÍTULO II

### AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS TERPÉNICOS DE CORTEZA DE *Diospyros anisandra*

#### 1. INTRODUCCIÓN

El género *Diospyros* de la familia *Ebenaceae*, con más de 350 especies tiene usos versátiles que incluyen frutas comestibles, madera valiosa y usos ornamentales. Este género muestra componentes fitoquímicos como terpenoides de tipo ursano, lupano, así como polifenoles, taninos, hidrocarburos y lípidos, benzopironas, naftoquinonas, oleananos y taraxeranos, los cuales se han aislado de diferentes especies (Rauf *et al.*, 2017).

El nombre común de *Diospyros anisandra* Blake es k'aakalche', k'ab che', xanob che' (maya), y es una planta endémica de la Península de Yucatán (Herbario CICY, 2010). Durante diversos estudios fitoquímicos se han reportado en la corteza del tallo algunos compuestos quinónicos y terpénicos característicos del género. Entre los compuestos quinónicos se encuentran ocho naftoquinonas: plumbagina, maritina, 3,3'-biplumbagina, quitranona (chitranona), *cis*-isoshinanolona, eliptinona, droserona y epóxido de zeylanona. Y dentro de los compuestos terpénicos se encuentran cuatro triterpenos y cinco sesquiterpenos; entre los triterpenos tenemos: lupeol, betulinaldehído, betulina, ácido betulínico y uvaol; y entre los sesquiterpenos: 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno, teucdiol A, selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -didihidroxi-4(15)-eudesmeno y 7-epi-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Juárez-Méndez, 2021; Uc-Cachón *et al.*, 2012; Arjona-Canul, 2011).

#### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 2.1. Material y equipo de laboratorio para la obtención de los extractos y aislamiento de compuestos terpénicos

Los disolventes que se emplearon para maceración, extracción, aislamiento y purificación fueron de grado industrial, purificados por destilación y filtración en el laboratorio. Para evaporar el disolvente en las muestras se utilizaron dos evaporadores rotatorios marca Büchi modelo RII

(Van Der Heijden laborTechnick GMBH, Dörentrup, Alemania) y RE111 (Büchi Laboratorios Technik AG, Flawil, Suiza), ambos equipados con un baño de agua a 40°C.

Para los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizó cromatofolios con soporte de aluminio impregnados con gel de sílice G-60 de 0.25 mm de espesor con indicador fluorescente F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania). Las CCD realizadas fueron visualizadas bajo luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm) en un iluminador marca Equipar, modelo UVGL-25 (Equipar S.A. de C.V., México D.F., México). Además se empleó un revelador químico general de disolución al 4% de ácido fosfomolibdico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) con trazas de sulfato cérico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) en ácido sulfúrico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) al 5%.

La cromatografía líquida al vacío (CLV) se realizó de dos formas: en equipo Isolera One marca Biotage con columna Biotage SNAP Ultra 10 g empacada con HP-Sphere 25 µm; y en columnas de vidrio de diferentes dimensiones, empacadas con gel de sílice, para la columna, de tamaño de poro de 60 Å y tamaño de partícula 2-25 µm, y para la cabeza de tamaño de partícula de 70-230 µm, ambas marca Sigma-Aldrich. La cromatografía Flash (CF) también se realizó en Isolera One marca Biotage con columna Biotage SNAP Ultra 10 g empacada con HP-Sphere 25 µm. Las cromatografías en columna por gravedad (CCG) se realizaron en columnas de vidrio de diferentes tamaños empacada con gel de sílice de tamaño de poro de 60 Å y tamaño de partícula de 70-230 µm (Sigma-Aldrich).

Por otro lado, para las cromatografías en columna por exclusión (CCE) o permeación se emplearon gel de Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Y para las cromatografías en placa preparativa (CPP) se emplearon placas de vidrio de 20 x 20 cm impregnadas con gel de sílice de 60 F<sub>254</sub> de 0.25 mm de espesor (Merck, Darmstadt, Alemania).

## 2.2. Equipo para la elucidación estructural

El análisis por cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-EM) se llevó a cabo en cromatógrafo Agilent Technologies 7890B GC System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) con columna Ultra HP-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de película (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) y espectrómetro Agilent Technologies 5977A MSD (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). El equipo es controlado por una computadora HP y se empleó helio de ultra alta pureza como gas acarreador.

El análisis de Resonancia magnética nuclear (RMN) se realizó en un equipo VARIAN/AGILENT modelo Premium-COMPACT de 600 MHz con un campo magnético de 14.1 T, y se empleó como disolvente Cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>). El equipo tiene la capacidad de realizar estudios de RMN multinuclear, donde se obtuvieron espectros 1D <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y 2D COSY.

El análisis por Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se obtuvo de un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR) de punta de diamante, Bruker modelo Tensor II. El espectro se obtuvo con resolución de 4 cm<sup>-1</sup> y 32 scans en el intervalo de longitud de onda. La muestra se prensó en pastilla de Bromuro de Potasio (KBr) para su análisis.

### 2.3. Material vegetal

Para la obtención del extracto vegetal crudo de corteza se procesó el material vegetal proveniente de dos árboles pequeños de *Diospyros anisandra* Blake, los cuales se colectaron en el mes de febrero del año 2020 en la localidad de Sierra Papacal, Yucatán, la especie fue identificada por el Biólogo Francisco Chi May. Un ejemplar de la especie se depositó en el herbario del CICY.

### 2.4. Procesamiento de corteza

#### 2.4.1. Obtención del extracto hexánico de corteza

De los dos arbolitos de *Diospyros anisandra* colectados, se obtuvo muestras de hojas, raíz, corteza y ramas secundarias, las cuales después de ser cortadas en trozos, peladas y separadas fueron secadas en una incubadora a temperatura no mayor de 50 °C durante un poco más de una semana. Después de tener el material vegetal seco, este se molió en un molino de cuchillas con malla de 0.5 cm, con excepción de las hojas que fueron molidas en licuadora industrial (**Cuadro 2.1**).

**Cuadro 2.1.** Peso de hoja, corteza, raíz y ramas secundarias de *Diospyros anisandra*.

	Peso fresco (kg)	Peso seco (kg)	Rendimiento (%)
<i>Hoja</i>	1.34	1.08	80.59
<i>Corteza</i>	2.24	1.94	86.60
<i>Raíz</i>	6.88	5.38	78.19
<i>Ramas secundarias</i>	3.86	3.02	78.23

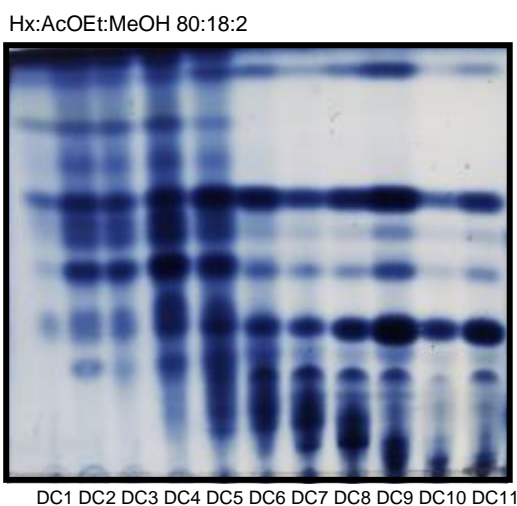
De estas cuatro partes se continuó trabajando con la corteza, la cual ya seca y molida (1.74 kg) se llevó a su maceración con aproximadamente 6 litros de hexano. La maceración se realizó por sonicación por un lapso de 30 minutos, se eliminó el disolvente en evaporador rotatorio y se repitió el procedimiento 4 veces, el extracto hexánico se denominó DC.

#### 2.4.2. Fraccionamiento del extracto orgánico hexánico DC

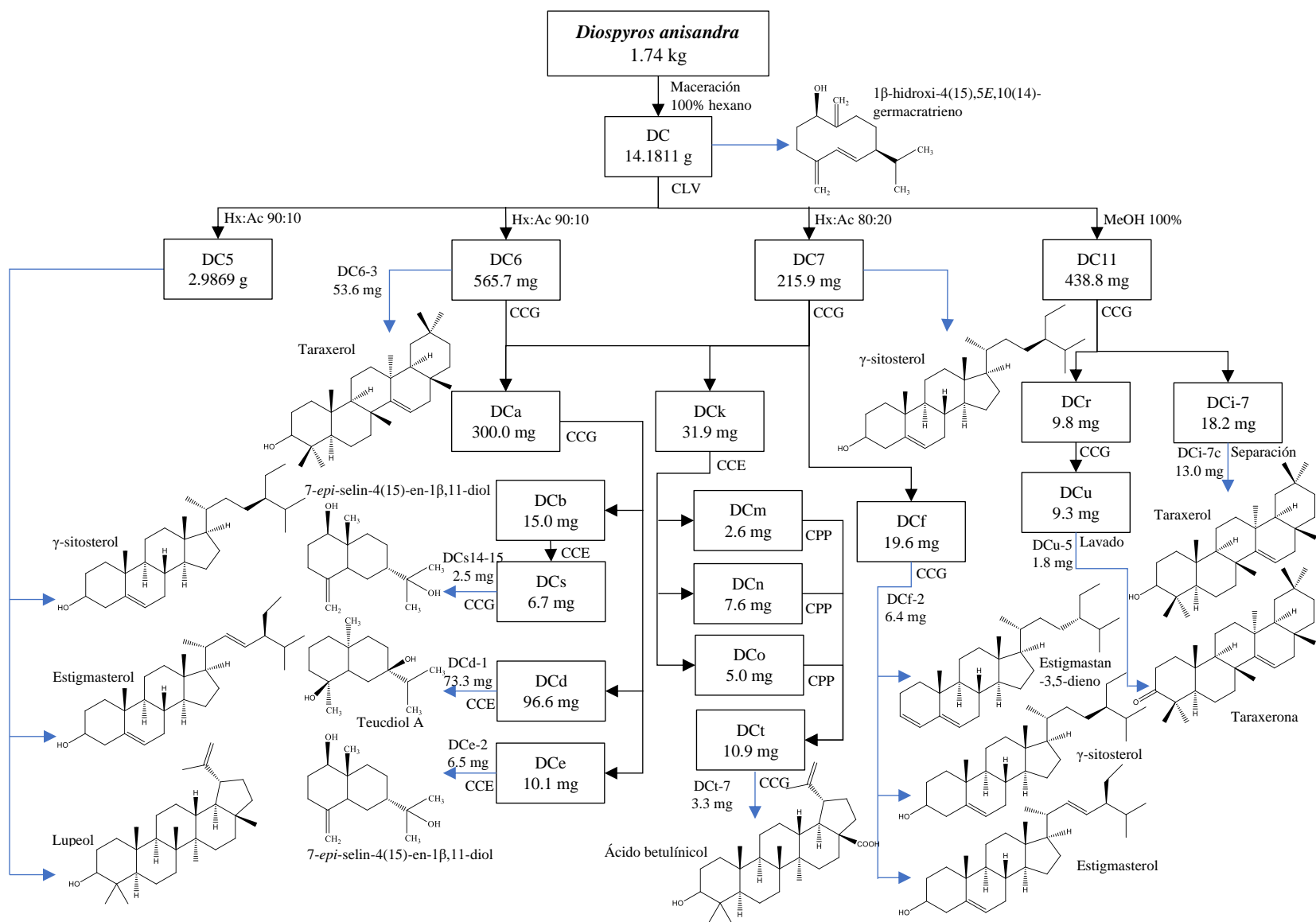
El fraccionamiento de los compuestos terpénicos identificados por espectrometría de masas (EM) a partir del extracto hexánico de corteza de *D. anisandra* se muestra en la **Figura 2.2**. Primeramente, el fraccionamiento del extracto hexánico de corteza (DC, 14.188 g) se realizó mediante cromatografía líquida al vacío (CLV) en columna de vidrio de 8.5 cm de diámetro, utilizando sistema de gradiente con polaridad incrementada de Hx:An (100:0 (2) , 95:5 (7), 90:10 (7), 80:20 (2), 70:30 (1), 60:40 (1), 50:50 (1), 0:100 (1)), y MeOH al 100% (2). Cada fracción tuvo un volumen de 100 mL (Coll y Bowden, 1986), obteniendo 24 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa delgada (CCD) y de acuerdo a su similitud fueron reunidas en 11 fracciones (DC1-DC11). Los pesos de las fracciones se muestran en el **Cuadro 2.2**, y su perfil cromatográfico en CCD de las 11 fracciones en la **Figura 2.1**.

**Cuadro 2.2.** Fracciones obtenidas de la CLV del extracto hexánico de corteza.

Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
DC1	559.6	DC4	4749.9	DC7	215.9	DC10	104.5
DC2	819.4	DC5	2986.9	DC8	392.0	DC11	438.8
DC3	2118.4	DC6	565.7	DC9	224.5		



**Figura 2.1.** CCD del fraccionamiento de DC.



**Figura 2.2.** Diagrama de identificación y aislamiento de compuestos terpénicos en la corteza de *D. anisandra*.

De acuerdo al grado de complejidad de la muestra visualizado por CCD se continuó con el fraccionamiento de las fracciones DC4, DC6, DC7 y DC11, por medio de diferentes métodos cromatográficos (CCG, CCE y CPP) hasta llegar al aislamiento de compuestos terpénicos en las fracciones DCu-5, DCi-7c, DCt-7 y DCs14-15. Donde, cada letra fue asignada por orden alfabético conforme se aplicó cada método cromatográfico. Los compuestos terpénicos obtenidos fueron confirmados empleando distintos métodos de elucidación estructural (CG-EM, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR y COSY). Los detalles de los métodos de aislamiento molecular se describen a continuación, seguido de los métodos de elucidación estructural.

Cabe mencionar que en el extracto hexánico del extracto metanólico de hoja de *D. anisandra* por medio de EM se identificó lupeol y betulina; y del extracto hexánico del extracto metanólico de raíz de *D. anisandra* se identificó por medio del patrón de fragmentación lupeol, taraxerol y  $\beta$ -sitosterol.

### 2.4.3. Aislamiento y purificación de las fracciones con compuestos terpénicos

#### 2.4.3.1. Fraccionamiento de DCs14-15

La fracción DC-7 (215.9 mg) fue sometida a cromatografía en columna por gravedad (CCG) empleando sistema isocrático de Hx:AcOEt:MeOH 80:18:2. Se obtuvieron 124 fracciones, las cuales fueron comparadas por cromatografía de capa delgada (CDD) y reunidas en 13 fracciones.

La fracción DC-6 (565.7 mg) fue sometida a CCG empleando un sistema isocrático de Hx:AcOEt:MeOH 80:18:2. Se obtuvo 63 fracciones, las cuales fueron comparadas por CDD y reunidas en 15 fracciones. De estas, las fracciones DC6-10, DC6-11, DC6-12, DC6-13 y DC6-14 fueron reunidas en combinación con DC7-6 y DC7-7 (DCa), esta fracción combinada fue sometida a CCG con sistema de disolventes de gradiente con polaridad incrementada CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:An (100:0, 95:5, 90:10, 88:12, 85:15, 0:100) y MeOH (100%). Se obtuvieron 153 fracciones las cuales de acuerdo a su CCD fueron reunidas en 14 fracciones (**Figura 2.3**).

Las fracciones DCa-9 y DCa-10 combinadas (DCb) fueron sometidas a cromatografía en columna de exclusión (CCE) o permeación con MeOH al 100%. Se obtuvieron 64 fracciones y de acuerdo a su CCD fueron reunidas en 3 fracciones. La fracción 2 (DCs) se le realizó CCG con polaridad incrementada CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:An (100:0, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 84:16, 82:16, 80:20, 78:22, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50, 0:100) y MeOH al 100%. Se obtuvieron 81 fracciones y

de acuerdo a su CCD fueron reunidas en 18 fracciones. La fracción DCs-14 y DCs-15 fueron enviadas a CG-EM y de acuerdo a su similitud en el cromatograma fueron reunidas como DCs14-15.

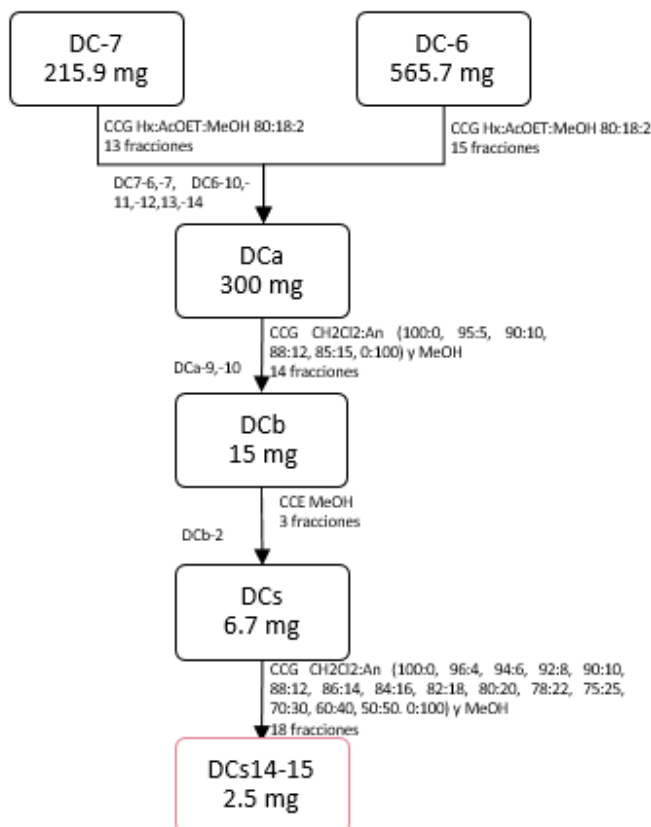


Figura 2.3. Fraccionamiento para obtener DCs14-15.

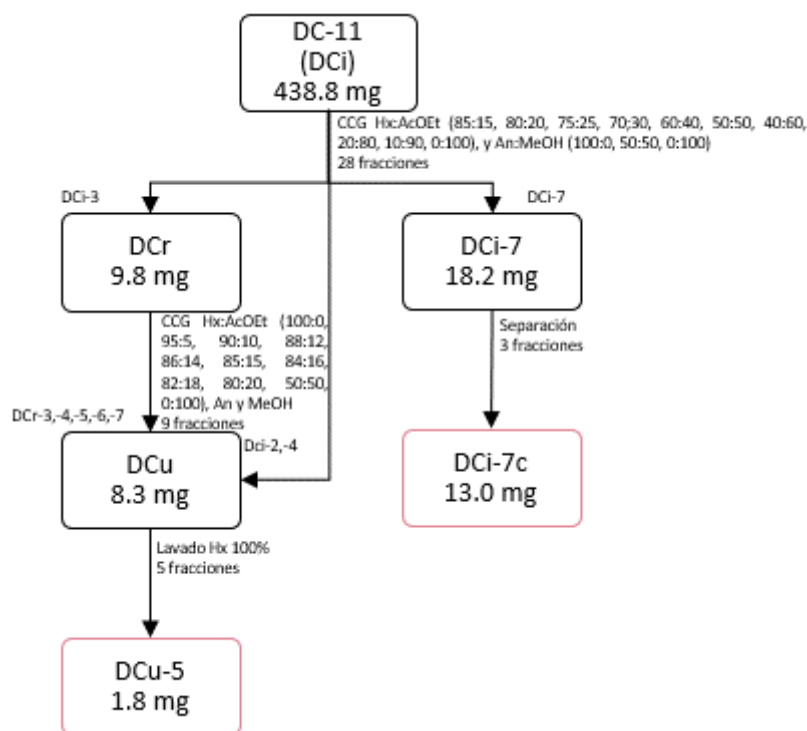
**Compuesto terpenoide 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (DCs14-15):** C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>; aceite ligeramente amarillento; CG-EM *m/z*: 238 [M]<sup>+</sup> (0), 220 (13), 205 (31), 187 (45), 177 (34), 162(65), 147 (76), 131 (73), 105(73), 91 (68), 79(67), 59 (100), 43 (65); H<sup>1</sup>-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.86 (1H, s, H-15a),  $\delta$  4.60 (1H, s, H-15b),  $\delta$  3.53 (1H, dd, *J*= 11.52 y 4.65 Hz, H-1),  $\delta$  2.30 (1H, ddd, *J*= 13.55, 4.95 y 1.17 Hz, H-3),  $\delta$  1.84 (1H, H-7),  $\delta$  1.81 (1H, H-2),  $\delta$  1.75 (1H, H-9a),  $\delta$  1.56 (1H, H-5),  $\delta$  1.25 (3H, s, H-13),  $\delta$  1.24 (3H, s, H-12),  $\delta$  0.65 (3H, s, H-14).

### 2.4.3.2. Fraccionamiento de DCu-5 y DCi-7c

La fracción DC-11 (438.8 mg) fue sometida a CCG empleando sistema de gradiente con polaridad incrementada Hx:AcOEt (85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80, 10:90, 0:100) y An:MeOH (100:0, 50:50, 0:100). Se obtuvieron 119 fracciones las cuales fueron comparadas por CCD y reunidas en 28 fracciones (**Figura 2.4**).

De estas, a la fracción 3 se le realizó CCG con polaridad incrementada HX:AcOEt (100:0, 95:5, 90:10, 88:12, 86:14, 85:15, 84:16, 82:18, 80:20, 50:50, 0:100), An y MeOH al 100%. Las fracciones 3, 4, 5, 6 y 7 (DCr-3, -4, -5, -6 y -7) con las fracciones DCi-2 y DCi-4 se les realizó tres lavados con hexano al 100%, donde se obtuvieron 5 fracciones. La fracción denominada DCu-5 fue enviada a CG-EM para su análisis.

Por otro lado, la fracción DCi-7 de acuerdo a su formación de cristales, fue dividido en 3 fracciones, de las cuales la fracción DCi-7c fue enviada a CG-EM para su análisis



**Figura 2.4.** Fraccionamiento para obtener DCu-5 y DCi-7c.

**Compuesto terpenoide taraxerona (DCu-5):**  $C_{30}H_{48}O$ ; polvo blanco; CG-EM  $m/z$ : 424 [M]<sup>+</sup> (51), 409 (37), 300 (99), 285 (94), 204 (100), 189 (58), 133 (83);  $H^1$ -RMN (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  5.56 (1H, dd,  $J = 8.2$  y  $2.9$  Hz, H-15),  $\delta$  2.57 (1H, m,  $J = 15.9$ ,  $11.9$  y  $7.2$  Hz, H-2a),  $\delta$  2.33 (1H, ddd,  $J =$



15.7, 6.2 y 3.2 Hz, H-2b),  $\delta$  2.07 (1H, dt,  $J$ = 13.0, 6.1 y 3.2 Hz, H-7a),  $\delta$  1.92 (1H, dd,  $J$ = 14.9 y 2.5 Hz, H-16a),  $\delta$  1.88 (1H, m,  $J$ = 13.1, 7.0 y 3.3 Hz; H-1a),  $\delta$  1.14 (3H, s),  $\delta$  1.09 (3H, s),  $\delta$  1.08 (3H, s),  $\delta$  1.07 (3H, s),  $\delta$  0.95 (3H, s),  $\delta$  0.92 (3H, s),  $\delta$  0.91 (3H, s),  $\delta$  0.83 (3H, s).

**Compuesto terpenoide taraxerol (DCi-7c):**  $C_{30}H_{50}O$ : cristales blancos; CG-EM  $m/z$ : 426 [M]<sup>+</sup> (20), 411 (16), 302 (53), 287 (53), 204 (100), 135 (51), 133 (47);  $H^1$ -RMN (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  5.53 (1H, dd,  $J$ = 8.07 y 2.83 Hz, H-15),  $\delta$  3.19 (1H, dd,  $J$ = 13.10 y 9.94 Hz, H-3),  $\delta$  2.03 (1H, dt,  $J$ = 3.12, 5.90 y 3.12 Hz, H-7a),  $\delta$  1.92 (1H, dd,  $J$ = 14.45 y 1.63 Hz, H-16a),  $\delta$  1.09 (3H, s),  $\delta$  0.98 (3H, s),  $\delta$  0.95 (3H, s),  $\delta$  0.93 (3H, s),  $\delta$  0.91 (6H, s),  $\delta$  0.82 (3H, s),  $\delta$  0.80 (3H, s).

#### 2.4.3.3. Fraccionamiento de DCt-7

Del fraccionamiento de DC-7 (215.9 mg), la fracción 5 (DCK) fue sometida a CCE con  $CH_2Cl_2$  al 100%, obteniendo 55 fracciones, las cuales de acuerdo a su CCD fueron reunidas en 11 fracciones. Las fracciones DCK5 (DCm), DCK6 (DCn) y DCK7 (DCo), de manera individual, se les realizó cromatografía por placa preparativa (CPP) con doble corrida del sistema Hx:AcOEt 8:2, se obtuvieron 3 fracciones de DCm, 5 fracciones de DCn, y 4 fracciones de DCo.

Las fracciones DCm-1, DCn-1,3,5 y DCo-4 fueron combinadas (DCt) para realizar CCG de polaridad incrementada Hx:AcOEt (90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 30:70, 0:100),  $CH_2Cl_2$  100%, An 100% y MeOH 100% obteniendo 56 fracciones las cuales fueron reunidas en 14 fracciones de acuerdo a su CCD (**Figura 2.5**). La fracción 7 fue enviada a CG-EM para su análisis.

