

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio fitoquímico biodirigido de los componentes con actividad anti-neuraminidasa presentes en extractos de hoja y flor de *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm)

Tesis que presenta

Nahomi Sáman Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

ENERO, 2023

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 Nahomi Sáman Hernández titulado **Estudio fitoquímico biodirigido de los componentes con actividad anti-neuraminidasa presentes en extractos de hoja y flor de *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm)**, fue realizado en la unidad de biotecnología, en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del(a) Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez y la Dra. Blanca Marina Vera Ku, dentro de la opción de Recursos Naturales perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de Enero de 2023.

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.

Firma:  _____

Nahomi Sáman Hernández

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Estudio de los componentes antivirales de *Caesalpinia yucatanensis* y *Diospyros anisandra*” proyecto de ciencia Básica CONACYT A1-S-27652, bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Rocío Borges Argaéz** por sus sugerencias, su apoyo durante la realización de esta tesis y brindarme la confianza para terminar este proyecto.

A la **Dra. Marina Vera Ku** por sus sugerencias y apoyo durante la realización de la tesis, así como la confianza para llevarme por las colectas al parque científico y primordialmente la oportunidad de cursar un posgrado en esta institución.

A la **Dra. María Azucena Canto Aguilar** y la **Dra. Durcy Verenice Ruiz Ciau** por formar parte del comité de revisión de esta tesis y sus sugerencias para mejorar el escrito del presente trabajo.

A la **Dra. Nayelli Rodríguez Fuentes** y el **Dr. Juan Valerio Cauich** de la unidad de Materiales por el acceso al laboratorio para la realización de los bioensayos.

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán** por todas las facilidades brindadas para la realización de esta Tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca No.1098583 para los estudios de maestría, así como el apoyo para el proyecto Ciencia Básica (Clave A1-S-27652) al que perteneció la tesis realizada.

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

Al **Dr. Víctor Aguilar** por su apoyo técnico y su asesoramiento en la obtención de perfiles cromatográficos CL-EM.

DEDICATORIAS

Al culminar una etapa sumamente importante de mi vida, dedico mi esfuerzo reflejado en esta tesis a:

Mi mamá quien siempre está ahí apoyándome, Irazema eres el pilar que siempre me ha brindado un apoyo incondicional y ha formado a la persona que soy hoy en día.

Mi hermana Mirsha quien está apoyando constantemente y siempre me saca una sonrisa, el día de hoy solo puedo seguir motivándote a seguir tus sueños y nunca abandonarlos.

A mi mejor amigo y padre que, aunque el día de hoy no puedas acompañarme en este logro tan importante en mi vida, te dedico con mucho cariño y esfuerzo, sé que desde el cielo estas orgulloso de todo lo que he logrado y he podido superar con tus enseñanzas.

A mi abuelito Agustín, mi segundo papá que, aunque casi no entienda de lo que hablo y hago en el laboratorio siempre está feliz y me apoya en mis aventuras.

Con mucho cariño

Nahomi

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo I.	2
1. Antecedentes.....	2
1.2 Plantas Medicinales.....	2
1.3 Metabolitos secundarios en plantas	3
1.4 Factores que afectan los metabolitos secundarios (MS) en plantas	3
1.4.1 Factores Bióticos y Abióticos.....	4
1.5 Flora Peninsular de Yucatán y principales familias vegetales	5
1.5.1 Familia <i>Leguminosae</i> (<i>Farbaceae</i>).....	5
1.5.2 Subfamilia <i>Caesalpinaceae</i>	5
1.5.3 Género <i>Caesalpinia</i>	6
1.5.4 <i>Erythrostemon yucatanensis</i> (Greenm) Gagnon & G.P. Lewis	7
1.6 Actividad biológica detectada en <i>E. Yucatanensis</i>	8
1.8 Ciclo de replicación	14
1.9 Ensayo biodirigido: actividad anti-neuraminidasa	15
2. Justificación	16
3. Pregunta de investigación	17
4. Objetivo General.....	18
5. Objetivos Particulares.....	19
Capítulo II. Materiales y Métodos	20
2.1 Estrategia experimental.....	20
2.2 Metodología experimental	21
2.2.1 Material y equipo	21
2.2.2 Obtención de material vegetal.....	21
2.2.3 Procesamiento de material vegetal y obtención de extractos metanólicos.....	22
2.2.4 Fraccionamiento	22
2.2.5 Partición líquido-líquido de extracto MeOH	23
2.2.6 Fraccionamiento por Cromatografía Líquida al Vacío de extracto de ACN:MeOH ...	24
2.3 Ensayo de inhibición de la enzima neuraminidasa: actividad anti-neuraminidasa.....	27
2.4 Cromatografía por permeación de gel de extractos MeOH de hojas	28
2.4.1 Cromatografía por permeación en gel de extractos MeOH de inflorescencias	30
2.5 Análisis cromatográfico por CG/EM y CL/EM de la subfracción de hoja de <i>E. yucatanensis</i>	31