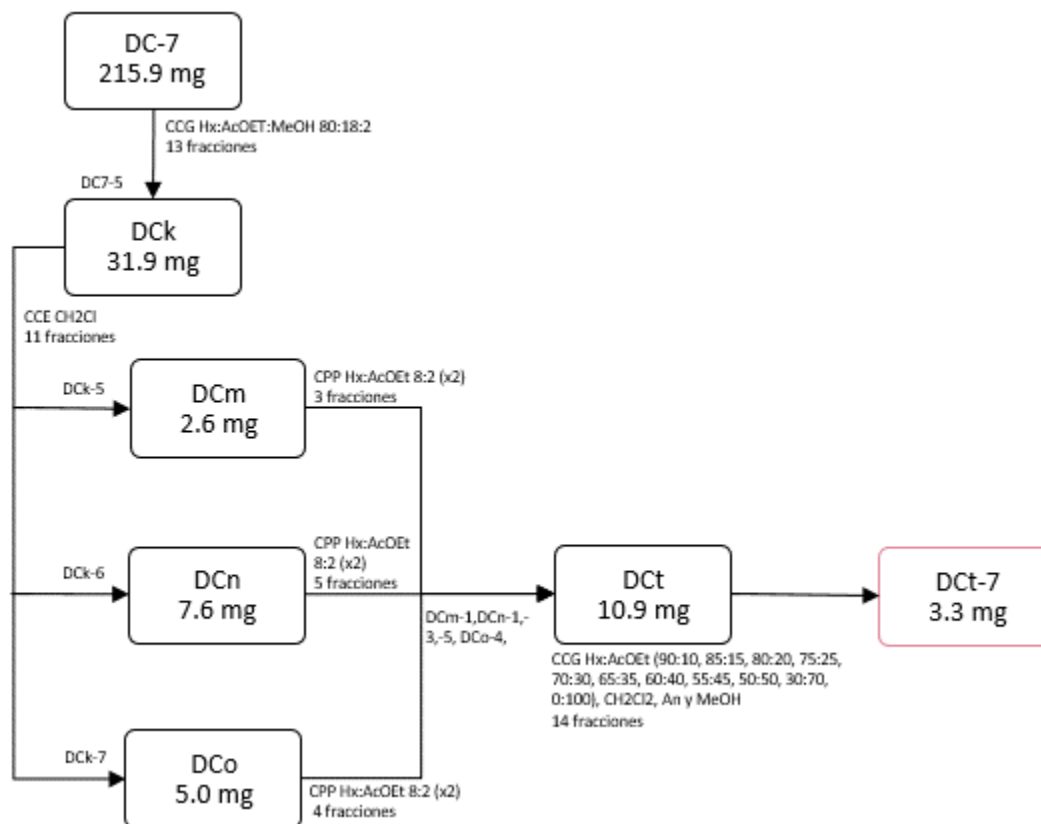


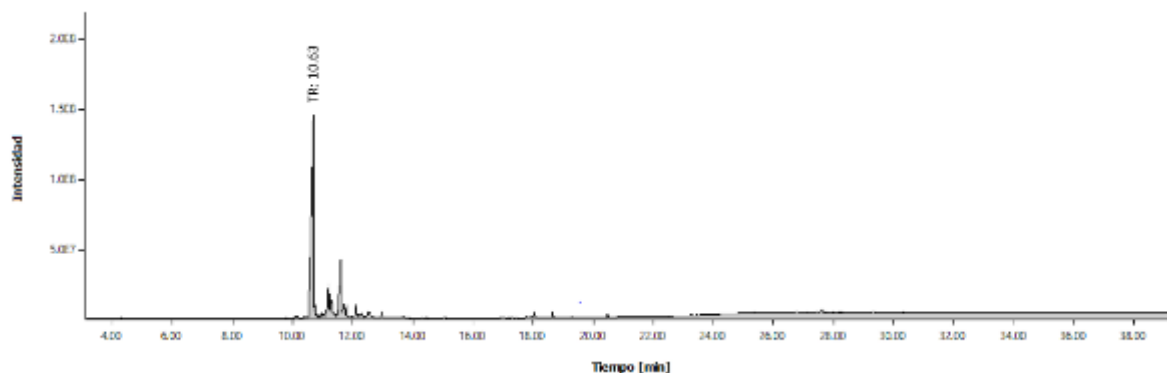
Figura 2.5. Fraccionamiento para obtener DCt-7.

**Compuesto terpenoide ácido betulínico (DCt-7):**  $C_{30}H_{48}O_3$ : polvo blanco; FT-IR (KBr)  $\lambda_{max}$   $cm^{-1}$ : 3460 (O-H), 2940 (C-H), 2870 (C-H), 1690 (C=O), 1640 (C=C), 1450 (CH<sub>2</sub>), 1370 (CH<sub>3</sub>), 1040 (C-OH), 882 (C=CH<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.74 (1H, s, H-19a),  $\delta$  4.61 (1H, s, H-19b),  $\delta$  3.18 (1H, dd,  $J = 10.99, 4.57$  y  $4.57$  Hz, H-3),  $\delta$  2.98 (1H, m, H-19),  $\delta$  1.69 (3H, s, H-30),  $\delta$  0.97 (3H, s),  $\delta$  0.96 (3H, s),  $\delta$  0.94 (3H, s),  $\delta$  0.82 (3H, s),  $\delta$  0.75 (3H, s). <sup>13</sup>C-RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  109.87 (C29),  $\delta$  150.57 (C20),  $\delta$  109.85 (C29),  $\delta$  79.16 (C3),  $\delta$  56.40 (C17),  $\delta$  55.51 (C5),  $\delta$  50.69 (C9),  $\delta$  49.43 (C18),  $\delta$  47.02 (C19),  $\delta$  42.60 (C14),  $\delta$  40.86 (C8),  $\delta$  39.03 (C4),  $\delta$  38.88 (C13),  $\delta$  38.53 (C1),  $\delta$  37.37 (C10),  $\delta$  37.17 (C22),  $\delta$  34.50 (C7),  $\delta$  32.30 (C16),  $\delta$  30.70 (C21),  $\delta$  29.86 (C15),  $\delta$  28.15 (C23),  $\delta$  27.57 (C2),  $\delta$  25.67 (C12),  $\delta$  21.02 (C11),  $\delta$  19.53 (C30),  $\delta$  18.45 (C6),  $\delta$  16.29 (C26),  $\delta$  16.18 (C25),  $\delta$  15.50 (C24),  $\delta$  14.86 (C27).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis de la muestra DCs14-15

La fracción DCs14-15 se obtuvo del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra*, la cual es soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, An y CHCl<sub>3</sub>. Una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases con espectrometría de masas [120 °C (2min), 8 °C/min, 300 °C (15 min)] observándose en el cromatograma un pico mayoritario en T<sub>R</sub> de 10.63 minutos con espectro similar a 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol (Arjona-Canul, 2011) (**Figura 2.6**).



**Figura 2.6.** Cromatograma de gases de la fracción DCs14-15.

En el espectro de fragmentación de masas (**Figura 2.7**) se observan fragmentos producidos por pérdida del oxhidrilo de  $m/z$  220  $[M - 18(H_2O)]^+$ , un fragmento producido por la pérdida de un metilo de  $m/z$  205  $[220 - 15(CH_3)]^+$ , y la pérdida de otro hidroxilo de  $m/z$  187  $[205 - 18(H_2O)]^+$ , además un fragmento producido por la pérdida del isopropilo de  $m/z$  177  $[220 - 43(C_3H_7)]^+$  y un ión base del fragmento de un hidroxi-isopropilo de  $m/z$  59  $[C_3H_6OH]^+$ . Por lo que se sospecha que se trata del 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol previamente aislado de la corteza de *D. anisandra* por Ana Laura Arjona (2011) con isomería  $\alpha$  en el hidroxi-isopropilo (**Figura 2.8**).

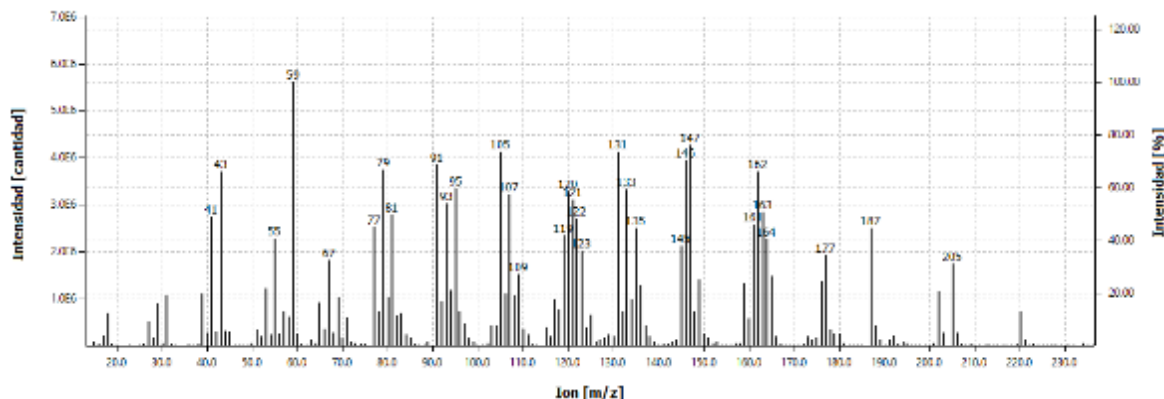


Figura 2.7. Espectro de fragmentación de masas de DCs14-15.

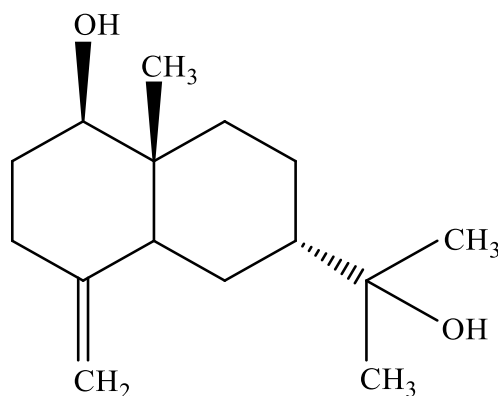


Figura 2.8. Estructura de 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.

En el espectro de  $H^1$ -RMN (Figura 2.9) a  $\delta$  0.65, 1.24 y 1.25 se observaron señales de singuletes correspondientes a metilos, perteneciendo los dos metilos más desplazados al hidroxi-isopropilo. Además, se observó una señal doble doblete de dobletes en  $\delta$  2.30 ( $J = 1.17, 4.95$  y  $13.55$  Hz) perteneciente al protón  $\alpha$  del carbono 3, una señal doble de dobletes en  $\delta$  3.53 ( $J = 4.65, 11.52$  Hz) de un protón base de alcohol, y dos señales dobles a  $\delta$  4.60 y 4.86 pertenecientes a los protones vinílicos del enlace exocíclico. La comparación de este espectro con el espectro de 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol obtenido por Arjona-Canul en el año 2011 se muestra en el Cuadro 2.3, presentado similitud en los desplazamientos más característicos.

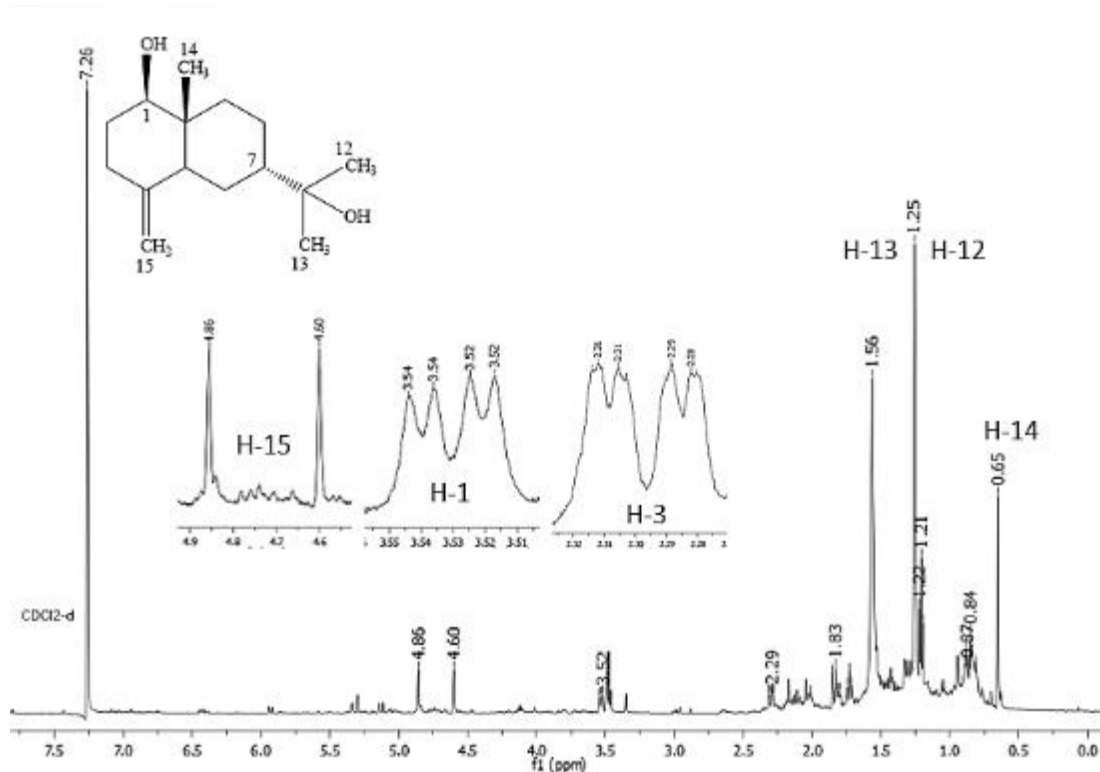


Figura 2.9. Espectro H<sup>1</sup>-RMN de la muestra DCs14-15 con la estructura de 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol indicando los protones de las señales características.

Cuadro 2.3. Comparación de los datos de H<sup>1</sup>-RMN de la muestra DCs14-15 con 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol (Arjona-Canul, 2011).

Posición	Muestra DCs14-15 (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1β,11-diol (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
1	3.53 (1H, dd, $J = 11.52, 4.65$ Hz)	3.53 (1H, dd, $J = 4.8, 11.4$ Hz)
2	a 1.81 (1H)	a 1.83 (1H) b 1.53 (1H)
3	a 2.30 (1H, ddd, $J = 13.55, 4.95, 1.17$ Hz)	a 2.30 (1H) b 2.01 (1H)
5	1.56 (1H)	1.58 (1H)
7	1.84 (1H)	1.86 (1H)
9	a 1.75 (1H)	a 1.74 (1H) b 1.41 (1H)
12	1.24 (3H, s)	1.24 (3H, s)
13	1.25 (3H, s)	1.25 (3H, s)
14	0.65 (3H, s)	0.64 (3H, s)
15	a 4.86 (1H, s) b 4.60 (1H, s)	a 4.85 (1H, br s, $J = 1.6$ Hz) b 4.59 (1H, br s, $J = 1.6$ Hz)

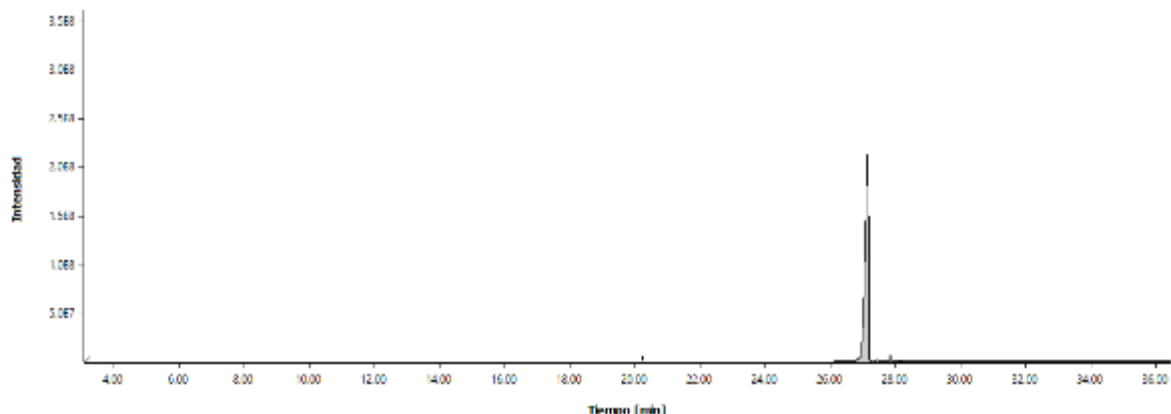
El compuesto 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol solo se ha reportado en la corteza de *D. anisandra* (Arjona-Canul, 2011). Sin embargo, el isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol se aisló por primera vez del extracto de éter de petróleo de la raíz del arbusto *Pterocarpus marsupium* (Adinarayana y Syamasundar, 1982). Estudios posteriores lograron establecer la síntesis de este alcohol sesquiterpénico bicíclico eudesmanoide (+)-selin-4-(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, se ha sintetizado estereoselectivamente por una ruta que involucra una fotocicloaddición de un ciclobuteno y una *P*-ciclohexenona adecuadamente estructurada (Anglea y Pinder, 1987). Además, selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol también fue aislada del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra* (Uc-Cachón, 2012), del extracto metanólico de hojas de *D. melanoxylon* (Mallavadhani y Mahapatra, 2005), del extracto de diclorometano de la raíz de la planta endémica de Filipinas *Cycas waderi* (Ragasa *et al.*, 2016), del extracto etanólico de las hojas de *Chimonanthus praecox* (Wen-Xuan *et al.*, 2011), del extracto metanólico de las hojas de *Desmos cochinchinensis* (Tung-Ying *et al.*, 2014), y en el extracto de acetona de hojas y ramas de *Sabina gaussenii* (Zhang-Hua *et al.*, 2016).

Otro compuesto con estructura similar, 1 $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -eudesmol, fue aislado del extracto de éter de petróleo y AcOEt de la Hierba *Cymbopogon proximus* (El-Askary *et al.*, 2003). Otro isómero, selin-4(15)-en-3 $\beta$ ,11-diol, se ha aislado del extracto de diclorometano de flores de la planta egipcia *Calendula officinales* (Marukami *et al.*, 2001).

7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol y su isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol no poseen actividad citotóxica significativa en las líneas celulares HeLa, Hep-2, PC-3 y Vero, presentan  $CI_{50} > 5$  mg/mL (22  $\mu$ M) (Arjona-Canul, 2011).

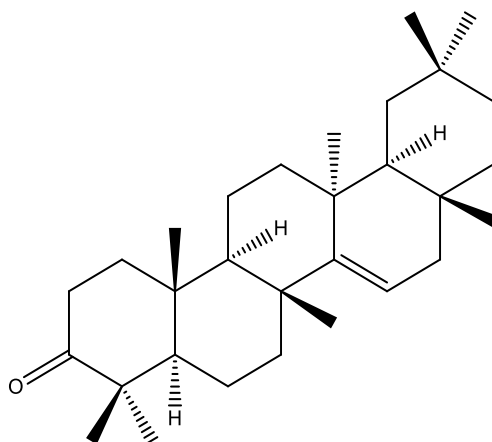
### 3.2. Análisis de la muestra DCu-5

La muestra DCu-5 se obtuvo a partir del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra*, la cual es soluble en  $CH_2Cl_2$ , MeOH y  $CHCl_3$ . Una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases con espectrometría de masas [120 °C (2min), 8 °C/min, 200 °C (2 min), 8 °C/min, 300 °C (10 min)] observándose en el cromatograma la presencia de un pico en  $T_R$  de 27.17 con un espectro similar a *D*-friedoolean-14-en-3-ona, con un porcentaje de abundancia de 97.57% (Figura 2.10).



**Figura 2.10.** Cromatograma de gases de la fracción DCu-5.

*D*-friedoolean-14-en-3-ona, mejor conocida como taraxerona, también es llamada skimmiona o taraxer-14-en-3-ona con fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O$  (PubChem, 2021). La taraxerona es un triterpenoide pentacíclico con estructura compuesta por cinco anillos de seis miembros, con dos anillos silla, uno en forma de bote retorcido y dos en conformaciones de bote ligeramente retorcidas. (Parvez *et al.*, 1999). En el espectro de fragmentación de masas (**Figura 2.12**) presenta un ion molecular de  $m/z$  424  $[M]^+$ , además fragmentos característicos de la taraxerona de  $m/z$  300, 285, 204 y 133 (Branco *et al.*, 2004). El fragmento de  $m/z$  300  $[C_{21}H_{32}O]^+$  es producido de la descomposición tipo retro Diels-Alder de la ruptura del anillo D, y el fragmento ion base producido por la pérdida del metilo de  $m/z$  285  $[300 - 15(CH_3)]^+$ . Por lo que se sospecha que se trata del taraxer-14-en-3-ona (**Figura 2.11**).



**Figura 2.11.** Estructura de *D*-Friedoolean-14-en-3-ona (taraxerona).

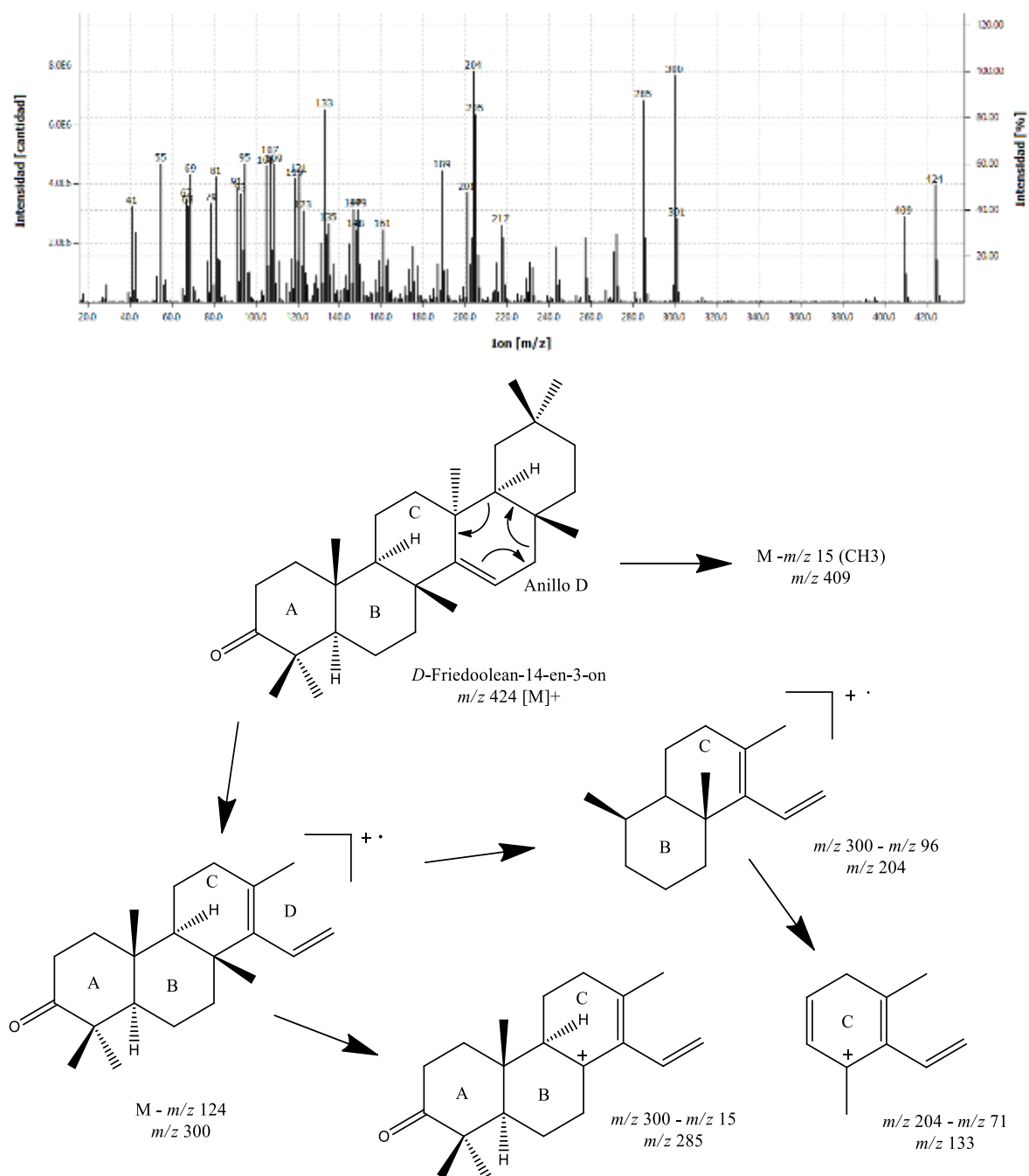


Figura 2.12. Espectro de fragmentación de masas de DCu5.

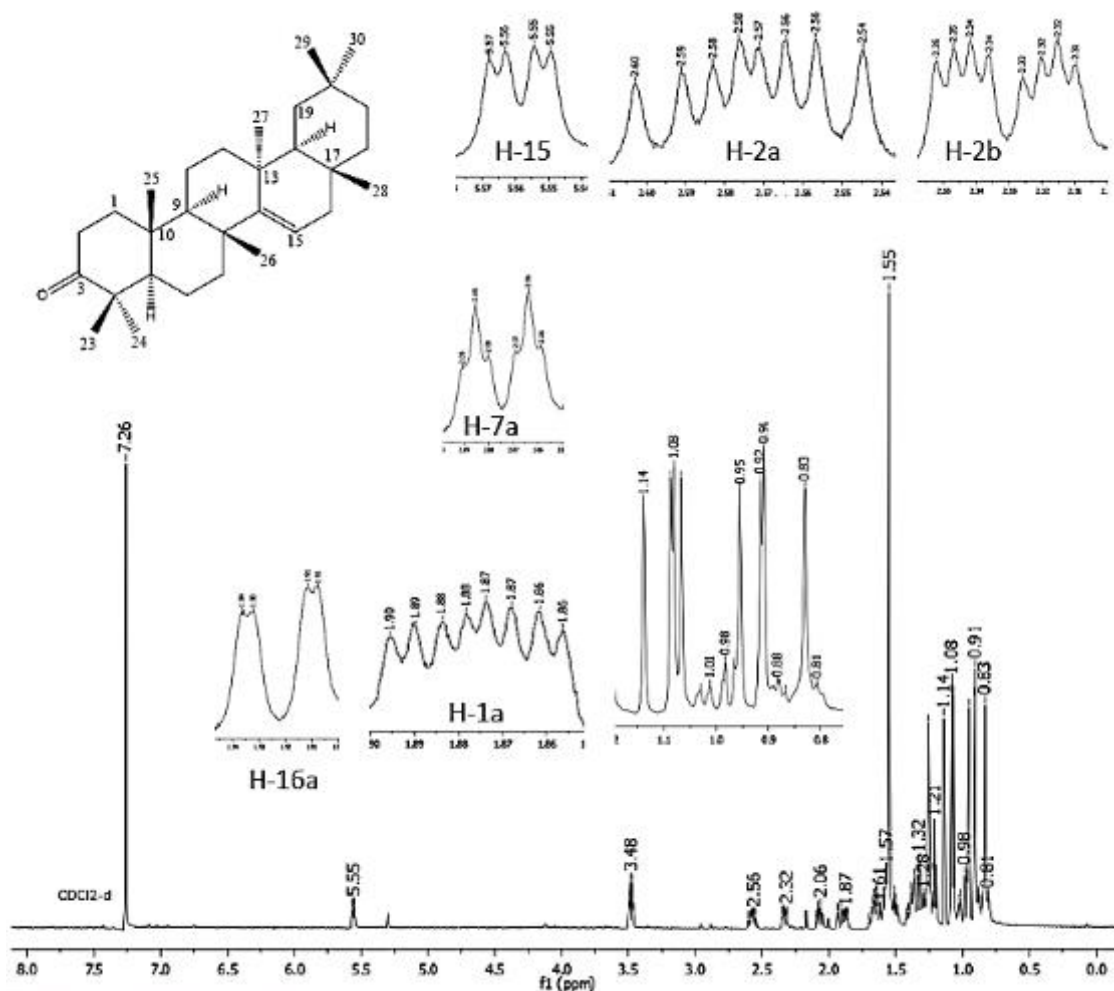
En el espectro  $H^1$ -RMN (Figura 2.13) se observa una señal de doble de dobletes en  $\delta$  5.56 (dd, 1H,  $J = 2.9$  y 8.2 Hz) que corresponde al protón (H) unido a un carbono electronegativo (C15) con insaturación y de acuerdo a su acoplamiento tiene un metileno vecino. Otra señal desplazada es un multiplete en  $\delta$  2.57 (m, 1H,  $J = 7.2$ , 11.9 y 15.9 Hz) correspondiente a un  $H_a$  unido a un



carbón (C2) vecino de un carbonilo, de igual manera la señal de doble doble de dobletes en  $\delta$  2.33 (ddd, 1H,  $J = 3.2, 6.2$  y  $15.7$  Hz) corresponde a Hb unido al mismo carbón (C2). Por otro lado, la señal de tripletes en  $\delta$  2.07 (dt, 1H,  $J = 3.2, 6.1$  y  $13.0$  Hz) corresponde a un protón de un metileno que de acuerdo a su acoplamiento tiene como vecino un metileno y un carbono cuaternario, Hernández-Chávez en el año 2011 designa esta señal al Ha del carbono 7. Otra señal marcada es del doble de doblete en  $\delta$  1.92 (dd, 1H,  $J = 2.5$  y  $14.9$  Hz) correspondiente a un Ha unido al carbono 16 vecino de un carbono con insaturación, y una señal de un multiplete en  $\delta$  1.88 (m, 1H,  $J = 3.3, 7.0$  y  $13.1$  Hz) del Ha unido al carbono 1. En la zona de los metilos se observan ocho señales de singuletes en  $\delta$  1.14, 1.09, 1.08, 1.07, 0.95, 0.92, 0.91 y 0.83 corresponden a los ocho metilos en la molécula, las señales casi solapadas del desplazamiento  $\delta$  1.09 y 1.08, y  $\delta$  0.92 y 0.91 corresponden a los metilos en C29 y C30, C23 y C24 ya que su acoplamiento entre ellos es muy similar. En el **Cuadro 2.4** se observa la comparación de este espectro con los datos de dos espectros de taraxerona previamente reportados.

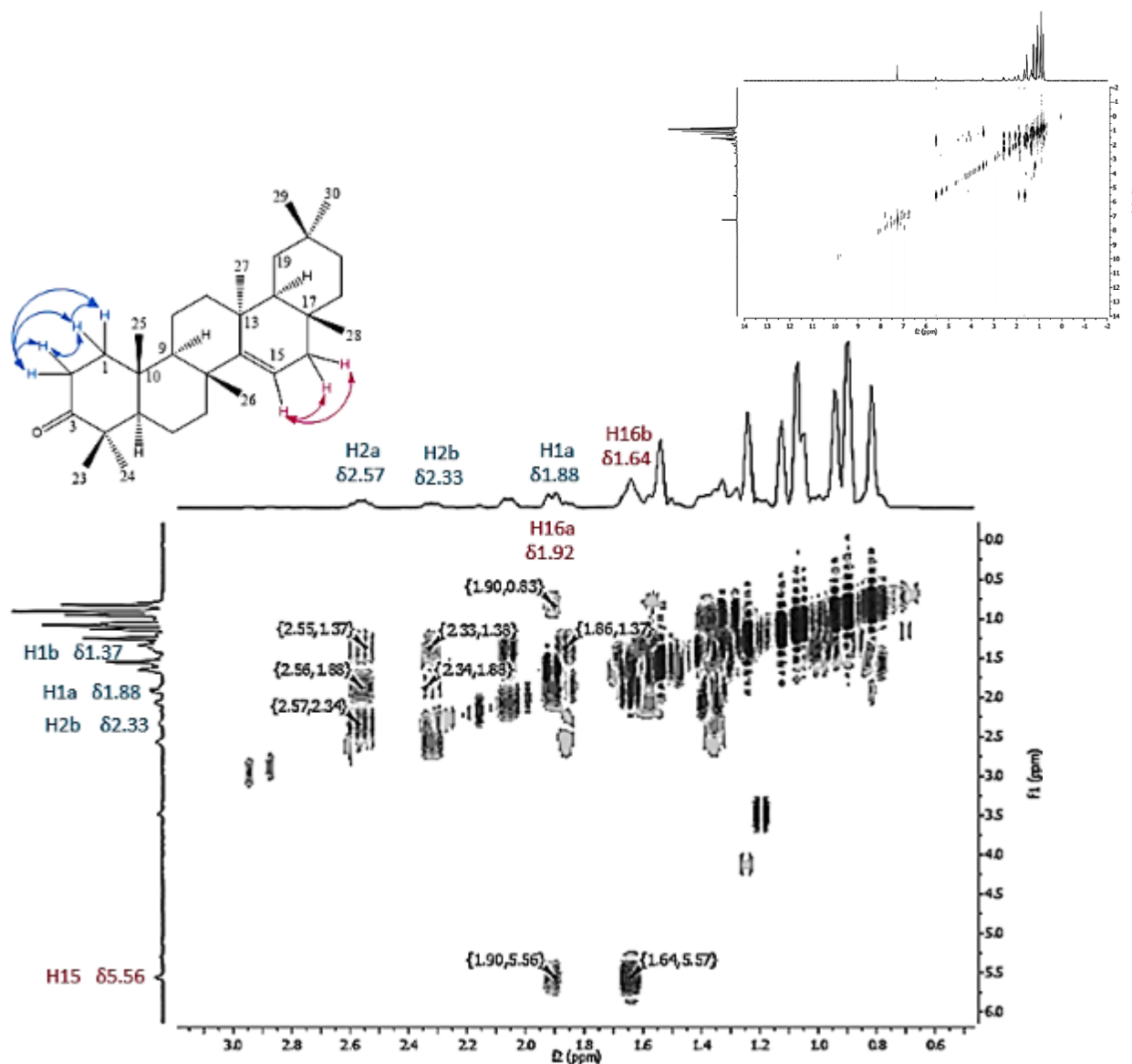
**Cuadro 2.4.** Comparación de los datos de  $H^1$ -RMN de la muestra DCu-5 con taraxerona (Hernández-Chávez, 2011; Tareq *et al.*, 2009).

Posición	Muestra DCu5 (600 MHz, $CDCl_3$ )	Taraxerona (Tareq <i>et al.</i> ) (400 MHz, $CDCl_3$ )	Taraxerona (Hernández) (400 MHz, $CDCl_3$ )
1	a 1.88 (1H, m, $J = 13.1, 7.0, 3.3$ Hz)	-	-
2	a 2.57 (1H, m, $J = 15.9, 11.9, 7.2$ Hz)	a 2.56 (m)	a 2.58 (1H, m)
	b 2.33 (1H, ddd, $J = 15.7, 6.2, 3.2$ Hz)	b 2.32 (m)	b 2.33 (1H, m)
7	a 2.07 (1H, dt, $J = 13.0, 6.1, 3.2$ Hz)	-	a 2.07 (1H, dt, $J = 12.9, 3.3$ Hz)
15	5.56 (1H, dd, $J = 8.2, 2.9$ Hz)	5.55 (1H, dd, $J = 8.0, 3.2$ Hz)	5.56 (1H, dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz)
16	a 1.92 (1H, dd, $J = 14.9, 2.5$ Hz)	-	a 1.92 (1H, dd, $J = 15.1, 3.1$ Hz)
	1.14 (s)	1.13 (s)	1.14 (s)
3H ( $CH_3$ )	1.09 (s)	1.08 (s)	1.09 (s)
	1.08 (s)	1.07 (s)	1.08 (s)
	1.07 (s)	1.06 (s)	1.07 (s)
	0.95 (s)	0.95 (s)	0.95 (s)
	0.92 (s)	0.91 (s)	0.92 (s)
	0.91 (s)	0.90 (s)	0.91 (s)
	0.83 (s)	0.82 (s)	0.83 (s)



**Figura 2.13.** Espectro  $H^1$ -RMN de la muestra DCu-5 con la estructura de taraxerona indicando los protones de las señales características.

En el espectro de Espectroscopia de correlación (COSY, por sus siglas en inglés) (**Figura 2.14**) podemos comprobar principalmente los acoplamiento entre los protones del carbono 15 y 16 y del carbono 2 y 1. En el espectro se observa una señal que corresponde al acoplamiento de  $\delta$  5.56 (H15) con sus protones del metileno vecino en  $\delta$  1.92 (H16a) y 1.64 (H16b), y a su vez, la señal en  $\delta$  1.92 (H16a) muestra un acoplamiento con  $\delta$  0.83 (H28) que corresponde a un metilo. Por otro lado, se muestran tres señales correspondientes a  $\delta$  2.57 (H2a) acoplado con  $\delta$  2.33 (H2b), 1.88 (H1a), y 1.37 (H1b), de los cuales, en otras dos señales, se observa que  $\delta$  1.88 (H1a) también está acoplado con  $\delta$  2.33 (H2b) y 1.37 (H1b). Los acoplamientos y el desplazamiento de los protones confirman los grupos sustituyentes en la molécula taraxerona, ya que la insaturación y el grupo carbonilo proporcionan una desprotección del átomo, y por ende, un mayor desplazamiento para los protones más cercanos a estos grupos.



**Figura 2.14.** Espectro 2D COSY de la muestra DCu-5 completo y su acercamiento en la zona con las señales principales.

La taraxerona se encuentra ampliamente en las plantas (Zorina *et al.*, 2018), se ha identificado en plantas superiores como en el extracto de AcOEt de la hierba *Sedum sarmentosum* (Chang-Keun *et al.*, 2012). También, este triterpenoide parece estar ampliamente distribuidos en las especies de *Myrica*, como en el extracto de benceno de la corteza de *Myrica rubra* y de la corteza de raíz de *Myrica cerifera* (Sakurai *et al.*, 1987). Asimismo, la taraxerona se ha aislado en el género *Alnus*: *Alnus japónica*, *Alnus rubra* y *Alnus nepalensis* (Sati *et al.*, 2011). Además, taraxerona ha sido aislada con buenos rendimientos de ciertas plantas del género *Mallotus*

(*Euphorbiaceae*) (Phan-Minh *et al.*, 2014) y de la misma familia, del género *Euphorbia*, se ha identificado en el extracto etanólico de raíz de *Euphorbia hirta* (Al-Snafi, 2017), y del extracto metanólico de raíz de *Euphorbia alata* (Kemboi *et al.*, 2020). Otras especies vegetales donde se ha aislado taraxerona es del extracto de cloroformo de hojas de *Alchornea latifolia* (Setzer *et al.*, 2000), del extracto de las partes aéreas de la hierba *Tetrastigma hemsleyanum* (Ji *et al.*, 2021), del extracto etanólico de las partes aéreas de la planta *Skimmia laureola* (Parvez *et al.*, 1999), del extracto de *n*-hexano de corteza de *Capuna cinerea* (Gachet *et al.*, 2011), del extracto etanólico de hoja de *Shefflera octophylla* (Chen *et al.*, 2015) y del extracto hexánico de raíz, corteza y hojas de *Vellozia graminifolia* (Branco *et al.*, 2004).

La taraxerona exhibe un amplio espectro de actividad biológica, en particular antibacteriana (que es comparable a la actividad de la ampicilina contra *Escherichia coli* y otras cepas), antioxidante, antitumoral y antiviral contra los virus del herpes simple. (Zorina *et al.*, 2018). También, la taraxerona tiene actividad inhibidora de la topoisomerasa, actividad antiparasitaria y actividad insecticida. Se sugiere que la taraxerona tiene una capacidad antiinflamatoria a través del poder antioxidante (Mo *et al.*, 2012; Chang-Keun *et al.*, 2012). Además, la taraxerona ejerce efectos anticancerígenos en las células de cáncer de pulmón al inducir apoptosis temprana y tardía, condensación de cromatina y ruptura de la membrana celular (Xu-Chen *et al.*, 2016).

### 3.3. Análisis de la muestra DCi-7c

La fracción DCi-7c se obtuvo a partir del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra*, la cual es soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CHCl}_3$ . Una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases con espectrometría de masas [120 °C (2 min), 8 °C/min, 300 °C (10 min)] observándose en el cromatograma la presencia de un pico mayoritario con  $T_R$  de 25.42 con un espectro similar a taraxerol, con un porcentaje de abundancia de 97.22% (**Figura 2.15**).

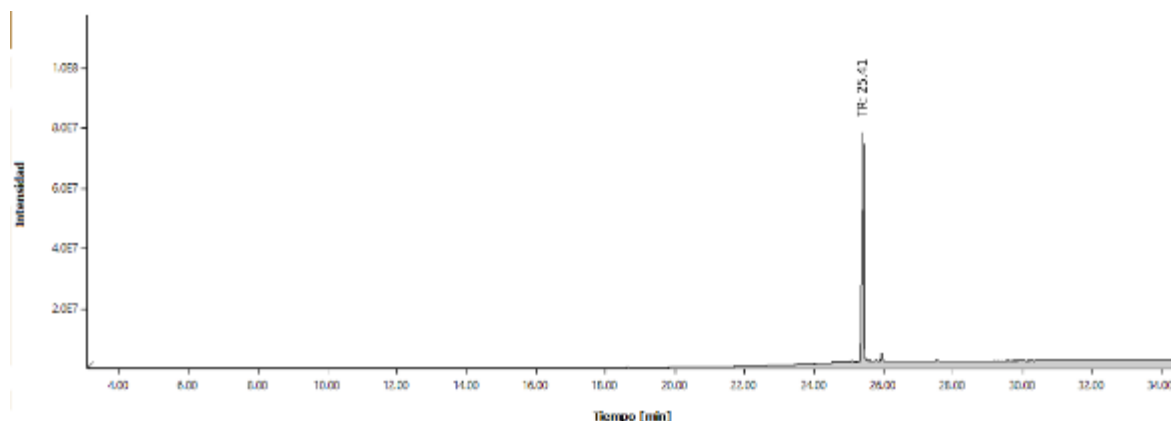


Figura 2.15. Cromatograma de gases de la fracción DCi-7c.

El espectro de fragmentación de masas (**Figura 2.17**) presenta un ion molecular de  $m/z$  426  $[M]^+$ , además fragmentos característicos de taraxerol de  $m/z$  204 ion base y 133 (Branco *et al.*, 2004). La descomposición tipo retro Diels-Alder generó la ruptura del anillo D presentando un fragmento de  $m/z$  302  $[C_{21}H_{34}O]^+$ , además el fragmento de la pérdida del metilo de  $m/z$  287  $[302 - 15(CH_3)]^+$ . Por lo que se sospecha que se trata del taraxerol (**Figura 2.16**), también conocido como alnulina, skimmiol o *D*-Friendoolean-14-en-3beta-ol con formula molecular  $C_{30}H_{50}O$  (HMDB, 2021).

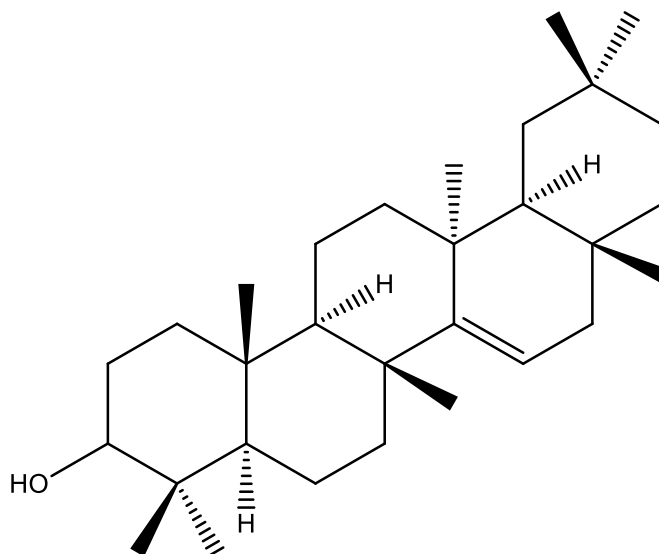


Figura 2.16. Estructura de taraxerol.

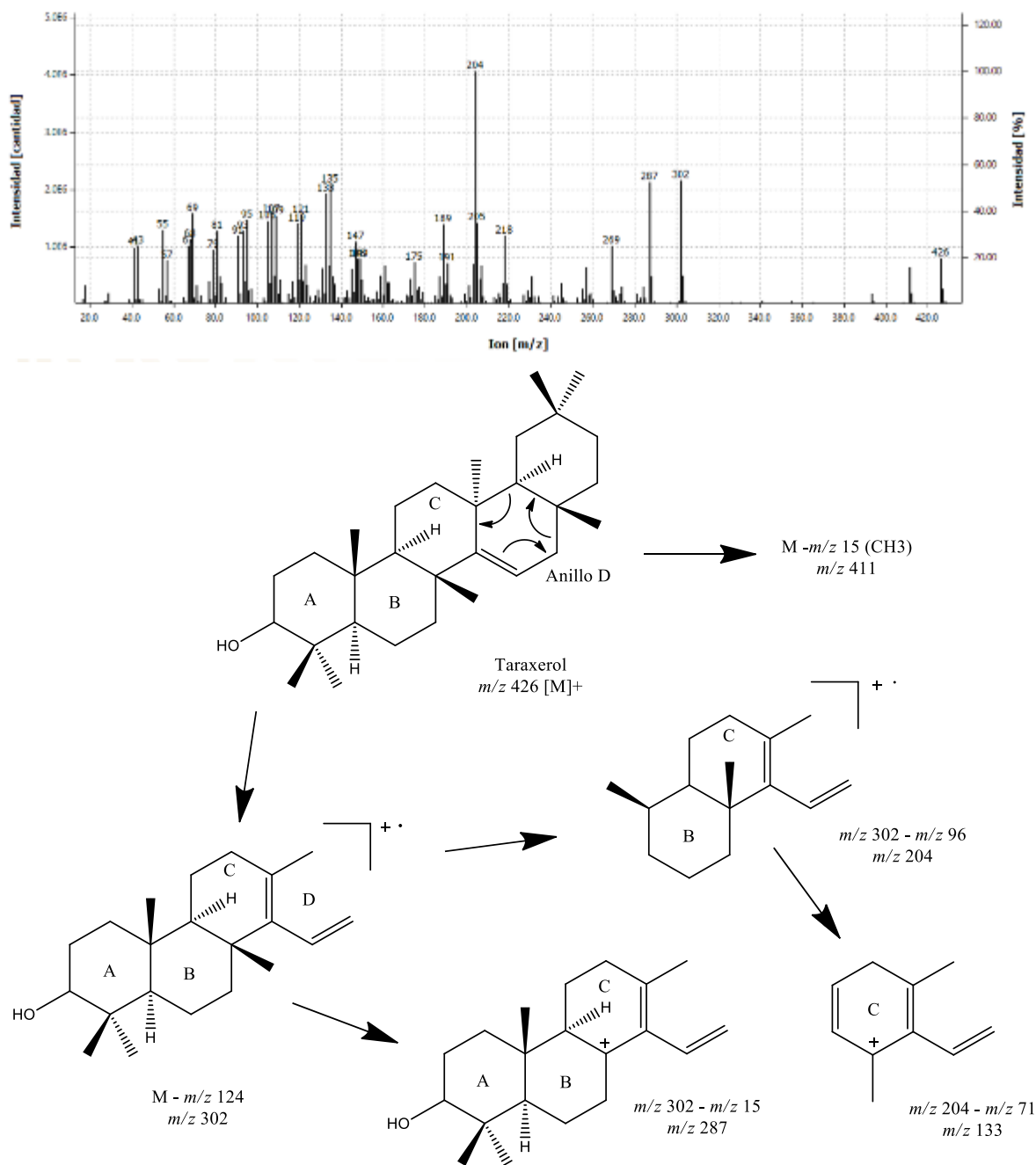


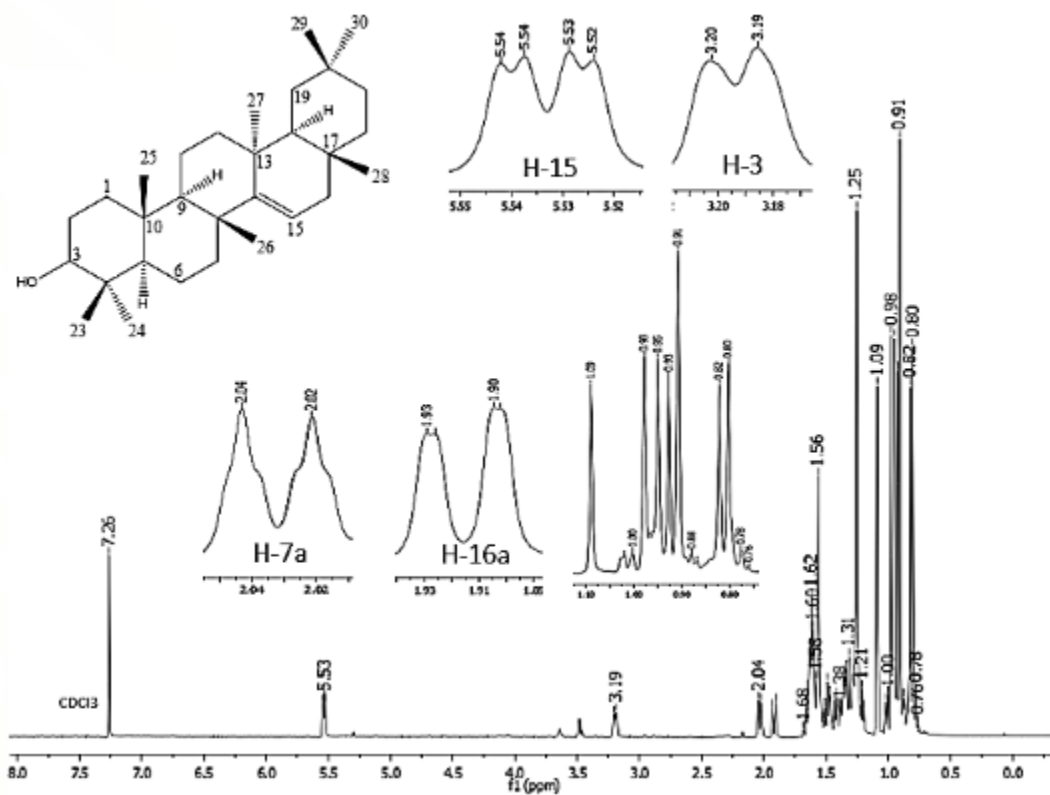
Figura 2.17. Espectro de fragmentación de masas de DCi-7

En el espectro  $H^1$ -RMN (Figura 2.18) se observa una señal de doble de dobletes en  $\delta$  5.53 (dd, 1H,  $J = 2.83$  y  $8.07$  Hz) que corresponde al protón (H) unido a un carbono (C15) con insaturación

y de acuerdo a su acoplamiento tiene un metileno vecino. Otra señal desplazada es un doble de dobletes en  $\delta$  3.19 (dd, 1H,  $J = 9.94$  Hz) correspondiente a un H unido a un carbón con un hidroxilo (C3). Por otro lado, la señal doble de tripletes en  $\delta$  2.03 (dt, 1H,  $J = 3.12, 5.90$  y  $13.05$  Hz) corresponde a un protón de un metileno que de acuerdo a su acoplamiento tiene como vecino un metileno y un carbono cuaternario, Hernández-Chávez en el año 2011 designa esta señal al Ha del carbono 7. Otra señal marcada es doble de doblete en  $\delta$  1.92 (dd, 1H,  $J = 1.63$  y  $14.45$  Hz) correspondiente a un Ha unido al carbono 16 vecino de un carbono con insaturación. En la zona de los metilos se observan siete señales de singuletes en  $\delta$  1.09, 0.98, 0.95, 0.93, 0.91, 0.82 y 0.80, seis de estas señales corresponden a seis metilos en la molécula, sin embargo, la señal 0.91 acopla para 6H correspondientes a dos metilos. En el **Cuadro 2.5** se observa la comparación de este espectro con los datos de dos espectros de taraxerol previamente reportados.

**Cuadro 2.5.** Comparación de los datos de  $H^1$ -RMN de la muestra DCi-7c con taraxerol (Hernández-Chávez, 2011; Tareq *et al.*, 2009).

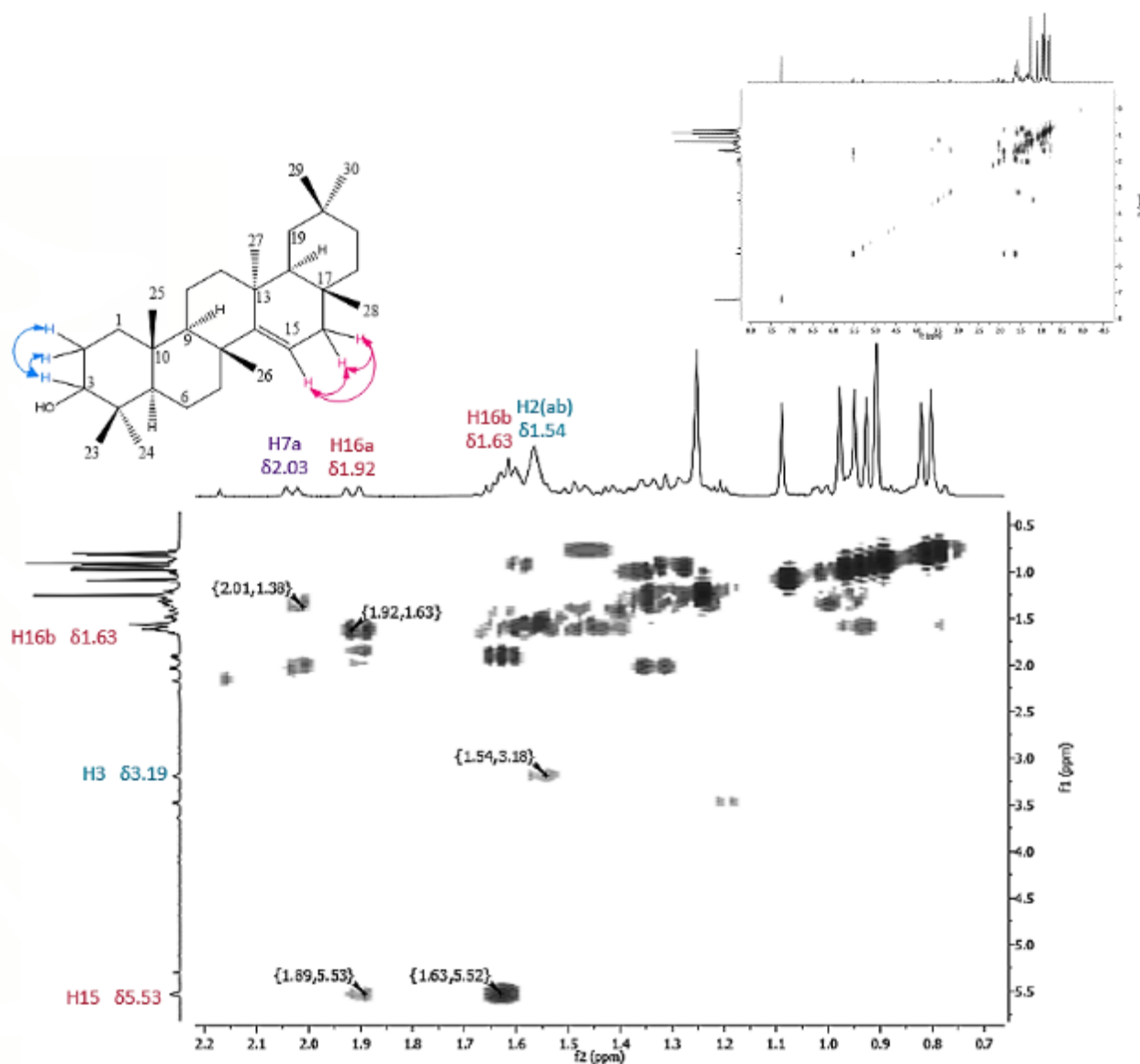
Posición	Muestra DC17c (600 MHz, $CDCl_3$ )	Taraxerol (Tareq <i>et al.</i> ) (400 MHz, $CDCl_3$ )	Taraxerol (Hernández) (400 MHz, $CDCl_3$ )
3	3.19 (1H, dd, $J = 9.94$ Hz)	3.19 (dd, $J = 9.2$ Hz)	3.24 (1H, dd, $J = 13.0, 4.7$ Hz)
7	a 2.03 (1H, dt, $J = 13.05, 5.90, 3.12$ Hz)		a 2.03 (1H, dt, $J = 12.6, 3.1$ Hz)
15	5.53 (1H, dd, $J = 8.07, 2.83$ Hz)	5.52 (1H, dd, $J = 8.0, 3.2$ Hz)	5.53 (1H, dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz)
16	a 1.92 (1H, dd, $J = 14.45, 1.63$ Hz)		a 1.92 (1H, dd, $J = 14.7, 3.0$ Hz)
3H ( $CH_3$ )	1.09 (s)	1.08 (s)	1.09 (s)
	0.98 (s)	0.97 (s)	0.98 (s)
	0.95 (s)	0.94 (s)	0.95 (s)
	0.93 (s)	0.92 (s)	0.93 (s)
	0.91 (6H, s)	0.90 (6H, s)	0.91 (s)
	0.82 (s)	0.82 (s)	0.82 (s)
	0.80 (s)	0.80 (s)	0.80 (s)



**Figura 2.18.** Espectro  $H^1$ -RMN de la muestra DCi-7c con la estructura de taraxerol indicando los protones de las señales características.

En el espectro de COSY (Espectroscopia de correlación) (**Figura 2.19**) podemos comprobar principalmente los acoplamiento entre los protones del carbono 15 y 16 y del carbono 3. En el espectro se observa una señal que corresponde al acoplamiento de  $\delta$  5.53 (H15) con sus protones del metileno vecino en  $\delta$  1.92 (H16a) y 1.63 (H16b), y a su vez, la señal en  $\delta$  1.92 (H16a) muestra un acoplamiento con  $\delta$  1.63 (H16a). Por otro lado, se muestran una señal correspondientes a  $\delta$  3.19 (H3) acoplado con  $\delta$  1.54 (H2), tal acoplamiento podría ser con Ha y Hb. Otra señal que se observa, es el acoplamiento  $\delta$  2.03 con  $\delta$  1.38, que corresponde a un metileno acoplado con un metileno.





**Figura 2.19.** Espectro 2D COSY de la muestra DCi-7c. Espectro 2D COSY completo y su acercamiento en la zona con las señales principales.

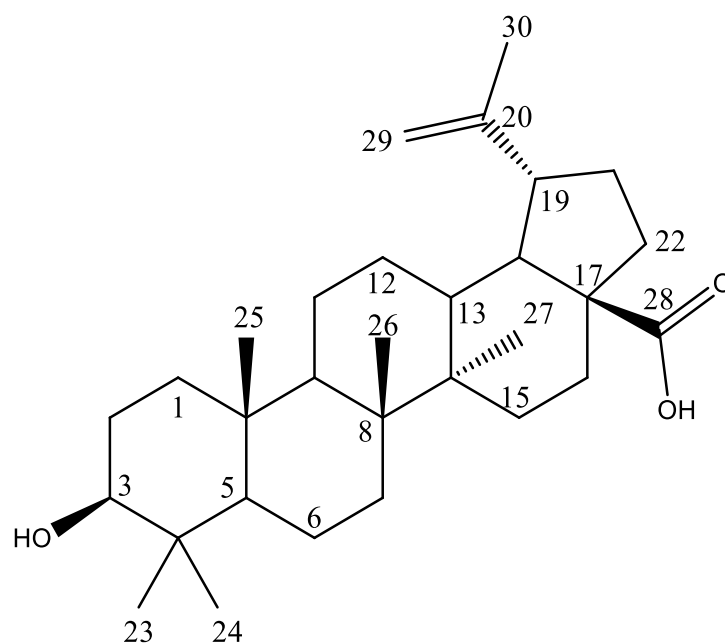
El taraxerol es ampliamente distribuido en el reino vegetal (Ji *et al.*, 2021; Mondal *et al.*, 2020; Sharma y Zafar, 2015; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2013), incluyendo géneros como *Myrica*: *M. esculenro*, *M. cerífera* y *M. rubra* (Sakurai *et al.*, 1987); y *Alnus*: *A. hirsuta*, *A. rubra* y *A. nepalensis* (Sati *et al.*, 2011). Así mismo, esta molécula se ha aislado en una gran variedad de especies, como lo es *Capuna cinerea* (Gachet *et al.*, 2011), *Alchornea latifolia* (Setzer *et al.*, 2000), *Euphorbia hirta* (Al-Snafi, 2017). Además, taraxerol se ha identificado en las macroalgas

marinas de la especie *Caulerpa*: *C. lamourouxii*, *C. sertularioides* y *C. racemosa* (Azhaguraj *et al.*, 2012).

El taraxerol es un terpenoide que poseen acciones antitumorales notable sobre los tumores mamarios espontáneos de ratón, actividad antiinflamatoria significativa en ratas albinas, aumenta los efectos inhibidores de los medicamentos contra el cáncer, efectos beneficiosos en el Alzheimer y el parkinsonismo, posee potencial antimicrobiano, beneficia en la diabetes, y además exhibe actividad contra el veneno de serpiente (Sharma y Zafar, 2015). Taraxerol mostro actividad antitripanosomal con valores de  $CE_{50}$  de  $<10 \mu\text{M}$  contra *Trypanosoma brucei* rhodesiense, y exhibe baja citotoxicidad (Gachet *et al.*, 2011). Además, el extracto de cloroformo de las hojas de *Taraxacum officinale* con taraxerol inhibe la replicación de los virus de la fiebre amarilla (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2013). Asimismo, el taraxerol de *Clerodendrum* spp. ha mostrado posibles actividades antivirales con características farmacológicas deseables, y en un cribado virtual basado en el acoplamiento molecular con SARS-CoV-2, taraxerol y el fármaco estándar nelfinavir mostraron energías similares para complejo de proteasas principales (Mpro), mientras que los complejos de las enzimas convertidoras de angiotensina 2 (ACE2) y de la proteína de espiga (proteína S) el taraxerol muestra mejores energías de unión que nelfinavir. La constante de inhibición prevista para el taraxerol es de  $5.36 \mu\text{M}$  para Mpro,  $1.65 \mu\text{M}$  para S-proteína, y  $7.51 \mu\text{M}$  para ACE2 humanas (Mondal *et al.*, 2020).

### 3.4. Análisis de la muestra DCt-7

La fracción DCt-7 se obtuvo a partir del extracto hexánico de la corteza de *Diospyros anisandra*, la cual es soluble en  $\text{CHCl}_3$ . Una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases con espectrometría de masas a diferentes condiciones de corrida, pero no se logró observar el compuesto en el cromatograma, lo que nos indica que es un compuesto no volátil. Además, de acuerdo a estudios espectroscópicos (FT-IR,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y COSY), uno de los componentes de esta fracción corresponde al ácido betulínico (**Figura 2.20**).



**Figura 2.20.** Estructura del ácido betulínico.

Con el fin de conocer los grupos sustituyentes de la molécula en DCt-7, la muestra fue enviada a Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). El espectro mostro los pico de absorción de vibraciones de estiramiento del hidroxilo a  $3460\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones de estiramiento C-H a  $2940\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones de estiramiento del carbonilo a  $1690\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones del estiramiento C=C a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , deformación de C-H del grupo  $\text{CH}_2$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$ , deformación C-H del grupo  $\text{CH}_3$  a  $1370\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones de estiramiento C-OH a  $1040\text{ cm}^{-1}$ , y deformación del anillo con átomos de H adyacentes a  $882\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 2.21**). La comparación con el estándar del ácido betulínico se realiza en el **Cuadro 2.6**.

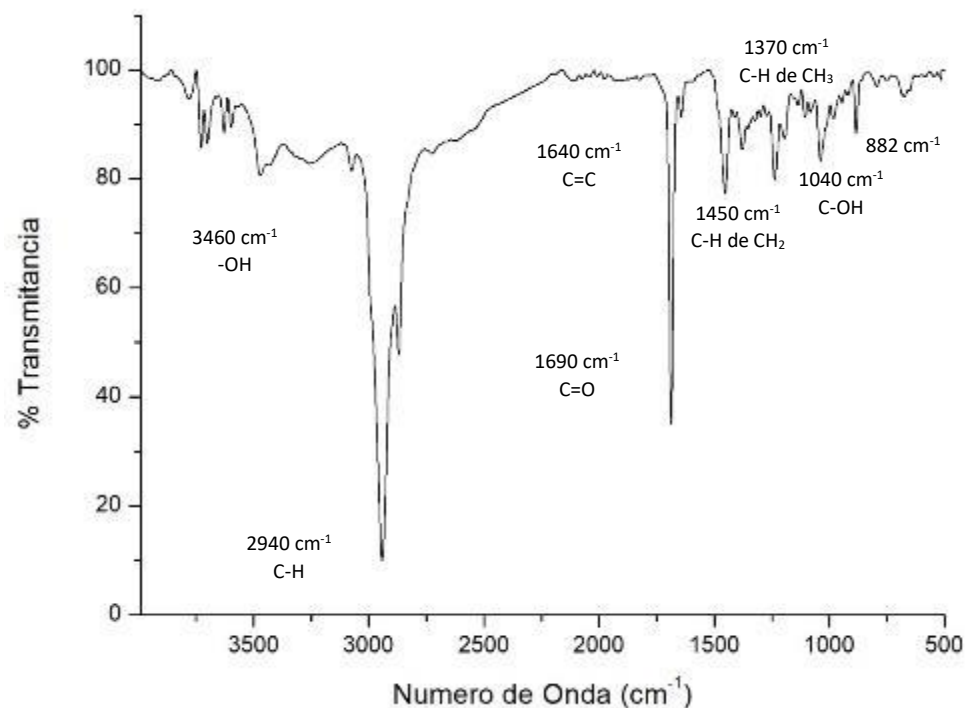
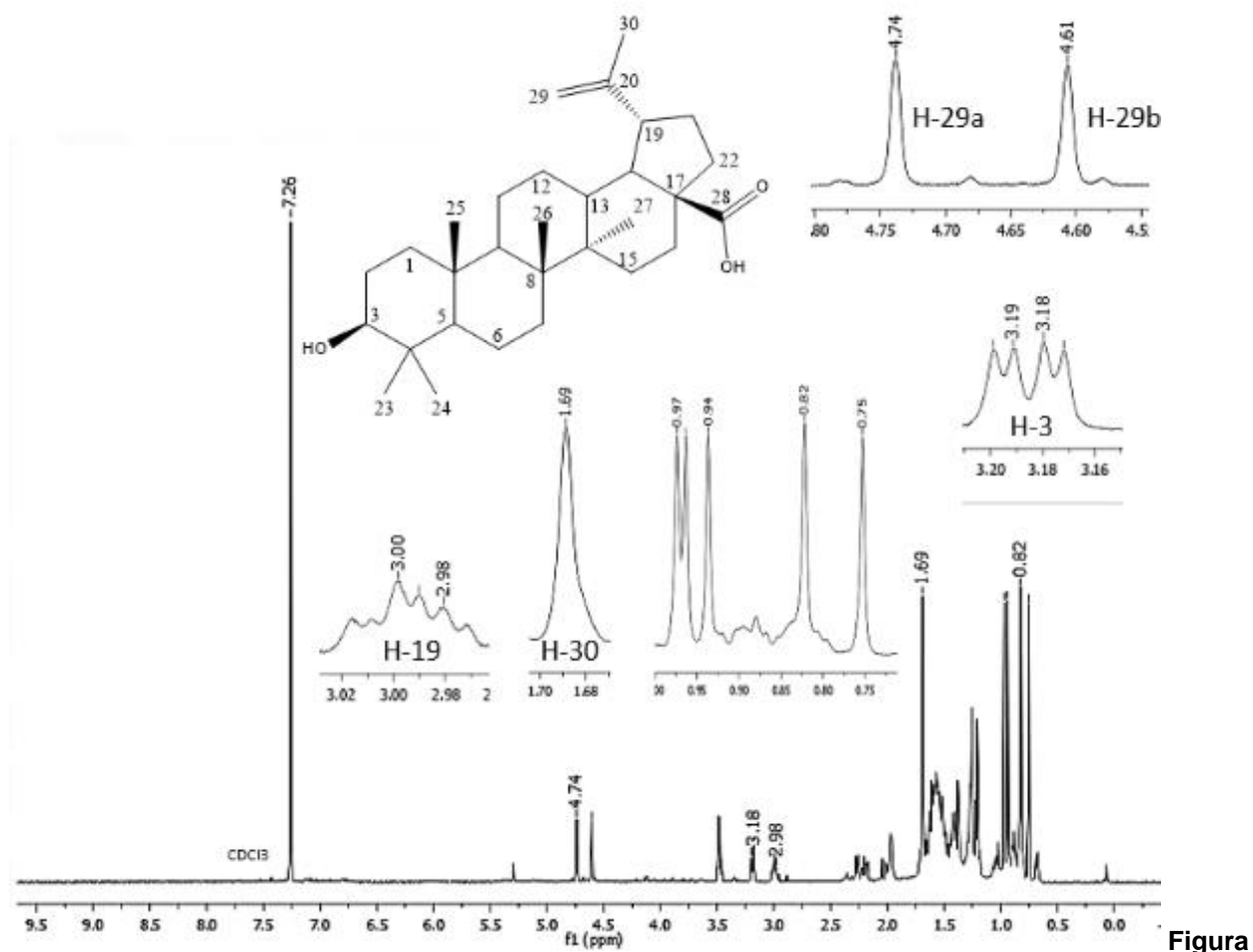


Figura 2.21. Espectro FT-IR de la muestra DCt-7.

Cuadro 2.6. Comparación de los datos del espectro FT-IR de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (SDBS, 2021; Pai *et al.*, 2011).

Muestra DCt-7 $\lambda_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	Estándar Acido betulínico (Pai <i>et al.</i> ) $\lambda_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	Ácido betulínico (SDBS) $\lambda_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	Bandas asignadas
3460	3446	3428	Vibración de estiramiento O-H
2940	2943	2944	Vibración de estiramiento C-H
2870	2869	2871	Vibración de estiramiento C-H
1690	1668	1693	Vibración de estiramiento C=O
1640	No asignado	1642	Vibración de estiramiento C=C
1450	1452	1464	Deformación C-H del grupo CH <sub>2</sub>
1370	1378	1377	Deformación C-H del grupo CH <sub>3</sub>
-	-	1108	-
1040	1038	1009	Vibración de estiramiento C-OH
882	883	884	Deformación del anillo con dos átomos de H adyacentes

En el espectro H<sup>1</sup>-RMN (**Figura 2.22**) se observan dos señales de dos singuletes en  $\delta$  4.74 y  $\delta$  4.61 que corresponden a dos protones (H) de un carbón vinílico (C29). Otra señal desplazada es un doble de dobletes en  $\delta$  3.18 (dd, 1H,  $J = 4.57$  y  $10.99$  Hz) correspondiente a un H unido a un carbón con un hidroxilo (C3). Por otro lado, la señal multiplete en  $\delta$  2.98 corresponde a un protón unido a un carbono terciario (C19). Además, la señal marcada como un singulete con mayor desplazamiento en  $\delta$  1.69 corresponde a un metilo con una desprotección cercana ocasionada por una insaturación. En la zona de los metilos se observan cinco señales de singuletes en  $\delta$  0.97, 0.96, 0.94, 0.82 y 0.75, cinco de estas señales corresponden a los cinco metilos en la molécula. En el **Cuadro 2.7** se observa la comparación de este espectro con los datos de dos espectros de ácido betulínico previamente reportados.



**Figura 2.22.** Espectro H<sup>1</sup>-RMN de la muestra DCt-7 con la estructura del ácido betulínico indicando los protones de las señales características.

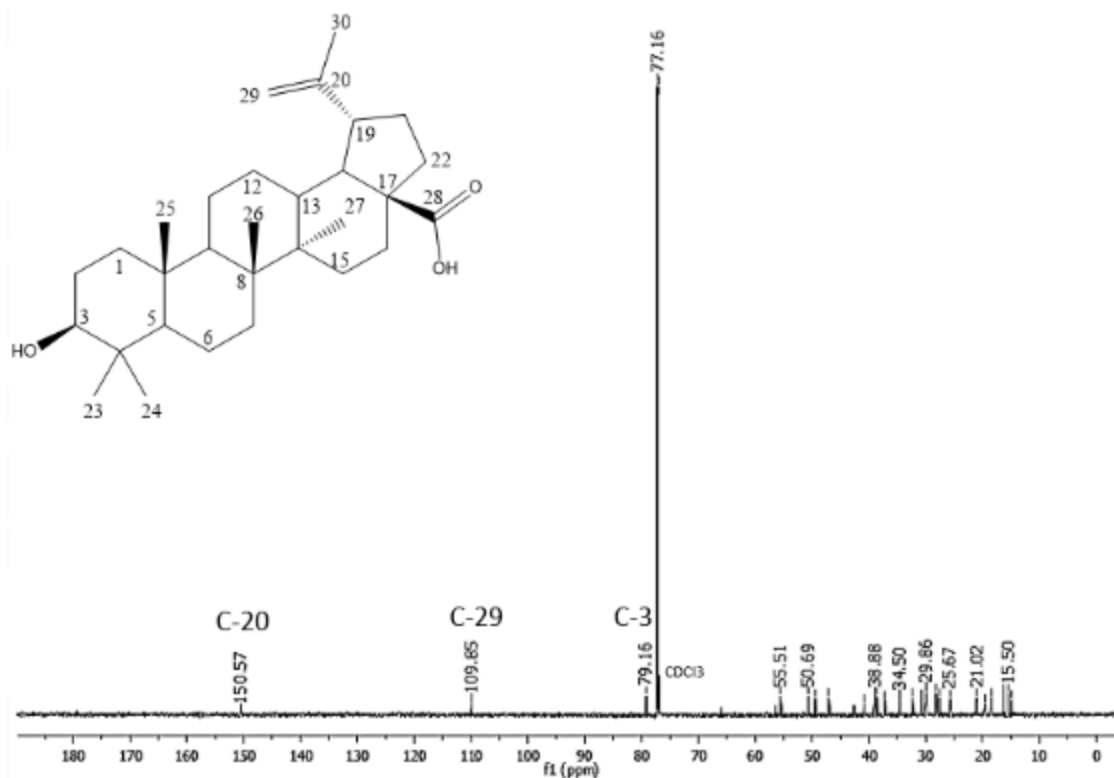
**Cuadro 2.7.** Comparación de los datos de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (Pérez-Valera, 2018; Uc-Cachón, 2012).

Posición	Muestra DCt-7 (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Ácido betulínico (Uc-Cachón) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	Ácido betulínico (Pérez-Valera) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
3	3.18 (1H, dd, $J = 10.99, 4.57$ Hz)	3.19 (1H, dd, $J = 1.2, 4.8$ Hz)	3.19 (1H, dd, $J = 11.2, 5.0$ Hz)
19	2.98 (1H, m)	2.99 (1H, td, $J = 11.1, 4.6$ Hz)	3.00 (1H, ddd, $J = 10.4, 10.4, 4.3$ Hz)
29	a 4.74 (1H, s) b 4.61 (1H, s)	a 4.60 (1H, s) b 4.68 (1H, s)	a 4.74 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) b 4.61 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)
30	1.69 (3H, s)	1.69 (3H, s)	1.69 (3H, s)
3H ( $\text{CH}_3$ )	0.97 (s)	0.97 (s)	0.98 (s)
	0.96 (s)	0.96 (s)	0.97 (s)
	0.94 (s)	0.93 (s)	0.94 (s)
	0.82 (s)	0.82 (s)	0.82 (s)
	0.75 (s)	0.75 (s)	0.75 (s)

Al analizar el espectro  $\text{C}^{13}$ -RMN (**Figura 2.23**) se observan 30 señales correspondientes a 30 carbonos, confirmando ser un triterpeno. El carbono más desplazado en  $\delta$  150.57 corresponde a un carbono cuaternario unido a una insaturación (C20). Seguido de este, el pico en el desplazamiento  $\delta$  109.85 corresponde a un carbono vinílico (C29). Otra señal con mayor desplazamiento, se encuentra en  $\delta$  79.16 correspondiente a un carbono unido a un hidroxilo (C3). La comparación con otros espectros  $\text{C}^{13}$ -RMN del ácido betulínico reportados en la literatura se muestra en el **Cuadro 2.8**.

**Cuadro 2. 8.** Comparación de los datos de C<sup>13</sup>-RMN de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (Pérez-Valera, 2018; Uddin *et al.*, 2011).

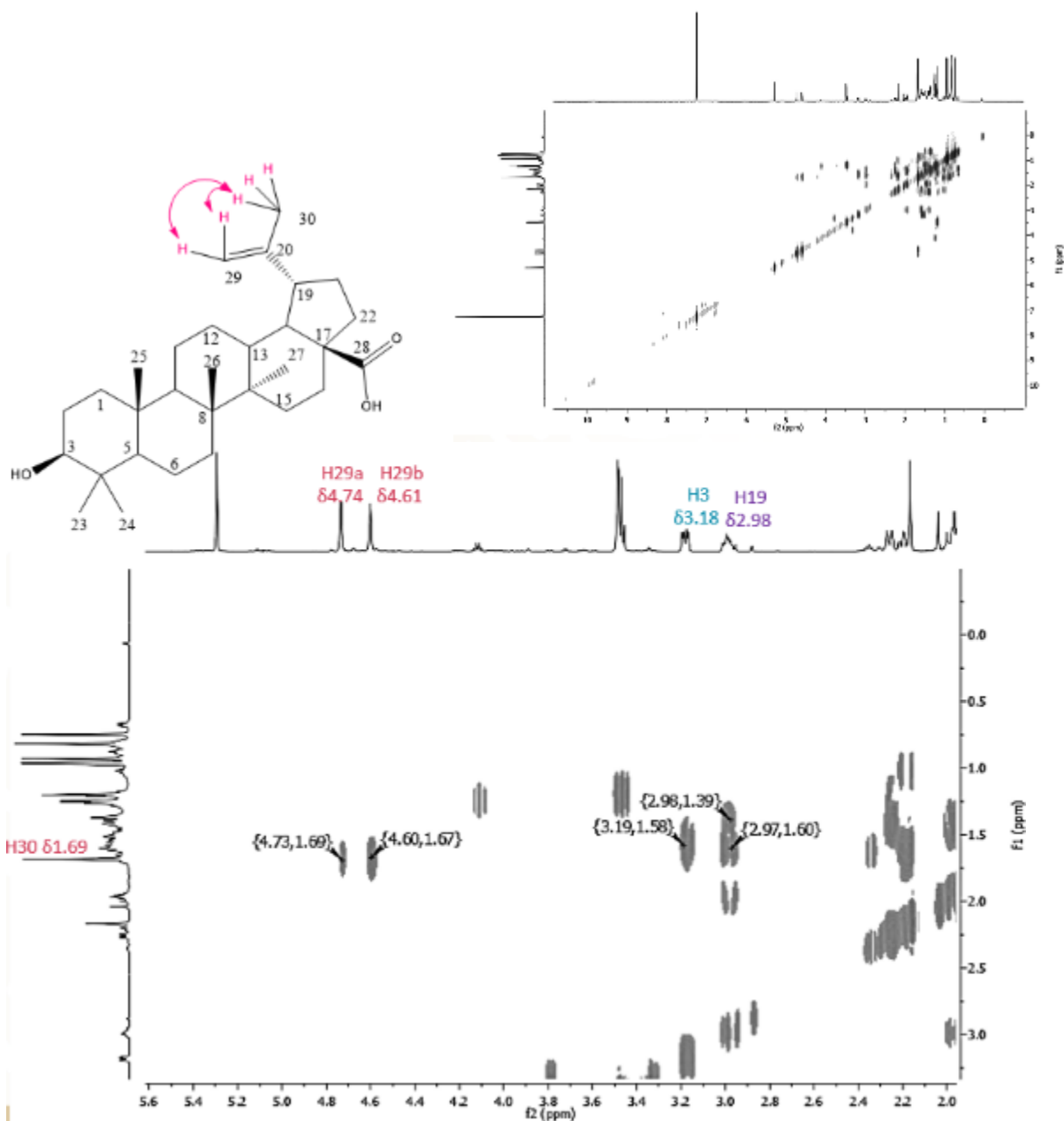
Posición	Muestra DCt-7 (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Ácido betulínico (Uddin <i>et al.</i> ) (75 MHz)	Ácido betulínico (Pérez-Valera) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
1	38.53 (CH <sub>2</sub> )	38.87 (CH <sub>2</sub> )	38.39
2	27.57 (CH <sub>2</sub> )	27.9 (CH <sub>2</sub> )	27.41
3	79.16 (CH)	79.02 (CH)	79.01
4	39.03 (C)	38.72 (C)	38.87
5	55.51 (CH)	55.5 (CH)	55.36
6	18.45 (CH <sub>2</sub> )	18.31 (CH <sub>2</sub> )	18.29
7	34.50 (CH <sub>2</sub> )	34.3 (CH <sub>2</sub> )	34.34
8	40.86 (C)	40.93 (C)	40.71
9	50.69 (CH)	50.50 (CH)	50.53
10	37.37 (CH <sub>2</sub> )	37.20 (C)	37.22
11	21.02 (CH <sub>2</sub> )	20.80 (CH <sub>2</sub> )	20.86
12	25.67 (CH <sub>2</sub> )	25.22 (CH <sub>2</sub> )	25.51
13	38.88 (CH)	38.40 (CH)	38.72
14	42.60 (C)	42.40 (C)	42.45
15	29.86 (CH <sub>2</sub> )	30.60 (CH <sub>2</sub> )	29.71
16	32.30 (CH <sub>2</sub> )	32.10 (CH <sub>2</sub> )	32.15
17	56.40 (C)	56.30 (C)	56.27
18	49.43 (CH)	46.80 (CH)	49.28
19	47.02 (CH)	49.20 (CH)	46.88
20	150.57 (C)	150.40 (C)	150.40
21	30.70 (CH <sub>2</sub> )	29.76 (CH <sub>2</sub> )	30.55
22	37.17 (CH <sub>2</sub> )	34.09 (CH <sub>2</sub> )	37.02
23	28.15 (CH <sub>3</sub> )	27.99 (CH <sub>3</sub> )	27.99
24	15.50 (CH <sub>3</sub> )	15.30 (CH <sub>3</sub> )	15.35
25	16.18 (CH <sub>3</sub> )	16.00 (CH <sub>3</sub> )	16.03
26	16.29 (CH <sub>3</sub> )	16.10 (CH <sub>3</sub> )	16.13
27	14.86 (CH <sub>3</sub> )	14.77 (CH <sub>3</sub> )	14.70
28	-	180.30 (C)	179.72
29	109.87 (CH <sub>2</sub> )	109.60 (CH <sub>3</sub> )	109.70
30	19.53 (CH <sub>3</sub> )	19.40 (CH <sub>3</sub> )	19.38



**Figura 2.23.** Espectro  $C^{13}$ -RMN de la muestra DCt-7 con la estructura del ácido betulínico indicando los protones de las señales características.

En el espectro de COSY (**Figura 2.24**) podemos comprobar principalmente los acoplamiento entre el grupo de protones del metilo del carbono 30 en  $\delta$  1.69 con los dos protones del carbón vinílico 29 en  $\delta$  4.74 y 4.61. En el espectro se observa una señal en  $\delta$  3.18 que corresponde al acoplamiento del protón en el C3 con el protón del metileno en C2, y una señal en  $\delta$  2.98 del protón del carbono terciario 19 que acopla con algún metileno.





**Figura 2.24.** Espectro 2D COSY de la muestra DCt-7. Espectro 2D COSY completo y su acercamiento en la zona con las señales principales.

El ácido betulínico, (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-lup-20 (29)-en-28-oico) es un triterpenoide de tipo lupano pentacíclico de origen natural y se distribuye ampliamente por todo el reino vegetal (Moghaddam *et al.*, 2012). Existen cantidades considerables de ácido betulínico (hasta un 2,5%) en la corteza exterior de una variedad de especies de árboles valiosos para la madera (Yogeeswari y Sriram, 2005). Sin embargo, el abedul (*Betula* spp., Betulaceae) es una de las fuentes más conocidas de

ácido betulínico y betulina, que puede obtenerse en cantidades considerables. Además, el ácido betulínico podría aislarse de diversas fuentes, como *Ziziphus* spp. (Rhamnaceae), *Syzygium* spp. (Myrtaceae), *Diospyros* spp. (Ebenaceae) y *Paeonia* spp. (Paeoniaceae) (Moghaddam *et al.*, 2012).

El ácido betulínico exhibe una variedad de propiedades biológicas y medicinales, como la inhibición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), antibacteriano, antipalúdico, antiinflamatorio, antihelmíntico, antinociceptivo, anti-HSV-1 y actividades contra el cáncer (Moghaddam *et al.*, 2012).

#### 4. CONCLUSIONES

De acuerdo al patrón de fragmentación obtenido por análisis CG-ES se identificó en hoja de *D. anisandra* los terpenos betulina y lupeol; en raíz taraxerol, lupeol y  $\beta$ -sitosterol; asimismo, en corteza se identificó  $1\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno en el extracto DC; estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol y lupeol en la fracción DC5;  $\gamma$ -sitosterol en DC7; taraxerol en DC6-3; estigmastan-3,5-dieno, estigmasterol y  $\gamma$ -sitosterol en DCf-2; teucdiol A en DCd-1; y 7-*epi*-selin-4(15)-en- $1\beta$ ,11-diol en DCe-2.

Además, con base al peso molecular, patrón de fragmentación másico, espectro de  $H^1$ -RMN y en algunos casos el acoplamiento COSY, FT-IR y  $C^{13}$ -RMN se confirmó la estructura en la muestra DCs11-12 como compuesto mayoritario 7-*epi*-selin-4(15)-en- $1\beta$ ,11-diol, en la muestra DCu-5 el triterpeno taraxerona, en la muestra DCi-7c el compuesto taraxerol, y en la muestra DCt-7 el compuesto ácido betulínico.

Los terpenoides taraxerona y taraxerol se han reportado dentro del género *Diospyros* de la familia *Ebenaceae*, pero no en *Diospyros anisandra*. En cambio, 7-*epi*-selin-4(15)-en- $1\beta$ ,11-diol y ácido betulínico se ha identificado únicamente en la corteza de *Diospyros anisandra*.

## CAPÍTULO III

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL E INHIBICIÓN DE NEURAMINIDASA DE COMPUESTOS TERPÉNICOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *Diospyros anisandra*

#### 1. INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad infecciosa cuya distribución y rango de huéspedes es muy amplio y es causada por un virus de tipo RNA perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de influenza tipo A se caracterizan por ser envueltos y polimórficos. Su genoma está constituido por RNA de polaridad negativa dividido en 8 segmentos que codifican para al menos once proteínas. El desarrollo de biológicos contra influenza data de hace más de 60 años, cuando se prepararon vacunas inactivadas con sustrato de huevos embrionados de pollo, siendo este método usado por décadas. Hoy, las líneas celulares MDCK (Madin Darby Canine Kinder) son empleadas con mayor frecuencia para el aislamiento del virus de Influenza y su utilización en la producción de vacunas (Mancipe-J. *et al.*, 2011).

La línea de células MDCK fue originalmente aislada en 1958 a partir de riñón de un perro adulto, aparentemente normal, de raza Cocker Spaniel, la cual fue subsecuentemente depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) y se designó como CCL34 (registro de líneas celulares animales, 1965). A partir de 1975, el cultivo de células MDCK comenzó a ser ampliamente utilizado para el aislamiento de virus de influenza A, es rutinariamente empleado en programas de vigilancia en salud pública, virología clínica y en laboratorio de investigación en todo el mundo por servir como un sustrato para el cultivo de virus de influenza mostrando una buena sensibilidad y permitiendo el crecimiento de un amplio rango de diferentes cepas de virus (Mancipe-J. *et al.*, 2011).

Las células MDCK se emplean en ensayos de reducción del efecto citopático (REC) (vacuolización y muerte celular). El ensayo REC consiste en la visualización de las alteraciones morfológicas de las células, que resultan en la muerte celular, ocasionada por la infección viral. Este efecto es diferente dependiendo el tipo de virus (Arbiza, 2006).

Por otra parte, el virus de influenza tiene dos glucoproteínas antigénicas en la superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Una función de NA está relacionada con la movilidad del virus de influenza dentro del tracto respiratorio. Otra función de NA, es escindir en la

estructura de glicanos del moco permitiendo al virus llegar a las células huésped. Así mismo, permite al virus maduro separarse de la célula huésped durante la liberación y evitar la autoagregación mediada por HA. Sin embargo, la enzima NA no solo es específica de los virus, sino que también se ha reportado como proteína de superficie de otros patógenos, incluidas bacterias como: *Clostridium perfringens*. Estos NA bacterianos pueden adherirse al enlace  $\alpha$ -(2,3) del ácido siálico de los glicoconjugados, por lo que algunos grupos de investigación aplican ensayos *in vitro* con NA bacterianas (*C. perfringens* y *V. cholerae*) para identificar potenciales agentes antivirales. A pesar de que los valores obtenidos por los ensayos que usan NA bacterianos debe ser considerado con precaución si se compara con los datos obtenidos por los ensayos que usan NA viral, siguen siendo una forma rápida y sencilla en el descubrimiento de fármacos con actividad NA (Grienke *et al.*, 2012). En el presente capítulo se reporta la evaluación de fracciones y compuestos terpénicos aislados de *D. anisandra* empleando este tipo de ensayos *in vitro*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material y equipo de laboratorio

En los bioensayos de citotoxicidad y reducción del efecto citopático se empleó: Dimetil sulfóxido estéril (DMSO) (Sigma-Aldrich), Medio Mínimo Esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 1x (Gibco), suero fetal bovino (FBS) (Gibco), solución salina de fosfatos de Dulbecco sin Calcio ni Magnesio (PBS-A) esterilizada por membrana (Invitrogen); 0.05% tripsina-EDTA (1x) (Gibco), tripsina TPCK 10 mg/mL (Sigma-Aldrich), HEPES  $\geq 99.5\%$  (valoración) (Sigma-Aldrich), Cristal violeta (Sigma-Aldrich), y como antibiótico mezcla de penicilina-estreptomicina 10,000 u/mL en solución salina de NaCl al 0.85% (Invitrogen). También se emplearon cajas de cultivo de forma rectangular 75 cm<sup>2</sup> (Corning®), placas de 96 pozos de fondo plano (Corning®) y cámara de Neubauer 0.0025 mm<sup>2</sup> con profundidad 0.100 mm (Marienfeld).

Los equipos utilizados fueron: cámara de bioseguridad clase II (Nuare, NU-540-400), microscopio invertido (Nikon eclipse, TE2000-U), incubadora con CO<sub>2</sub> MIDI 40 (Thermo Fisher Scientific, 3403), centrifuga (Dynac), agitador vortex (Dlab), y el equipo de lector de placa ELISA (Victor 3x, Perkin Elmer modelo 2030).

En los ensayos de inhibición de neuraminidasa se empleó: agua purificada, buffer de acetato de sodio 50 mM (Jalmek) ajustado a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1M (Jalmek), metanol de grado

industrial destilado en el laboratorio, y placas de 96 pozos de fondo plano (Corning®). El equipo utilizado fue un lector de placa multifuncional (CYTATION 3, BioTek).

## 2.2. Cultivo celular y Cepa viral

Se utilizaron células de riñón canino Madin Darby (MDCK), las cuales se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 1% de penicilina-estreptomicina.

La cepa del virus de influenza empleada fue la A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09. Los virus se propagaron en células MDCK en presencia de tripsina L-1-Tosilamida-2-feniletilclorometilcetona (TPCK) (1 µg/mL) y fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

Las células MDCK y la cepa viral de influenza fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” a cargo de Dra. Guadalupe Ayora Talavera. Así mismo, los bioensayos de citotoxicidad y REC fueron realizados dentro del laboratorio mencionado.

## 2.3. Enzima Neuraminidasa y Sustrato 4-MUNANA

Se utilizó la enzima Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (o *Clostridium welchii*) N2876 (Sigma-Aldrich); así como el sustrato de sal sódica del ácido 2'-(4-Metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico hidrato (4-MUNANA) M8639 (Sigma-Aldrich). Ambos disueltos a diferentes concentraciones (establecidas en el ensayo) en amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 5.0).

## 2.4. Muestras a evaluar

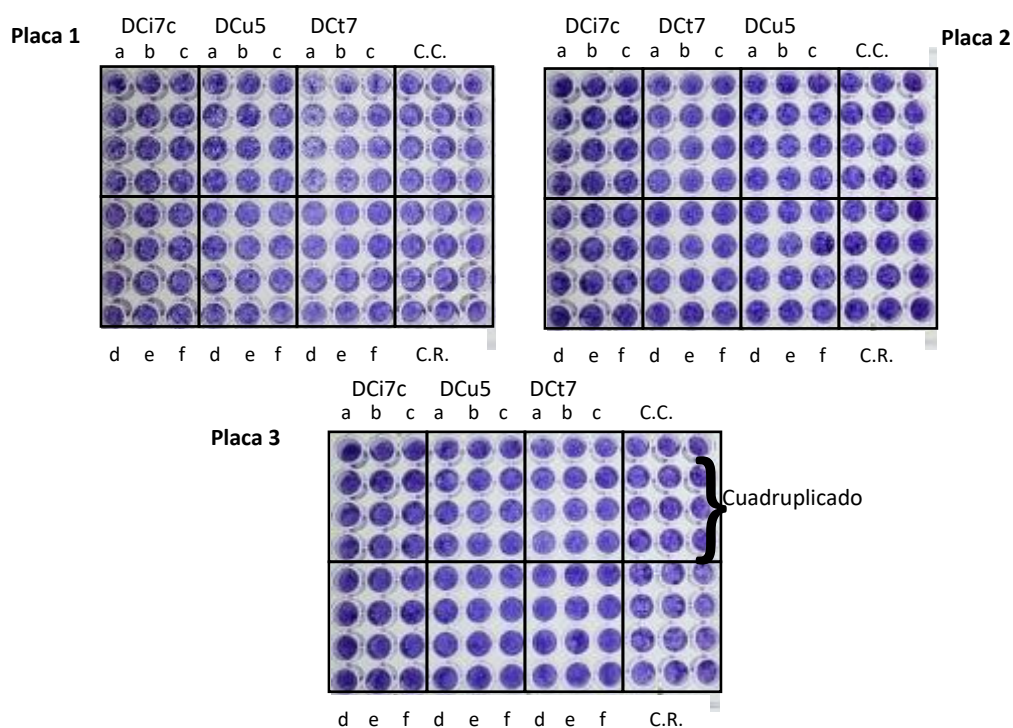
Para los bioensayos de citotoxicidad y REC se evaluaron tres muestras con compuestos triterpenoides obtenidos de la parte hexánica de corteza de *D. anisandra*, los cuales incluyen taraxerol, taraxerona y DCt7 (compuesto mayoritario ácido betulínico). Disueltas al 1% en DMSO.

Para el ensayo de inhibición de NA se evaluaron los tres compuestos terpenoides y tres fracciones obtenidos del extracto hexánico de corteza de *D. anisandra*: lupeol (identificado en fracciones hexánicas de hoja y corteza), taraxerol, taraxerona, DCt7, DCI11-12 (fracción semipura), DCs14-15 (fracción con compuesto mayoritario 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol).

Además, como control positivo se empleó Carboxilato de Oseltamivir y Quercetina (Sigma-Aldrich,  $\geq 95\%$  pureza). Todas las muestras disueltas al 1% en MeOH.

## 2.5. Bioensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de cada muestra se evaluó *in vitro* en células MDCK. Para ello, se sembraron las células MDCK en placas de 96 pozos a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  células/pozo y se incubaron durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se agregó 100  $\mu\text{l}$  de DMEM en los pozos control, y 100  $\mu\text{l}$  de DMEM con el 1% de DMSO en pozos control del DMSO. Se realizaron 6 diluciones dobles seriadas de cada muestra y se aplicaron por cuadruplicado. Las placas se incubaron durante 72 horas. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción con cristal violeta al 0.4% (18.2% metanol y 81.8% agua destilada) y luego se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas multilabel. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Ensayo de citotoxicidad. C.C.: Control celular; C.R.: Control de referencia de DMSO; a: concentración máxima de la muestra (cuadruplicado), 117.37  $\mu\text{M}$  para taraxerol, 117.92  $\mu\text{M}$  para taraxerona, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para Dct-7; b-f: corresponde a las diluciones dobles seriadas de cada compuesto partiendo de la concentración inicial.

### 2.5.1. Análisis de datos

La concentración citotóxica media ( $CI_{50}$ ) se obtiene calculando el porcentaje de viabilidad celular monitorizado a una densidad óptica de 490 nm, para calcular el porcentaje de viabilidad celular en comparación con el blanco se utilizó la ecuación:

$$Viab. \% = \frac{DO_b}{DO_m} \times 100$$

Donde:

$DO_m$  es el valor medio de la densidad óptica (DO) medida de la muestra en prueba;

$DO_b$  es el valor medio de la DO medida de los espacios asignados para control o blanco.

Cuanto menor sea el valor de Viab.%, mayor será el potencial citotóxico del compuesto y/o extracto. Si la viabilidad se reduce a <70% del blanco, tiene un potencial citotóxico. La concentración citotóxica media ( $CI_{50}$ ) se determina graficando la curva dosis-respuesta de la concentración del compuesto ( $\mu M$ ) obtenida contra el porcentaje de viabilidad calculado en el programa de GraphPad prism 9.

### 2.6. Evaluación de la actividad antiviral: Reducción del Efecto Citopático (REC)

El término efecto citopático se aplica con frecuencia a los cambios celulares visibles por microscopia óptica inducidos por virus, incluyen: desprendimiento (en placa), hinchazón o encogimiento de las células, fusión celular (formación de sincitios) y formación de cuerpos de inclusión (visibles por tinción). En el ensayo REC se observa el efecto citopático a medida que las células de la monocapa se deterioran como resultado de la infección viral (Dilnessa y Zeleke, 2017). Si el efecto citopático es fuerte, después de la adición de un fármaco/compuesto, las células infectadas se desprenden de la placa de cultivo y apenas se detecta la tinción con cristal violeta. Por lo contrario, si el compuesto/fármaco muestra actividad antiviral, las monocapas permanecen unidas y la tinción de cristal violeta es claramente visible (Kato *et al.*, 2020).

El bioensayo *in vitro* de REC se llevó a cabo, primeramente, sembrando las células MDCK en placas de 96 pocillos a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  células/pozo y se incubó durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se infectaron las células con virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 a una Multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 PFU/mL, y se incubó durante 1 hora

a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se aplicó las 6 diluciones dobles seriadas de cada muestra por cuadruplicado y se incubaron las células con DMEM suplementado con tripsina TPCK a una concentración final de 1 µg/mL. Después de incubar por 72 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, la viabilidad celular se determinó mediante la tinción con cristal violeta al 0.4% (18.2% metanol y 81.8% agua destilada) y luego se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas multilabel. Los datos se analizaron por cuadruplicado.

### 2.6.1. Análisis de datos

La concentración efectiva inhibitoria del virus del 50% (CE<sub>50</sub>) se calcula con la ecuación de regresión compuesta por el porcentaje de inhibición viral:

$$\% \text{ inhibición viral} = \frac{DO_m - DO_v}{DO_c - DO_v} \times 100$$

Donde:

*DO<sub>m</sub>* es el valor medio de la DO medida para los pocillos de células tratada con virus y muestra;

*DO<sub>v</sub>* es el valor medio de la DO medida para los pocillos de células infectadas con virus (control de virus);

*DO<sub>c</sub>* es el valor medio de la DO medida para los pocillos de células sin virus (célula control).

La CE<sub>50</sub> se determina graficando la curva dosis-respuesta de la concentración del compuesto (µM) obtenida contra el porcentaje de inhibición viral y se calcula el 50% en el programa de GraphPad prism 9.

La actividad antiviral se expresa como un índice de selectividad (IS), si IS es mayor a 3 indica una actividad antiviral potencial del compuesto de prueba y debe evaluarse más a fondo (Chattopadhyay *et al.*, 2009),

$$IS = \frac{CI_{50}}{CE_{50}}$$

### 2.7. Ensayo de Inhibición de la actividad de Neuraminidasa (NA)

El ensayo de inhibición de NA se llevó a cabo empleando una NA obtenida de *C. perfringens*. Primeramente, el sustrato de sal sódica 4-metilumbeliferil-α-D-N-acetilneuramínico hidratado (4-



MUNANA) se disolvió en una solución tampón de acetato de sodio (acetato de sodio 50 mM en agua purificada, ajustando con HCl a pH 5.0) a una concentración de 1.5 mM como solución madre. La enzima de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* se preparó en una solución madre de 0.2 y 0.1 U/mL en tampón de acetato de sodio (pH 5.0). También, las muestras previamente disueltas en MeOH al 1% se prepararon a una concentración máxima como solución madre y a sus respectivas diluciones dobles seriadas en solución tampón de acetato de sodio (pH 5.0). Para el ensayo enzimático con el fin de optimizar y conocer el comportamiento de la enzima, previamente, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de sustrato 4-MUNANA, de enzima NA y diferente cantidad de solución tampón de acetato de sodio. Una vez establecidos estos valores, el ensayo enzimático se realizó con la solución tampón de acetato de sodio (pH 5,0), 10 µL de solución inhibidora (muestra) y 10 µL de enzima. Se incubó a 37 °C con agitación de 360 cpm (ciclos por minuto) durante 15 minutos. Posteriormente, se agregó 20 µL de sustrato y se monitoreo en las longitudes de onda de emisión y excitación de 450 y 365 nm, respectivamente, durante 30 minutos, tomando lectura cada 2 minutos, y conservando la temperatura de 37 °C (Sigma-Aldrich, 2021; Ullah *et al.*, 2019).

### 2.7.1. Análisis de datos

El porcentaje de actividad neuraminidasa se calculó con la fórmula (Cetina-Montejo *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2005):

$$\% \text{ Actividad neuraminidasa} = \frac{DOm}{DOc} \times 100$$

Donde:

*DOm* es el valor medio de la DO medida para NA con la muestra ensayada;

*DOc* es el valor medio de la DO medida para NA sin la muestra ensayada (enzima + sustrato).

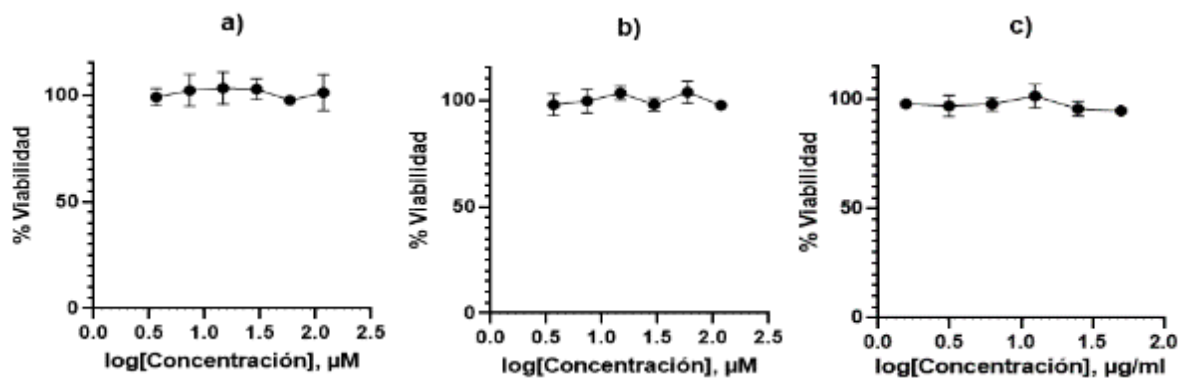
La concentración efectiva inhibitoria de la neuraminidasa del 50% (CN<sub>50</sub>) se determina graficando la curva dosis-respuesta de la concentración del compuesto (µM) obtenida contra el porcentaje de actividad de la neuraminidasa calculado al 50% en el programa de GraphPad prism 9.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Evaluación de citotoxicidad y de Reducción del Efecto Citopático

Una sustancia se considera citotóxica si interfiere con la unión de las células, altera significativamente la morfología, afecta negativamente la tasa de crecimiento celular o hace que las células mueran. Se ha prestado mucha atención a los estudios de citotoxicidad como un primer paso para evaluar la toxicidad de las sustancias de prueba. Los ensayos de citotoxicidad se realizan rutinariamente en la evaluación de extractos y/o derivados de plantas y compuestos, y que estos puedan continuar su estudio hacia su empleo como productos farmacéuticos o cosméticos, en cuyo caso es importante una toxicidad mínima o nula (McGaw *et al.*, 2014).

En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de tres muestras: taraxerol; taraxerona; y DCt7, muestra con posibles triterpenos. Las tres muestras se evaluaron a seis concentraciones en diluciones por triplicado. Las concentraciones evaluadas para taraxerol fueron: 117.32, 58.68, 29.34, 14.67, 7.33, y 3.66  $\mu\text{M}$ ; para taraxerona: 117.92, 58.96, 29.48, 14.74, 7.37, y 3.68  $\mu\text{M}$ ; y para DCt-7: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, y 1.56  $\mu\text{g/mL}$ . La concentración citotóxica media ( $\text{CI}_{50}$ ) se calculó graficando la media del % de viabilidad de cada placa (eje y) contra concentración (eje x) (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Efecto citotóxico de los compuestos triterpénicos aislados de *Diospyros anisandra*. a) taraxerol. b) taraxerona. c) muestra DCt-7. Los resultados se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas independientes.

En la **Figura 3.2** se observa en las tres gráficas un comportamiento con tendencia lineal, lo que nos indica que no hay un efecto dosis-respuesta, ya que a las seis concentraciones ensayadas ninguna presentó un daño en la viabilidad celular con un valor cercano al 100%. Por lo que la  $\text{CI}_{50}$  de las tres muestras es mayor a su concentración máxima ensayada, como se muestra en el **Cuadro 3.1**

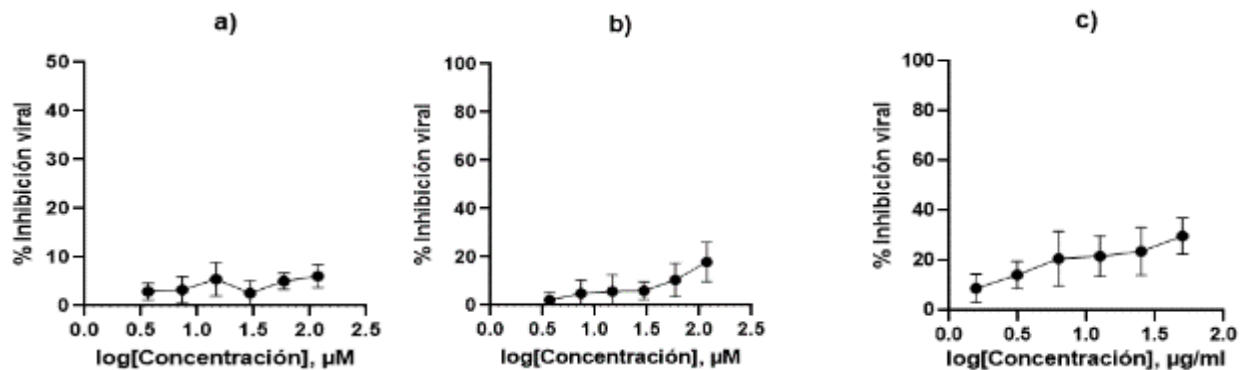
**Cuadro 3.1.** Efecto citotóxico y actividad antiviral de los compuestos triterpénicos aislados de *Diospyros anisandra*.

Muestra	Peso Molecular	CI <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>
Taraxerol	426 g/mol	>117.37 μM	>117.37 μM
Taraxerona	424 g/mol	>117.92 μM	>117.92 μM
DCt-7	NA	>50 μg/mL	>50 μg/mL

NA: no aplica.

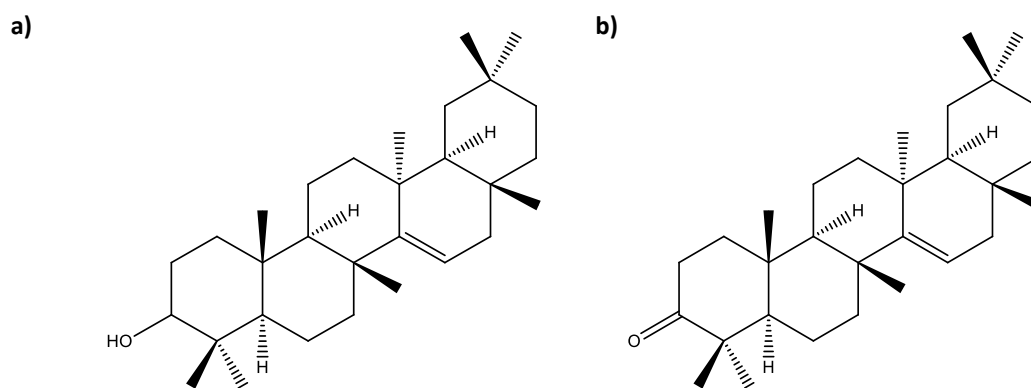
El resultado del triterpeno taraxerol concuerda con lo reportado en la literatura en otras líneas celulares, presentando inactividad citotóxica en células Vero (Wisetsai *et al.*, 2019); y en la línea celular de mioblastos esqueléticos de rata (células L-6) con CI<sub>50</sub> > 90 μM (Gachet *et al.*, 2011); también mostró ser no-tóxico en ensayo *in silico* (ProTox-II) con una dosis letal al 50% (DL<sub>50</sub>) de 8800 mg/kg (Mondal *et al.*, 2020). Asimismo, el triterpeno taraxerona ha sido deportado como un compuesto no-tóxico en células L-6 con CI<sub>50</sub> > 90 μM (Gachet *et al.*, 2011);

Para el ensayo REC contra el virus de influenza A H1N1pdm09 se evaluó las mismas tres muestras y a las mismas concentraciones que en el bioensayo de citotoxicidad, las cuales se evaluaron a seis concentraciones en diluciones dobles seriadas. La concentración inhibitoria media del virus (CE<sub>50</sub>) se calculó graficando la media del % de inhibición viral (eje y) contra concentración (eje x) (**Figura 3.3**). Los resultados indican que taraxerol, taraxerona y DCt-7 (**Figura 3.3**) no mostraron inhibición del efecto citopático del virus de influenza A H1N1pdm09 a las concentraciones evaluadas. En el caso de taraxerol (**Figura 3.3.a**) la concentración más alta de 117.37 μM inhibió solo el 6.09 ± 2.37%. Para taraxerona (**Figura 3.3.b**) la mayor concentración de 117.92 μM inhibió el 15.23 ± 8.16%. De igual manera, para DCt-7 (**Figura 3.3.c**), muestra con ácido betulínico como compuesto mayoritario, su mayor concentración de 50 μg/mL inhibió el 23.87 ± 7.31% (**Cuadro 3.1**).



**Figura 3.3.** Efecto antiviral contra el virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 en ensayo REC de los compuestos triterpénicos aislados de *Diospyros anisandra*. a) taraxerol. b) taraxerona. c) muestra DCT-7. Los resultados se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de cinco réplicas independientes.

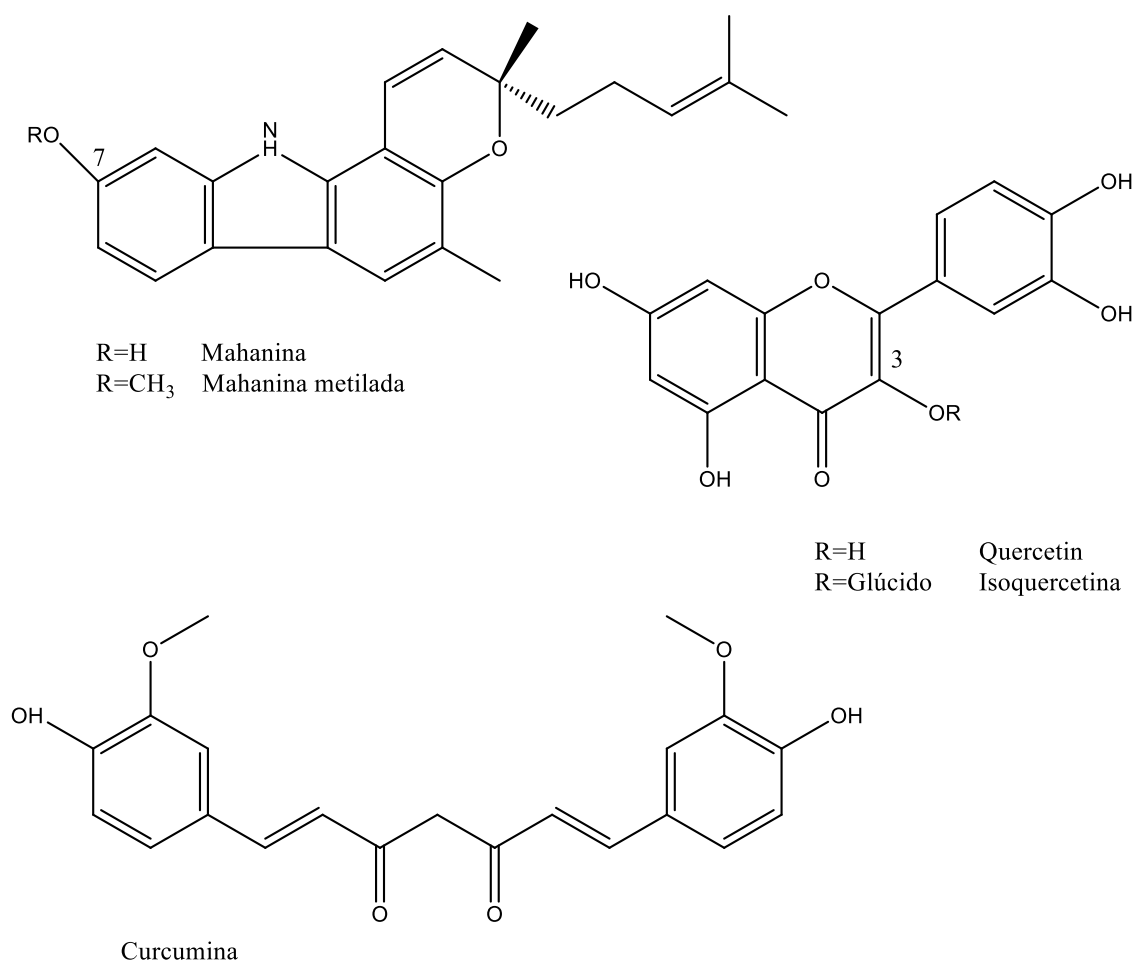
Los triterpenos taraxerol y taraxerona no fueron citotóxicos en células MDCK y con porcentajes de inhibición viral pequeños, ambos compuestos están formados por un esqueleto tipo taraxerano (**Figura 3.4**) con una insaturación en el C-14 unido al C-15 y ocho grupos metilos; en el C-3 el compuesto taraxerol (**Figura 3.4.a**) presenta un grupo hidroxilo, mientras taraxerona (**Figura 3.4.b**) presenta un grupo carbonilo. Lo que indica, que en estos compuestos el grupo hidroxilo y el grupo carbonilo no muestra una diferencia significativa en la inhibición del efecto citopático. Sin embargo, en algunos compuestos, pequeñas modificaciones estructurales pueden alterar el modo de acción de la molécula (Heller *et al.*, 2016). Por ejemplo, en un estudio se observa como la adición del grupo hidroxilo en C-7 de la mahanina redujo drásticamente la citotoxicidad hacia diferentes tipos de células cancerosas, sin embargo, su metilación de C-7-OH condujo a la restauración de su efecto (**Figura 3.5**) (Samanta *et al.*, 2013).



**Figura 3.4.** Estructura de a) taraxerol y b) taraxerona.

En otro estudio se observa el acoplamiento simulado de la curcumina con la estructura de la hemaglutinina, indicando que la presencia del doble enlace en la cadena central de siete

carbonos mejora la actividad antiviral contra el virus de influenza A e interfiere con la entrada del virus a la célula (**Figura 3.5**) (Lai *et al.*, 2020). También, se ha observado que al unir químicamente dos moléculas se modifica su actividad, como la unión en C-3 de quercetina con un glúcido, isoquercetina (quercetina-3-β-D-glucósido) (**Figura 3.5**), mostrando efectos antivirales mayores que la quercetina con valores de  $CI_{50}$  más bajos y un índice terapéutico *in vitro* más alto (Thapa *et al.*, 2012). Asimismo, la diferencia de la actividad es notable entre isómeros, como lo muestra la actividad antiviral de los 1-adamantiltetrazoles siendo mayor que la de sus isómeros 2-adamantilo (Zarubaev *et al.*, 2010).



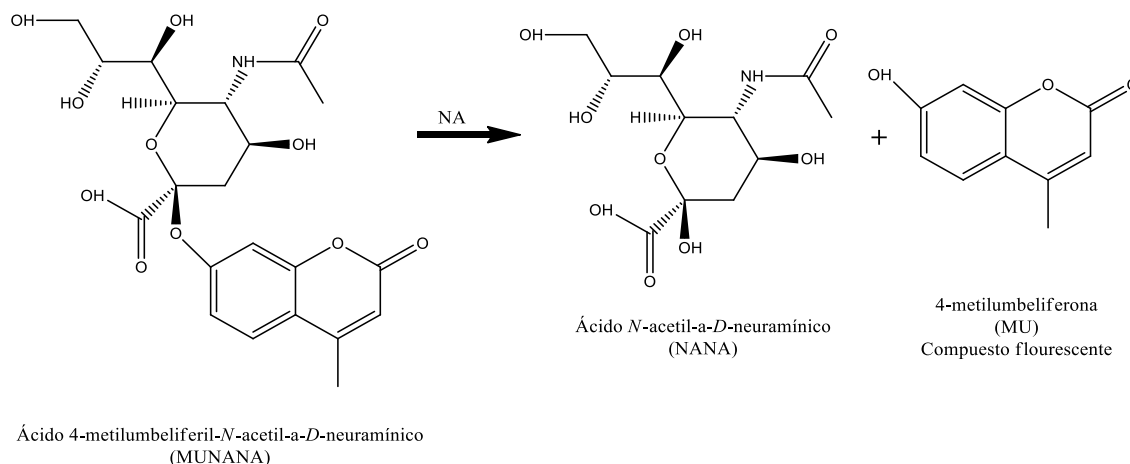
**Figura 3.5.** Estructura de Mahanina y su compuesto metilado en C7, Quercetina y su glucósido en C3, y Curcumina.

Por otro lado, el ensayo de REC suele ser el primer paso en el cribado de un gran número de compuestos para determinar su actividad antiviral, la inhibición del efecto citopático en presencia del compuesto de prueba podría deberse a la inhibición de la replicación del virus (Chattopadhyay

*et al.*, 2009). Es importante resaltar que el ensayo REC a nivel pos-tratamiento evalúa la inhibición del compuesto de prueba después de la infección de las células por el virus (Ryu *et al.*, 2010), es decir, mide principalmente la capacidad de la muestra para inhibir las últimas etapas de la replicación del virus (Cordeiro da Silva *et al.*, 2006). Por lo que, sería interesante ensayar las tres muestras en bioensayos REC que evalúen otras etapa del ciclo de replicación viral, como en co-tratamiento o pre-tratamiento, donde se evalúa si la muestra es capaz de bloquear la adsorción viral a las células (Ryu *et al.*, 2010; Cordeiro da Silva *et al.*, 2006).

### 3.2. Evaluación de inhibición de la actividad de Neuraminidasa (NA)

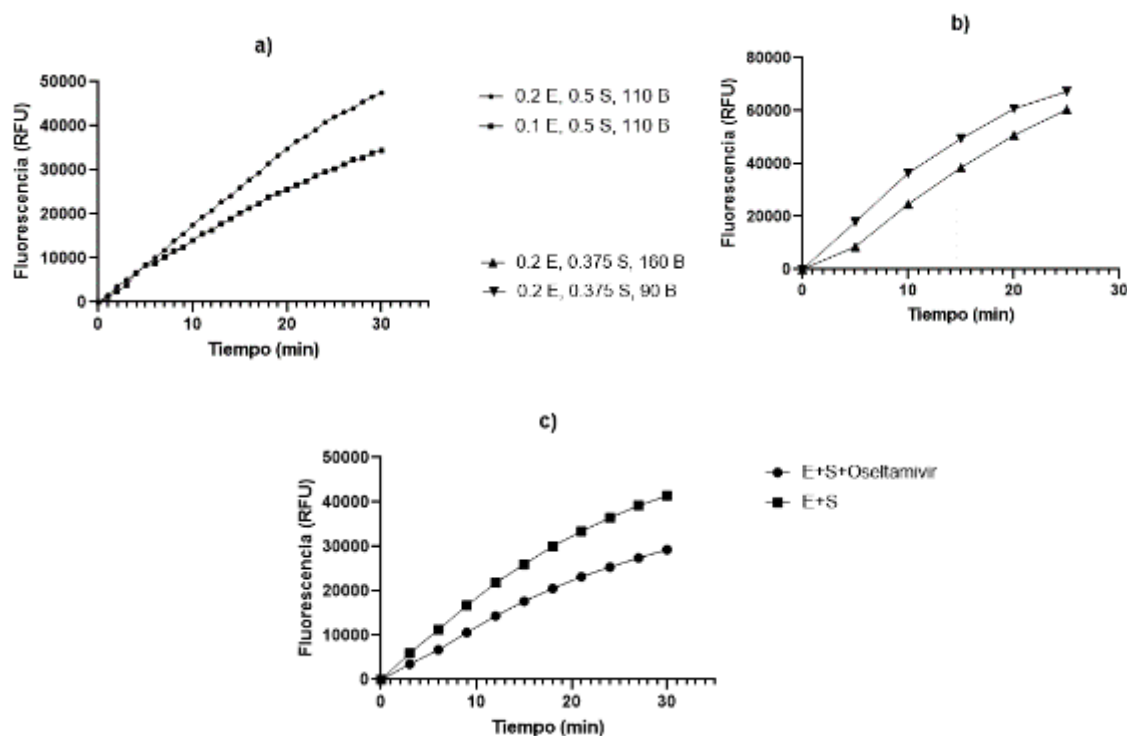
La enzima neuraminidasa de *C. perfringens* pertenece a la familia de la glicosil hidrolasa e hidroliza a los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 y  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  8 de los residuos terminales del ácido siálico (Yuk *et al.*, 2013). Además, los ensayos de inhibición de la enzima NA funcional de última generación se basan en medir la cantidad de fluorescencia o quimioluminiscencia. En el ensayo de fluorescencia utiliza el sustrato ácido 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- $\alpha$ -*D*-neuramínico (4-MUNANA), el cual es escindido por la enzima NA para liberar *N*-acetil- $\alpha$ -*D*-neuramínico (NANA) y el compuesto fluorescente 4-metilumbeliferona (Figura 3.6) (Grienke *et al.*, 2012).



**Figura 3.6.** El sustrato MUNANA escindido por NA para liberar NANA y el compuesto fluorescente MU (Grienke *et al.*, 2012).

Para establecer el método de inhibición de la enzima NA a aplicar, de acuerdo a la literatura reportada (**Cuadro 3.2**), se ensayó con las concentraciones de 0.2 y 0.1 U/mL de enzima NA; 1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.1875, 0.09375, 0.046875 mM de sustrato 4-MUNANA; y los volúmenes de 170, 160, 110, 90, 80 y 40  $\mu$ L de solución tampón de acetato de sodio. En la **Figura 3.7.a)** y **b)** se muestran las gráficas de los mejores resultados obtenidos de la cinética enzimática para cada valor de enzima, sustrato y buffer. Para corroborar que se presentara un efecto inhibitorio al añadir la muestra se ensayó con Carboxilato de Oseltamivir a 100 nM, en la **Figura 3.7.c)** se

muestra la fluorescencia inhibida del Carboxilato de Oseltamivir con 0.2 U/mL de enzima NA, 0.5 mM de sustrato 4-MUNANA y 110  $\mu$ L de solución tampón de acetato de sodio, mostrando 62.96 % actividad relativa de NA al llegar a los 30 minutos. Por lo que se seleccionaron estos últimos valores como parámetros en el ensayo.



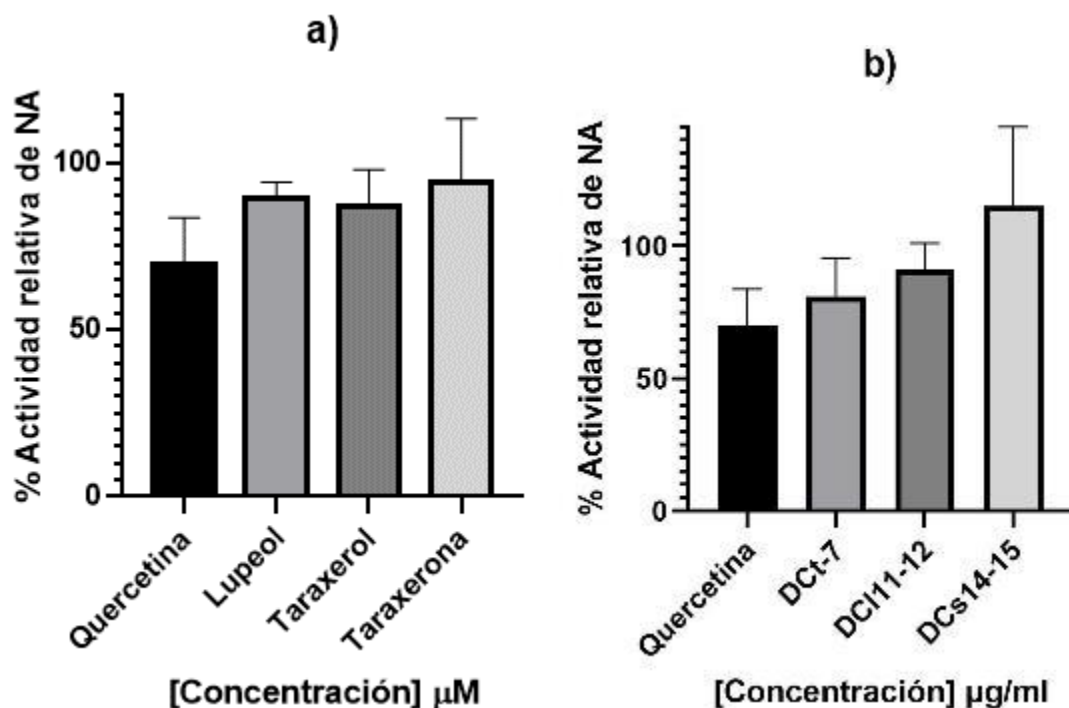
**Figura 3.7.** Cinética enzimática. a) Cinética con diferente concentración de enzima NA. b) Cinética con diferente cantidad de solución tampón de acetato de sodio. c) Efecto inhibitorio del Carboxilato de Oseltamivir al 100 nM en 0.2 E, 0.5 S, 110 B. Los resultados se representan como la media de tres réplicas. E: U/mL de enzima NA, S: mM de sustrato 4-MUNANA, B:  $\mu$ L de buffer o solución tampón de acetato de sodio.

**Cuadro 3.2.** Valores de concentración de enzima, sustrato y buffer de acuerdo a lo reportado por distintos autores en ensayos de inhibición enzimática empleando NA de *C. perfringens*.

CN <sub>50</sub> Quercetina ( $\mu$ M)	Enzima NA de <i>C. perfringens</i> (U/mL)	Sustrato 4-MUNANA (mM)	Buffer de acetato de sodio 50 mM ( $\mu$ L)	Referencias
21.4 $\pm$ 0.9	0.2 (10 $\mu$ L)	1.25 (20 $\mu$ L)	160	Ullah <i>et al.</i> , 2019
17.4 $\pm$ 0.9	0.01 (10 $\mu$ L)	1.25 (20 $\mu$ L)	160	Uddin <i>et al.</i> , 2016
3.46	0.1 (10 $\mu$ L)	0.08 (40 $\mu$ L)	540 (cubeta)	Kim <i>et al.</i> , 2011
15.4 $\pm$ 1.3	0.1 (-)	-	-	Yuk <i>et al.</i> , 2013
9.8 $\pm$ 0.2	0.02 (15 $\mu$ L)	0.125 (250 $\mu$ L)	1635 (cubeta)	Ryu <i>et al.</i> , 2010

CN<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria de neuraminidasa media.

Una vez establecidos los valores de 0.2 U/mL de concentración de enzima NA, 0.5 mM de concentración de sustrato 4-MUNANA y 110  $\mu$ L de cantidad de solución tampón de acetato de sodio, se ensayó con un mínimo de tres replicas las muestras obtenidas del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra*, mostrando un porcentaje de inhibición de la actividad de neuraminidasa de:  $10.72 \pm 5.00\%$  en lupeol (identificado en fracciones hexánicas de hoja y corteza) a  $117.37 \mu\text{M}$ ,  $13.11 \pm 11.18\%$  en taraxerol a  $117.37 \mu\text{M}$ ,  $9.17 \pm 26.66\%$  en taraxerona a  $117.97 \mu\text{M}$ ,  $19.02 \pm 14.64\%$  en DCt7 (fracción con compuesto mayoritario ácido betulínico) a  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $9.02 \pm 10.06\%$  en DCI11-12 (fracción semipura) a  $100 \mu\text{g/mL}$ , aumento de la fluorescencia en DCs14-15 (fracción con compuesto mayoritario 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol) a  $100 \mu\text{g/mL}$ , y  $30.25 \pm 13.87\%$  en quercetina a  $100 \mu\text{M}$  ( $30 \mu\text{g/mL}$ ) aplicado como referencia (**Figura 3.8**).

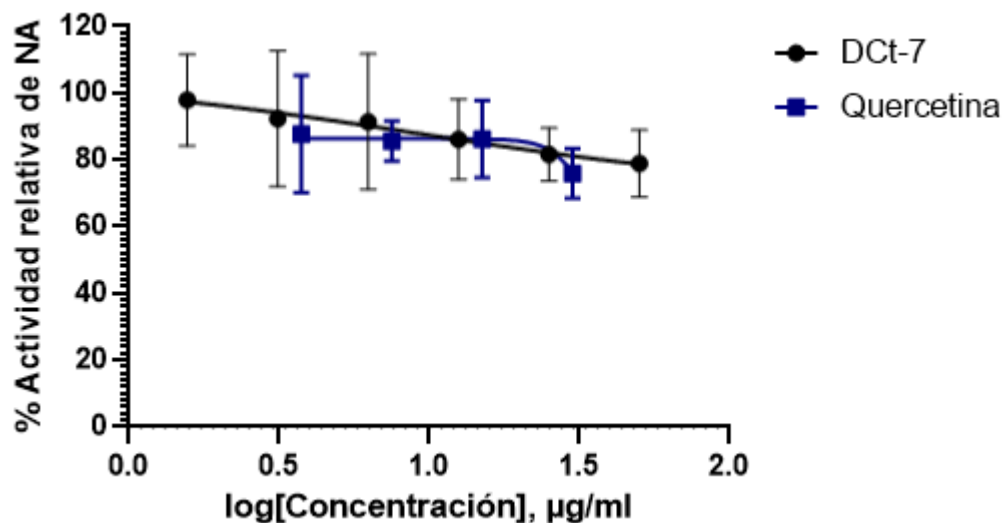


**Figura 3.8.** Actividad enzimática relativa de NA con las muestras obtenidas del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra* ensayadas a solo una concentración. a) Actividad relativa de NA con compuestos triterpénicos en  $\mu\text{M}$ . a) Actividad relativa de NA con fracciones en  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un mínimo de tres réplicas. Quercetina es aplicada como referencia.

Así mismo, la muestra DCt-7 y la referencia quercetina fueron evaluadas en concentraciones de diluciones dobles seriadas, iniciando con la concentración más alta de  $50 \mu\text{g/mL}$  para DCt-7 y  $30 \mu\text{g/mL}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) para quercetina (**Figura 3.9**). Los resultados señalan que ambas muestras

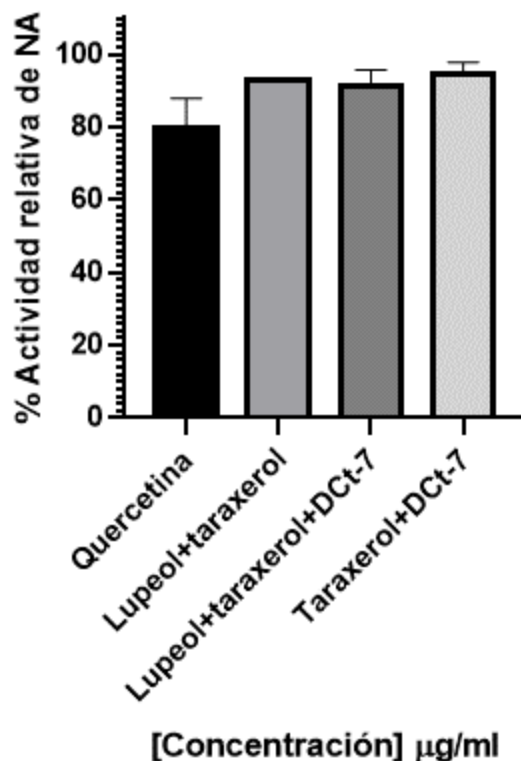


presentan un efecto dosis-respuesta; quercetina con un comportamiento no lineal, y DCt-7 con un comportamiento lineal descendente.



**Figura 3.9.** Comportamiento de la actividad enzimática relativa de NA con la muestra DCt-7 y quercetina a diferentes concentraciones.

Además, se ensayó con mezclas de lupeol, taraxerol y DCt-7 a 50 µg/mL cada muestra, donde se obtuvo un porcentaje de inhibición de la actividad de NA de  $6.93 \pm 0.46$  % en la mezcla 1:1 de Lupeol:taraxerol,  $8.54 \pm 4.30$ % en 1:1:1 de Lupeol:taraxerol:DCt-7, y  $5.54 \pm 3.35$ % en 1:1 de taraxerol:DCt-7 (**Figura 3.10**). Dentro del mismo ensayo, se comparó con quercetina a 60 µg/mL (200 µM), obteniendo  $20.45 \pm 8.32$ % de inhibición de la actividad de NA; siendo un porcentaje menor que a la concentración de 30 µg/mL, esto podría deberse que al aumentar la concentración la solubilidad de este compuesto disminuye.



**Figura 3.10.** Actividad enzimática relativa de NA de quercetina a 60 µg/mL, mezclas 1:1 de lupeol:taraxerol, 1:1:1 de lupeol:taraxerol:DcT-7 y 1:1 de taraxerol:DcT-7 a 50 µg/mL cada muestra. Los resultados se representan como la media ± desviación estándar de un mínimo de tres réplicas.

De manera general, la muestra DcT-7 mostró mejor actividad inhibitoria de NA, seguida de taraxerol y lupeol, las tres muestras evaluadas a una concentración de 50 µg/mL (117.37 µM para lupeol y taraxerol). Asimismo, al realizar las mezclas de estos compuestos no se observó un aumento significativo de la actividad inhibitoria de NA. Sin embargo, el compuesto de referencia quercetina con  $\geq 95$  de pureza mostró actividad inhibitoria inferior comparada con la literatura (**Cuadro 3.2**), esto podría deberse a la diferencia en las concentraciones utilizadas o a la pureza de la quercetina, ya que no es especificada en las referencias mencionadas en el **Cuadro 3.2**.

Otras referencias muestran para quercetina un valor de dosis efectiva requerida para reducir la replicación del virus en un 50% ( $DE_{50}$ ) de 48.2 µM para el virus de influenza A/porcino/OH/511445/2007 H1N1 (Thapa *et al.*, 2012), y  $CE_{50}$  de  $7.76 \pm 1.10$  µg/mL en influenza A/Puerto Rico/8/34 H1N1,  $6.23 \pm 0.47$  µg/mL en influenza A/FM-1/47/1 H1N1, y  $2.74 \pm 1.92$  µg/mL en influenza A/Aichi/2/68 H3N2 (Wu *et al.*, 2016). Asimismo, en un ensayo fluorométrico basado en MUNANA en ausencia o presencia de oseltamivir detectando la actividad de las neuraminidasas virales, Quercetina mostró  $CE_{50}$  de  $109.0 \pm 12.9$  µM en influenza

A/California/7/09 H1N1pdm09,  $121.2 \pm 53.0 \mu\text{M}$  en influenza A/Perth/16/09 H3N2, y  $112.4 \pm 68.2 \mu\text{M}$  contra influenza B/Brisbane/60/08 (Rakers *et al.*, 2014).

Todas las variaciones de la actividad de quercetina dependen del ensayo que se lleve a cabo, las concentraciones de los reactivos y la pureza del compuesto, por lo que es de esperar que no se tenga un valor fijo de actividad inhibitoria de NA. Además, es recomendable realizar un mayor número de repeticiones para obtener un valor más certero.

El método de inhibición de la actividad de NA empleando una NA obtenida de *C. perfringens* ofrece la ventaja de una reducción significativa en la cantidad de sustrato, enzima e inhibidores a probar; asimismo permite un cribado altamente automatizado de moléculas bioactivas en plantas y mezclas medicinales (Hl'asová *et al.*, 2018). Sin embargo, se debe considerar la fluorescencia de las muestras a evaluar, ya que la presencia de compuestos fluorescentes o antioxidantes podría interferir si se utilizan ensayos enzimáticos fluorescentes (Juárez-Méndez *et al.*, 2021). Ejemplo de estas moléculas son algunos flavonoides, apagan significativamente la señal de fluorescencia de la metilumbeliferona y pueden producir resultados falsos positivos; del mismo modo, rimfamicina apaga la fluorescencia de la metilumbeliferona; y de manera inversa, katsumadain A (diarilheptanoide potente) y remazol son inhibidores de NA que exhiben autofluorescencia. Para lo cual, se requiere una evaluación paralela de sus propiedades espectrales. Además, este método no es adecuado para distinguir la especificidad de NA del enlace SA (Hl'asová *et al.*, 2018).

#### 4. CONCLUSIONES

De acuerdo al bioensayo de citotoxicidad realizado a las muestras taraxerol, taraxerona y DCt-7 (compuesto mayoritario ácido betulínico) aisladas de la corteza de *Diospyros anisandra*, mostraron no causar daño celular contra células MDCK con  $\text{CI}_{50} > 117.17 \mu\text{M}$ ,  $> 117.92 \mu\text{M}$  y  $> 50 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Lo cual, nos señala que las tres muestras son viables para continuar con otros ensayos biológicos.

Por otra parte, taraxerol y taraxerona en ensayo de REC con infección del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 previa a la adición de la muestra mostraron actividad inhibitoria viral baja. Taraxerol a su mayor concentración de  $117.37 \mu\text{M}$  inhibió solo el  $6.09 \pm 2.37\%$  y taraxerona a  $117.92 \mu\text{M}$  inhibió el  $15.23 \pm 8.16\%$ . Además, la muestra DCt-7 mostró actividad inhibitoria media de  $23.87 \pm 7.31\%$  a su concentración de  $50 \mu\text{g/mL}$ . Al compararlo con el ensayo

de inhibición de neuraminidasa obtenida de *C. perfringens* mostró resultados parecidos para estas tres moléculas a las mismas concentraciones, para taraxerol  $13.11 \pm 11.18\%$  inhibición de la actividad de NA, taraxerona  $9.17 \pm 26.66\%$ , y DCt-7  $19.02 \pm 14.64\%$ . Esto nos indica que las muestras pudieran no estar inhibiendo a la salida del virus, sin embargo, no se descarta la posibilidad de inhibir en otras etapas de replicación viral y/o contra otros virus.

En cambio, la muestra lupeol evaluada anteriormente por Cetina-Montejo (datos no reportados) en etapa pos tratamiento en REC contra el virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 a una dosis infecciosa de 0.001 mostró ser activo con  $CE_{50}$   $15.1 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo, a una dosis mayor pierde completamente su actividad, además, al ser evaluada contra NA de *C. perfringens* mostró actividad media,  $10.72 \pm 5.00\%$  a  $117.37 \mu\text{M}$ , lo que podría indicar que no inhibe la etapa de salida del virión, y es necesario realizar más pruebas para conocer el modo de acción de este compuesto.

Así pues, al evaluar las mezclas Lupeol, DCi-7c y DCt-7 contra NA de *C. perfringens* no se observó un aumento inhibitorio de la actividad de NA.

Asimismo, las muestras DCI11-12 y DCs14-15 no mostraron actividad inhibitoria contra NA de *C. perfringens*, y además la muestra DCs14-15 por razones desconocidas aumentan la fluorescencia del sustrato. Cabe destacar que este resultado no descarta la posibilidad que ambas muestras pudieran tener actividad en otro tipo de pruebas antivirales.

Cabe señalar que para la realización del ensayo de inhibición de la actividad de NA obtenida de *C. perfringens* se recomienda un mayor número de réplicas para que los resultados sean más certeros y reproducibles; así también, se recomienda el uso una pipeta multicanal con la finalidad de disminuir variaciones de tiempo en la aplicación del sustrato. Además, se recomienda conocer la estructura de las moléculas a evaluar, ya sea de manera individual o en conjunto dentro de una muestra, así como conocer la fluorescencia de la misma.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 1. DISCUSIÓN GENERAL

Debido a la necesidad de nuevos medicamentos contra el virus de influenza, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la actividad antiviral contra el virus de influenza A H1N1pdm09 (A/Yucatán/2370/09) de terpenoides aislados de corteza de *Diospyros anisandra*.

En este presente trabajo, el análisis fitoquímico de la corteza de *D. anisandra* dio como resultado el aislamiento de taraxerol en DCi-7c y taraxerona en DCu-5; así como la fracción DCs14-15 con 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol y DCt-7 con ácido betulínico como compuestos mayoritarios. Estos terpenos fueron caracterizados por métodos de elucidación estructural CG-EM, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, FT-IR y COSY, y se compararon con lo reportado en la literatura.

También, se analizaron por CG-EM los extractos hexánicos del extracto metanólico de hoja y raíz de *D. anisandra*, y con base al peso molecular y su patrón de fragmentación se identificó en hoja betulina y lupeol; y en raíz taraxerol, lupeol y  $\beta$ -sitosterol. Además, en fracciones obtenidas del extracto hexánico de corteza se identificó 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno en el extracto DC; estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol y lupeol en DC5;  $\gamma$ -sitosterol en DC7; taraxerol en DC6-3; estigmastan-3,5-dieno, estigmasterol y  $\gamma$ -sitosterol en DCf-2; teucdiol A en DCd-1; y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol en DCe-2.

Al evaluar la citotoxicidad de las muestras taraxerol, taraxerona y DCt-7 mostraron no causar daño celular en células MDCK. Sin embargo, taraxerol y taraxerona en ensayo de REC con infección del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 previa a la adición de la muestra no mostraron actividad inhibitoria viral significativa. Por otra parte, la muestra DCt-7 mostró actividad inhibitoria media de  $23.87 \pm 7.31\%$  a su concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Al comparar estos últimos resultados con el ensayo de inhibición de NA obtenida de *C. perfringens* se observan resultados similares para taraxerol, taraxerona y DCt-7. Esto nos indica que taraxerol y taraxerona pudieran no estar inhibiendo a la salida del virus, sin embargo, no se descarta la posibilidad de inhibir en otras etapas de replicación viral y/o contra otros virus.

Cabe mencionar, que en el ensayo REC y de inhibición de NA la muestra DCt-7 mostró mejor actividad que el resto de las muestras ensayas. Así pues, al evaluar las mezclas Lupeol, DCi-7c y DCt-7 contra NA de *C. perfringens* no se observó un aumento inhibitorio de la actividad de NA.

## 2. CONCLUSIONES GENERALES

Se logró aislar dos triterpenos de la corteza de *Diospyros anisandra*, ambos compuestos conocidos ya han sido identificados dentro del género pero no en la especie: taraxerol y taraxerona. Además, se obtuvo como compuestos mayoritarios dentro de la muestra los terpenoides 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol y ácido betulínico, previamente reportados en la corteza de *D. anisandra*.

Cabe mencionar, de acuerdo al análisis espectroscópico, la muestra DCt-7 contiene una mezcla de dos terpenos, uno de ellos es el ácido betulínico. Sin embargo, como la muestra no volatilizó no pudo ser analizada por CG-EM, por lo que se requiere otra técnica cromatográfica para determinar el peso molecular y su análisis espectrométrico. Con esta información, determinar y confirmar ambas moléculas, y así determinar si existe un efecto sinérgico entre ambas.

Asimismo, con base al peso molecular y patrón de fragmentación se identificó en corteza lupeol, 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol, taraxerol, estigmastan-3,5-dieno y teucdiol A; en hoja betulina y lupeol; y en raíz taraxerol, lupeol y  $\beta$ -sitosterol. De los cuales, los terpenoides taraxerol, taraxerona, estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol, estigmastan-3,5-dieno y  $\beta$ -sitosterol no han sido reportados anteriormente dentro de la especie *D. anisandra*.

Por otro lado, los triterpenos taraxerol y taraxerona, así como la fracción DCt-7, debido a que mostraron no causar daño celular en células MDCK los hace viables para continuar con otros ensayos biológicos.

Concluyendo así, que no se cumplió la hipótesis, ya que los compuestos y fracciones terpénicas evaluadas específicamente por estos métodos (REC e inhibición de la actividad de NA) y contra la cepa del virus de influenza A H1N1pmd09 (A/Yucatán/2370/09) no presentaron actividad antiviral significativa. Sin embargo, no se puede predecir que estos compuestos no pudiesen presentar actividad antiviral contra otras cepas virales o por métodos con distintos modos de acción.

### 3. PERSPECTIVAS

Se recomienda continuar con el estudio fitoquímico de la especie, en corteza, hoja, raíz y flor, ya que aún quedan muchos compuestos de tipo terpenico sin identificar, y si es posible, evaluar estos metabolitos.

Se recomienda llevar a la purificación de 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-ol y ácido betulínico, y ser evaluada su actividad antiviral. También, es recomendable aislar 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, estigmasterol,  $\gamma$ -sitosterol, estigmastan-3,5-dieno, y teucdiol A, para su evaluación antiviral.

Taraxerol, taraxerona y DCt-7 se recomienda ser evaluados contra otras actividades biológicas, al igual que, realizar ensayos REC en diferente modo de acción y/o contra diferentes virus.

Asimismo, tanto a taraxerol como taraxerona, los cuales no presentaron actividad antiviral en este ensayo, se les puede realizar modificaciones estructurales y evaluar si tal cambio beneficia la actividad antiviral. Se puede comenzar con la adición de dobles enlaces, ya que se ha observado en el análisis por acoplamiento simulado de la curcumina, que la presencia del doble enlace mejora la actividad antiviral contra el virus de influenza A e interfiere con la entrada del virus a la célula.

Cabe señalar, el ensayo de inhibición de la actividad de NA de *C. perfringens* se encuentra en reciente implementación, por lo que se encuentra en ajustes y mejoramiento continuo. Así mismo, para este ensayo se recomienda conocer la estructura de las moléculas a evaluar, así como conocer la fluorescencia de la misma. Además, es recomendable realizar un número considerable de repeticiones para obtener valores más certeros.





**BIBLIOGRAFÍA**

- Adinarayana, D. y Syamasundar, K. V. (1982). A new sesquiterpene alcohol from *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry*, 21(5), 1083-1085.
- Akram, M., Mahmood-Tahiy, I., Ali-Shah, S., Mahmood, Z., Altaf, A., Ahmad, K., ... Mehboob, H. (2018). Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. *Phytotherapy Research*, 32, 811-822.
- Al-Salihi, S. A., y Alberti, F. (2021). Naturally Occurring Terpenes: A Promising Class of Organic Molecules to Address Influenza Pandemics. *Natural Products and Bioprospecting*, 1-15.
- Al-Snafi, A. E. (2017). Pharmacology and therapeutic potential of *Euphorbia hirta* (Syn: *Euphorbia pilulifera*)- A review. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 7(3), 7-20.
- Anaya-Lang, A. (2003). Metabolismo secundario, Terpenoides, en: *Ecología química*. Plaza y Valdés, S.A. de C.V. (ed). 48-53.
- Anglea, T. A. y Pinder, R. (1987). Total Synthesis of (+)-Balanitol and (+)-Selin-4-(15)-ene-1 $\beta$ ,11-diol. *Tetrahedron*, 43(23), 5537-5543.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M. y Sticher, O. (Febrero de 2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 43-52.
- Arbiza, J. R. (2006). , *Biología viral*, en: *Temas de Bacteriología y Virología Médica 2<sup>da</sup> edición*, Ofina del Libro FEFMUR (Ed.). Universidad de la República, Facultad de Medicina, pp 11-21.
- Arias, C. F., y López, S. (Julio - Septiembre de 2009). Anatomía del virus de la influenza A/H1N1-2009. *Comunicaciones libres – Ciencia*, 14-24.
- Arjona-Canul, A. L. (Octubre de 2011). Sesquiterpenoides aislados de *Diospyros anisandra* y su evaluación citotóxica en líneas celulares de cáncer. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 13-24.
- Ávalos-García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2, 119-145.
- Azhaguraj, R., Milton, J., Ganesh, J., Zenith-Kumar, G., Ramakrishnan, M., y Antony, S. (2012). Prediction of biological activity spectra for secondary metabolites from marine macroalgae *Caulerpa* spp (*Chlorophyta – Caulerpals*). *International Research Journal of Pharmacy*, 3(5), 320-323.

- Baltina, L., Flekhter, O., Nigmatullina, L., Boreko, E., Pavlova, N., Nikolaeva, S., ...Tolstikov, G. (2003). Lupane Triterpenes and Derivatives with Antiviral Activity. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 13, 3549-3552.
- Barricarte, A. (2006). Gripe aviar. ¿La pandemia que viene?. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 29(1), 7-11.
- Bonkanka-Tabares, C. X. (2007). Evolución farmacológica de terpenos y flavoides de origen vegetal. Tesis de Doctorado. Universidad de la Laguna. España. pp. 21-28.
- Borges-Argáez, R., Canche-Chay, C., Peña-Rodríguez, L., Said-Fernández, S., y Molina-Salinas, G. (Julio de 2007). Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*, 78, 370-372.
- Borges-Argáez, R., Vera-Ku, B. M., Juárez-Méndez, M. T., Chan-Zapata, I., Jiménez-Alcalá, G. L., Chi-May, F. y Carrillo Sánchez, L. E. (2021). El K'aakalché (*Diospyros anisandra*), una especie con alto valor farmacéutico. *Desde el Herbario CICY*, 13, 152-155.
- Branco, A., Pinto, A., y Braz-Filho, R. (2004). Chemical constituents from *Vellozia graminifolia* (*Velloziaceae*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(3), 505-518.
- California Academy of Sciences, National Geographic Society. *Naturalista, Diospyros anisandra*. [Online]  
Disponble en: <https://www.naturalista.mx/taxa/277824-Diospyros-anisandra>  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- Carrada-Bravo, T. (Abril-Junio de 2010). Influenza: Avances recientes en virología molecular y prevención de la enfermedad. *Revista Mexicana Patología Clínica*, 57(2), 59-93.
- Carter, J. B., y Venetia. A. (2013). Influenza Virus, en: *Virology Principles and Applications 2nd Edition*. J. Wiley, & S. Ltd (ed). 183-194.
- CDC, 2021. Influenza (gripe), Cómo pueden cambiar los virus de la gripe. [Online] (Actualizado 21 de Septiembre de 2021).  
Disponble en: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- CDC, 2021. Influenza (gripe), Datos clave sobre la vacuna contra la influenza. [Online] (Actualizado 19 de Octubre de 2021).  
Disponble en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/prevent/keyfacts.htm>  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- CDC, 2021. Influenza (gripe), Para médicos: Medicamentos antivirales contra la influenza. [Online] (Actualizado 22 de Septiembre de 2021).

Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>

[Acceso 5 Noviembre 2021].

CDC, 2021. Influenza (gripe), Tipos de virus de influenza. [Online] (Actualizado 2 de noviembre de 2021).

Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>

[Acceso 5 Noviembre 2021].

Cetina-Montejo, L., Ayora-Talavera, G., y Borges-Argáez, R. (Junio de 2019). Zeylanone epoxide isolated from *Diospyros anisandra* stem bark inhibits influenza virus in vitro. *Archives of Virology*, 164, 1543-1552.

Chang-Keun, S., Seung-Mi, K., Chang-Jin, O., Sun-A., Y., Byung-Hee, H., y Eun-Kyoung, M. (2012). Taraxerone enhances alcohol oxidation via increases of alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activities and gene expressions. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2508-2514.

Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Sharma-Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S. y Hassan-Khan, M. T. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New Biotechnology*, 0(0), 1-22.

Chen, Y., Tao, S., Zeng, F., Xie, L., y Shen, Z. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Schefflera octophylla* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-8.

Coll, J., y Bowden, B. (Septiembre-Octubre de 1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49(5), 934-936.

Cordeiro da Silva, A., Muller-Kratz, J., Farias, F. M., Henriques, A. T., Santos, J., Leonel, R. M., Lerner, C., Mothes, B., Monte-Barardi, C. R. y Oliveira-Simões, C. M. (2006). In Vitro Antiviral Activity of Marine Sponges Collected Off Brazilian Coast. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(1), 135-140.

Córdova, J. V., Valdespino, J. G., y Ponce de León, S. R. (2010). La Epidemia de Influenza A/H1N1 en México. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. (ed). México, D.F.. pp. 388.

Davidson, S. (2018). Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-14.

- De Oliveira-Rocha, E. (2018). Estudio fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little. Tesis de Doctorado. Universidade Federal de Uberlândia. Brasil. pp. 21-28.
- Di, L., y Kerns, E. (2016). Benefits of Property Assessment and Good Drug-Like Properties, en: *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*, 2<sup>nd</sup> Edition. ELSEVIER. 5-13.
- Dilnesa, T. y Zeleke, H. (2017). Cell Culture, Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*, 2(1), 1-8.
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., y Daniels, R. (Julio de 2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in immunology* 9(1581), 1-17.
- El-Askary, H., Meselhy, M., y Galal, A. (2003). Sesquiterpenes from *Cymbopogon proximus*. *Molecules*, 8, 670-677.
- Flota-Burgos, G., Rosado-Aguilar, J., Rodríguez-Vivas, R., Borges-Argáez, R., Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., y Damboa-Angulo, M. (Septiembre de 2020). Anthelmintic activity of extracts and active compounds from *Diospyros anisandra* on *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* and Cyathosyomins. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1-11.
- Gachet, M., Kunert, O., Kaiser, M., Brun, R., Zehl, M., Keller, W., Muñoz, R., Bauer, R. y Schuehly, W. (2011). Antiparasitic Compounds from *Cupania cinerea* with Activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Journal of Natural Products*, 74, 559-566.
- Garozzo, A., Timpanaro, R., Bisignano, B., Furneri, P., Bisignano, G., y Castro, A. (2009). In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 806-808.
- Garozzo, A., Timpanaro, R., Stivala, A., Bisignano, G., y Castro, A. (2011). Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Research*, 89, 83-88.
- Gershenson, J., y Dudareva, N. (Julio de 2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408-414.
- Glatthaar-Saalmüller, B., Sacher, F., y Esperester, A. (2001). Antiviral activity of an extract derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Antiviral Research*, 50, 223-228.
- Grienke, U., Schmidtke, M., Grafenstein, S., Kirchmair, J., Liedl, K. R. y Rollinger, J. M. (2012). Influenza neuraminidase: A druggable target for natural products. *Natural Product Reports*, 29(1), 11-29.

- Grishko, V. V., Galaiko, N. V., Tolmacheva, I. A., Kucherov, I. I., Eremin, V. F., Boreko, E. I., Savinova, O. V. y Slepukhin, P. A. (2014). Functionalization, cyclization and antiviral activity of A-secotriterpenoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1-57.
- Grohskopf, L., Alyanak, E., Broder, K., Walter, E., Fry, A., y Jernigan, D. en CDC, 2019. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2019–20 Influenza Season. [Online]. (Actualizado 23 de Agosto de 2019).  
Disponible en:  
[https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6803a1.htm?s\\_cid=rr6803a1\\_w#collapse\\_479835d5ec745e139c](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6803a1.htm?s_cid=rr6803a1_w#collapse_479835d5ec745e139c)  
[Acceso 5 Diciembre 2021].
- Gutiérrez, E., Iván Felipe, G., José Alejandro, M., Cristina, M., y Pío, L. (2020). Influenza: datos de interés. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(1), 19-27.
- Hayden, F. (1997). Antivirals for Pandemic Influenza. *The Journal of Infectious Diseases* 176(1), 56-61.
- Heller, L., Perl, V., Wiemann, J., Al-Harrasi, A. y Csuk, R. (2016). Amino(oxo)acetate moiety: A new functional group to improve the Cytotoxicity of betulin derived acbamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1-3.
- Herbario CICY, 2010. Flora Digital: Península de Yucatán. [Online] (Actualizado 2010).  
Disponible en:  
[https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha\\_virtual.php?especie=1277](https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1277)  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- Hernández-Chávez, L. I. (2011). Estudio de la corteza de *Cupania dentata* D.C. para la obtención de metabolitos bioactivos contra *Giardia lamblia*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 51-73.
- Hi'asová, Z., Kosík, I., Ondrejovic, M., Miertus, S. y Katrlík, J. (2018). Methods and Current Trends in Determination of Neuraminidase Activity and Evaluation of Neuraminidase Inhibitors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1-19.
- HMDB, 2021. The Human Metabolome Database. [Online] (Actualizado 2021).  
Disponible en: <https://hmdb.ca/>  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- ICTV, 2020. Taxonomy. ICTV Newsletter #16. [Online] (Actualizado Marzo de 2020).  
Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

[Acceso 5 Noviembre 2021].

ITIS, 2020. Catalogue of Life. Indexing the world's known species. [Online] (Actualizado 18 de Octubre de 2020).

Disponible

en:

<https://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/eacfc13f8f9b1d0ebaace9e5f3799263>

[Acceso 5 Noviembre 2021].

Ji, T., Ji, W., Wang, J., Chen, H., Peng, X., Cheng, K., Qiu, D. y Yang, W. (2021). A comprehensive review on traditional uses, chemical compositions, pharmacology properties and toxicology of *Tetragium hemsleyanum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 1-19.

Ju, H., Zhang, J., Huang, B., Kang, D., Huang, B., Liu, X., y Zhan, P. (2017). Inhibitors of Influenza Virus Polymerase Acidic (PA) Endonuclease: Contemporary Developments and Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 3533-3551.

Juárez-Méndez, M. T., Borges-Argáez, R., Ayora-Talavera, G., Escalante-Rebolledo, S. E., Escalante-Erosa, F. y Cáceres-Farfán, M. (2021). *Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-hemagglutinin-neuraminidase activity on influenza AH1N1pdm09 virus. *Natural Products Research*, 1-7.

Kato, F., Matsuyama, S., Kawase, M., Hishiki, T., Katoh, H. y Takeda, M. (2020). Antiviral activities of mycophenolic acid and IMD-0354 against SARS-CoV-2. *Microbiology and Immunology* 64, 635-639.

Kemboi, D., Peter, X., Langat, M., y Tembu, J. (2020). A Review of the Ethnomedicinal Uses, Biological Activities, and Triterpenoids of *Euphorbia* Species. *Molecules*, 25, 1-29.

Khomenko, T., Zarubaev, V., Orshanskaya, I., Kadyrova, R., Sannikova, V., Korchagina, D., . . . Salakhutdinov, N. (2017). Anti-influenza activity of monoterpene-containing substituted coumarins. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 27, 2920-2925.

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. y Park, K. H. (2011). Flavanones and rotenoids from the roots of *Amorpha fruticosa* L. that inhibit bacterial neuraminidase. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1849-1856.

Krammer, F., Smith, G. J., Fouchier, R., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G. y García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature reviews, Disease Primers*, 4(3), 1-21.

Lei, W., Rui-Ming, Z., Gui-Ying, L., Bao-Lin, W., Yang, W., Hong-Yan, C., . . . Gang, W. (2010). Chinese herbs in treatment of influenza: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*, 104, 1362-1369.

- Liao, Y., Chen, L., Li, S., Cui, Z.-n., Lei, Z., Li, H., Lui, S. y Song, G. (2019). Structure-aided optimization of 3-O- $\beta$ -chacotriosyl ursolic acid as novel H5N1 entry inhibitors with high selective index. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27, 4048-4058.
- López-Carreras, N., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria*, 32(3), 81-91.
- Luchsinger, Vivian (2009). Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio. *Neumología Pediátrica*, 4(1), 3-5.
- Lycett, S. J., Duchatel, F. y Digard, P. (2019). A brief history of bird flu. *Philosophical Transactions B*, 374, 1-15.
- Mahboubi, M. (2020). *Sambucus nigra* (black elder) as alternative treatment for cold and flu . *Advances in Traditional Medicine* , 1-10.
- Mair, C., Grienke, U., Wilhelm, A., Urban, E., Zehl, M., Schmidtke, M., y Rollinger, J. (2018). Anti-influenza Triterpene Saponins from the Bark of *Burkea africana*. *Journal of Natural Products*, 81, 515-523.
- Mallavadhani, U., y Mahapatra, A. (2005). A new aurone and two rare metabolites from the leaves of *Diospyros melanoxyton*. *Natural Product Research*, 19(1), 91-97.
- Mancipe-J., L., Ramírez-N., G., Jaime-C., J., y Vera-A., V. (Junio de 2011). Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza. *Nova*, 9, 83-93.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Terpenos, en: *Fitoquímica Orgánica*, D. Marcano, y M. Hasegawa, Caracas: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (ed). Caracas, Venezuela. pp. 237-378.
- Marukami, T., Kishi, A., y Yoshikawa, M. (2001). Medicinal Flowers. IV. Marigold. (2): Structures of New Ionone and Sesquiterpene Glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49(8), 974-978.
- McGaw, L., Elgorashi, E., & Eloff, J. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 181-233.
- Mifsud, E., Hayden, F., y Hurt, A. (2019). Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral Research*, 169, 2-9.
- Mo, E., Han, B., Kim, S., Yang, S., Kang, S., Oh, C., Kim, R., Kim, C., Kang, J. y Sung, C. (2012). Identification of D-Friedoolean-13-en-3-one (Taraxerone) as an Antioxidant Compound from *Sedum sarmentosum*. *Food Sci. Biotechnol.*, 21(2), 485-489.

- Moghaddam, M. G., Ahmad, F. B. y Samzadeh-Kermani, A. (2012). Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. *Pharmacology & Pharmacy*, 3, 119-123.
- Mondal, P., Natesh, J., Abdul-Salam, A., Thiyagarajan, S., y Musthapa-Meeran, S. (2020). Traditional medicinal plants against replication, maturation and transmission targets of SARS-CoV-2: computational investigation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-18.
- Niedermeyer, T., Lindequist, U., Mentel, R., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., y Lalk, M. (2005). Antiviral Terpenoid Constituents of *Genoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1728-1731.
- Ochoa-Ganoa, S., Ruíz-González, H., Alvarez-Montejo, D., Chan-Coba, G., y De Jong, B. (2018). *Diospyros anisandra* S. F. Blake, en: Árboles de Calakmul, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: Colegio de la Frontera Sur (ed). Chiapas, México. pp. 87.
- OMS, 1999. Plan de preparación para la pandemia de influenza. El Rol de la Organización de la Salud y Guías para la Planificación Nacional y Regional. [Online] (Actualizado Abril de 1999).  
Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68025/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EDC\\_99.1\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68025/WHO_CDS_CSR_EDC_99.1_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- OMS, 2018. Gripe (estacional). [Online] (Actualizado 6 de Noviembre de 2018).  
Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))  
[Acceso 5 Noviembre 2021].
- OMS, 2021. Influenza update - 354. [Online] (29 de Marzo de 2021).  
Disponible en: [https://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/latest\\_update\\_GIP\\_surveillance/en/](https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/)  
[Acceso 7 Abril 2021].
- Ormeño, E., y Fernández, C. (Mayo de 2012). Los terpenos de las plantas: La producción vegetal de estos compuestos volátiles tiene importantes repercusiones en el ecosistema forestal y la atmósfera. *Investigación y Ciencia*, 428, 62-69.
- Ortín, J. (2009). Biología molecular del virus de la gripe, en: Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, pp. 35-37.



- Pai, S. R., Nimbalkar, M. S., Pawar, N. V. Dixit, G. B. (2011). Optimization of extraction techniques and quantification of Betulinic Acid (BA) by RP-HPLC method from *Ancistrocladus heyneanus* Wall. Ex Grah. Industrial Crops and Products, 34, 1458-1464.
- Parvez, M., Gul, W., Yousaf, M., Iqbal-Choudhary, M., Atta-Ur-Rahman, y Riaz-Khan, M. (1999). Taraxerone. Acta Crystallographica, 213-215.
- Pérez-Valera, O. (Noviembre 2018). Aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios de la especie vegetal *Diospyros xolocotzii*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 20-21.
- Phan-Minh, G., Vu-Minh, T., Katsuyoshi, M., y Phan-Tong, S. (2014). Unexpected course of Beckmann rearrangement of taraxerone oxime with Ac<sub>2</sub>O/AcOH. Natural Product Research, 28(8), 568-572.
- Porter, R., y Bode, R. (2017). A review of the antiviral properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) products. Phytotherapy research, 31, 533-554.
- PubChem, 2021. National Library of Medicine. [Online] (Actualizado 2021).  
Disponble en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92785>  
[Acceso 8 Enero 2022].
- Ragasa, C., Ng, V., Agoo, E., y Shen, C.-C. (2016). An Isoflavonoid Phtoalexin and a Sesqueterpene from *Cycas wadei*. International Journal of Pharmacognosy and Phytchemical Research, 8(4), 686-689.
- Rakers, C., Schwerdtfeger, S., Mortier, J., Duwe, S., Wolf, T., Wolber, G. y Melzig, M. F. (2014). Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. Bioorganic & Medicinal Chemical Letters, 24, 4312-4317.
- Rauf, A., Mubarak, M., Uddin, G., Patel, S., Khan, A., Halim, S., Bawazeer, S., Ahmad, K., Muhammad, N. y Mubarak, M. (Julio de 2017). *Diospyros*, an under-utilized, multipurpose plant genus: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 91, 714-730.
- Rodríguez-Ortega, M., Chumpitaz, Z., Ríos, S., Méndez, M., Méndez, J., y Cabrera, G. (2013). Actividad antiviral contra el virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17D, de extractos de hojas de *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12(4), 346-355.
- Rosado-Aguilar, J., Aguilar-Caballero, A., Rodríguez-Vivas, R., Borges-Argaez, R., García-Vázquez, Z., y Méndez-González, M. (2010). Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:

- ixodidae*) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12 (2), 417-422.
- Rouf-Wani, A., Yadav, K., Khursheed, A. y Rather, M. A. (2021). An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 152, 1-14.
- Ryu, H. W., Curtis-Long, M. J., Jung, S., Jin, Y. M., Cho, J. K., Ryu, Y. B., Lee, W. S. y Park, K. H. (2010). Xanthones with neuraminidase inhibitory activity from the seedcases of *Garcinia mangostana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 6258-6264.
- Sakurai, N., Yaguchi, Y., y Inoue, T. (1987). Triterpenoids from *Myrica Rubra*. *Phytochemistry*, 26(1), 217-219.
- Samanta, S. K., Dutta, D., Roy, S., Bhattacharya, K., Sarkar, S., Dasgupta, A. K., Pal, B. C., Mandal, C. y Mandal, C. (2013). Mahanine, A DNA Minor Groove Binding Agent Cellular Cytotoxicity with Involvement of C-7-OH and -NH Functional Groups. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1-13.
- Sati, S., Sati, N., y Sati, O. (2011). Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. *Pharmacognosy Reviews*, 5(10), 174-184.
- SDBS, 2021. Welcome to Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. [Online] Disponible en: [https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi](https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi) [Acceso 5 Noviembre 2021].
- Secretaría de Salud, 2021. Información Epidemiológica Publicaciones de Mortalidad. [Online] (Actualizado 1 de Enero de 2021). Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-epidemiologica-publicaciones-de-mortalidad> [Acceso 3 Agosto 2021].
- Setzer, W. N., Shen, X., Bates, R. B., Burns, J. R. McClure, K. J., Zhang, P., Moriarity, D. M. y Lawton, R. O. (2000). A Phytochemical investigayion of *Alchornea latifolia*. *Fitoterapia*, 71, 195-198.
- Sharma, K. y Zafar, R. (2014). Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 19-23.
- Sigma-Aldrich, 2021. Merck, Advanced Solution fro ADC Manufacturing. [Online] Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/en> [Acceso 5 Noviembre 2021].

- Silva, G.L., Lee, L.-S., Kinghorn, A.D. (1998). Special problems with the extraction of plants, en: Natural Products Isolation, Canell, R.J.P. (Ed.). Humana Press, New Jersey, pp. 365-380.
- Singh, R. K., Dhama, K., Karthik, K., Khandia, R., Munjal, A., Khurana, S. K., Chakraborty, S., Malik, Y. S., Virmani, N., Singh, R., Tripathi, B. N., Munir, M. y van der Kolk, J. H. (2018). A Comprehensive Review on Equine Influenza Virus: Etiology, Epidemiology, Pathobiology, Advances in Developing Diagnostics, Vaccines, and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-26.
- Smirnova, I., y Kazakova, O. (2018). Structure – Anti-influenza Type A Activity Relationship among a Series of Nitrogen Lupane Triterpenoids. *Natural Product Communications*, 13(18), 1267-1270.
- Song, J., Lee, K. y Seong, B. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, 68, 66-74.
- Suslov, E., Zarubaev, V., Slita, A., Ponomarev, K., Korchagina, D., Ayine-Tora, D., Reynisson, J., Volcho, K. y Salakhutdinov, N. (2017). Anti-influenza activity of diazaadamantanes combined with monoterpene moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 4531-4535.
- Tareq, F. S., Sohrab, H., Chowdhury, S. U., Afroz, F., Al-Mansur, M. y Hasan, C. M. (2009). Phytochemical Studies on the Leaves of *Xylia dolabriformis*. *Draka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 171-172.
- Thapa, M., Kim, Y., Desper, J., Chang, K. y Hua, D. (2012). Synthesis and antiviral activity of substituted quercetins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 353-356.
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 297-304.
- Tung-Ying, W., Yuan-Bin, C., Fu-Ting, C., Yu-Ming, H., Thang, T. D., Fang-Rong, C. y Yang-Chang, W. (2014). Chemical Constituents of the Leaves of *Desmos cochinchinensis* var. *fulvescens* BAN. *Helvetica Chimica Acta*, 97, 1714-1718.
- Uc-Cachón, A. H. (2012). Metabolitos antituberculosos de *Diospyros anisandra* Blake y *Gliocladium* sp. MR41. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 27-90.
- Uc-Cachón, A., Borges-Argáez, R., Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., González-Salazar, F., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M. y Molina-Salinas, G. (Agosto 2013b). Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-

- resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 27(1), 114-120.
- Uc-Cachón, A., Molina-Salinas, G., Said-Fernández, S., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., y Borges-Argáez, R. (2013a). A new dimeric naphthoquinone from *Diospyros anisandra*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 27(13), 1174-1178.
- Uddin, G., Waliullah, Siddiqui, B. S., Alam, M., Sadat, A., Ahmad, A. y Uddin, A. (2011). Chemical Constituents and Phytotoxicity of Solvent Extracted Fractions of Stem Bark of *Grewia optiva* Drummond ex Burret. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(1), 85-91.
- Uddin, Z., Song, Y. H., Curtis-Long, M. J., Kim, J. Y., Yuk, H. J. y Park, K. H. (2016). Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from *Polygonum cuspidatum* and their inhibitory mechanism. *Journal of Ethno-Pharmacology*, 1-31.
- Ullah, M., Uddin, Z., Song, Y. H., Li, Z. P., Kim, J. Y. y Park, K. H. (2019). Bacterial neuraminidase inhibition by phenolic compounds from *Usnea ongissima*. *South African Journal of Botany*, 120, 326-330.
- Wandzik, J., Kouba, T., y Cusack, S. (14 de Mayo de 2020). Structure and Function of Influenza Polymerase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1-18.
- Wen-Xuan, W., Lei, C., Juan, X., Gang, X., y Jin-Feng, H. (2011). Constituents from *Chimonanthus praecox* (wintersweet). *Phytochemistry Letters*, 4, 271-274.
- Wille, M. y Holmes, E. C. (2020). The Ecology and Evolution of Influenza Viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1-20.
- Wisetsai, A., Schevenels, F. T. y Lekphrom, R. (2019). Chemical constituents and their biological activities from the roots of *diospyros filipendula*. *Natural Products Research*, 1-6.
- Wu, W., Li, R., Li, X., He, J., Jiang, S., Liu, S. y Yang, J. (2016). Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Virus*, 8(6), 1-18.
- Xu-Chen, M., Shuo, D., Shao-Yan, Z., Ning, J., y Song-Kei, O. (2016). Taraxerone triterpene inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 11, 342-347.
- Yamauchi, Y. (2020). Chapter one - Influenza A virus uncoating. *Advances in virus research*, 106, 1-38.
- Yogeeswari, P. y Sriram, D. (2005). Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. *Current Medical Chemistry*, 12, 657-666.

- Yuk, H. J., Ryu, H. W., Jeong, S. H., Curtis-Long, M. J., Kim, H. J., Wang, Y., Song, Y. H. y Park, K. H. (2013). Profiling of neuraminidase inhibitory poluphenols from the seeds of *Paeonia lactiflora*. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 144-149.
- Zarubaev, V. V., Golod, E. L., Anfimov, P. M., Shtro, A. A., Saraev, V. V., Gavrilov, A. S., Logvinov, A. V. Kiselev, O. I. (2010). Synthesis and anti-viral activity of azolo-adamantanes against influenza A virus. *Bioorganis & Medicinal Chemistry*, 18, 839-848.
- Zhang-Hua, S., Ning-Hua, T., Guang-Zhi, Z., y Yu-Mei, Z. (2016). Two New Cinnamyl Isovalerate Derivatives from *Sabina gaussenii*. *Molecules*, 21(571), 1-6.
- Zhou, F., y Pichersky, E. (2020). More is better: the diversity of terpene metabolim in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 1-10.
- Zorina, A., Nikiforova, N., Starova, G., Marchenko, S., Selivanov, S., y Trifonov, R. (2018). Synthesis and Structure of a New Semisynthetic Taraxerone Derivative Fused to a Pyrazine Ring through the C2-C3 Bond. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 54(3), 514-516.
- Zuyuan, S., Lou, K., y Wang, W. (Septiembre de 2015). New small-molecule drug desing strategies for fighting resistant influenza A. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 419-430.