Capítulo III. Resultados y Discusión	33
3.1 Rendimiento de extractos metanólicos.....	33
3.2 Caracterización espectroscópica.....	33
3.2.1 Análisis de perfil másico obtenido por CL/EM de las subfracciones CYS-N y CYS-H de <i>E. yucatanensis</i>	33
3.2.2 Análisis espectroscópico RMN de CYS-N.....	36
3.3 Análisis de Concentraciones inhibitorias medias (IC50) de fracciones obtenidas por VLC.	39
3.3.1 Análisis de Concentraciones inhibitoria media (IC50) de subfracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel.....	45
Capítulo IV. Conclusiones	48
4. 1 Conclusión.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

Listado de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
An	Acetona
AcOEt	Acetato de Etilo
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLV	Cromatografía líquida al vacío
HA	Hemaglutinina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
Hx	Hexano
J	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
NA	Neuraminidasa
RMN - H1	Resonancia magnética nuclear de protón
Tr	Tiempo de retención
µg	Microgramo
µl	Microlitro

Índice de Figuras

Figura 1.	7
Figura 2.	11
Figura 3.	12
Figura 4.	12
Figura 5.	14
Figura 6.	20
Figura 7.	21
Figura 8.	22
Figura 9.	23
Figura 10.	24
Figura 11.	25
Figura 12.	28
Figura 13.	29
Figura 14.	30
Figura 15.	31
Figura 16.	34
Figura 17.	35
Figura 18.	36
Figura 19.	37
Figura 20.	39
Figura 21.	40
Figura 22.	40
Figura 23.	41
Figura 24.	43
Figura 25.	56

Índice de Tablas: i

Tabla 1. Reportes de algunas plantas medicinales con actividad antiviral	2
Tabla 1.2 Reportes de actividad biológica del género <i>Caesalpinia</i>	8
Tabla 1.3 Efecto antiviral de fracciones de <i>E. yucatanensis</i> contra el virus de Influenza A H1N1 a nivel co-tratamiento (Cetina-Montejo, 2012).	9
Tabla 1.4. Efecto antiviral de las fracciones de <i>E.yucatanensis</i> contra el virus de la influenza A a nivel pos-tratamiento (Cetina-Montejo, 2012).	10
Tabla 2. Rendimiento de fracciones obtenidas por VLC.	25

Tabla 2.1 Rendimiento de fracciones obtenidas de CYV-12 (500 mg).....	26
Tabla 2.2 Volúmenes utilizados en el bioensayo anti-neuraminidasa	27
Tabla 3. Rendimiento de fracciones obtenidas de extractos metanólicos de hojas.....	33
Tabla 3.1 Comparacion de los datos de RMN – 1H de Corilagina con lo reportado por Yagi <i>et al.</i> , 1974.	37
Tabla 3.2 Valores y gráficos de IC ₅₀ de fracciones obtenidas por CLV de extracto de hoja de <i>E. yucatanensis</i>	42
Tabla 3.3 Gráficos representativos de IC ₅₀ de subfracciones obtenidas de la Fracción 12 (CLV).	44
Tabla 3.4 Resumen de valores de IC ₅₀ para subfracciones obtenidas de hoja e inflorescencias de <i>E. yucatanensis</i>	45

RESUMEN

Erythrostemon yucatanensis (Greenm) es una especie nativa de distribución en la península de Yucatán, México, también conocida como *Caesalpinia yucatanensis* o Taa kín ché'. Estudios previos identificaron la actividad biológica en hojas, flores y semillas mostrando la presencia de compuestos con actividad biológica; por otra parte, los estudios biodirigidos de actividad antiviral a nivel co-tratamiento (Hemaglutinina viral) y pos-tratamiento (Neuraminidasa viral) de extractos de hojas de esta especie permitió el aislamiento de 5-hidroxi-7-metoxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4H-cromen-4-ona, una flavona reportada por primera vez en el género *Erythrostemon*, como uno de los responsables de la actividad contra la hemaglutinina viral, quedando sin esclarecer los componentes activos a nivel neuraminidasa. Por lo cual, en el presente trabajo se planteó como objetivo principal un análisis fitoquímico de los extractos de hoja y flor de *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm) distribuidas en la localidad de Sierra Papacal, Yucatán, así como la caracterización de componentes con actividad anti-neuraminidasa. Para la obtención de los metabolitos activos se siguió un fraccionamiento y un ensayo biodirigido empleando un método enzimático de inhibición de la neuraminidasa viral la cual es obtenida de *Clostridium perfringes*. Para la detección de la presencia o ausencia de los metabolitos activos se empleó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y se realizó un análisis de las fracciones obtenidas por VLC con mayor actividad anti-neuraminidasa. Se realizó una cromatografía de permeación en gel para la fracción activa (CYVF12), obteniendo la purificación de un compuesto identificado como Corilagina con clave CYS-N (3.6 mg), donde su estructura se confirmó mediante métodos espectroscópicos (RMN- H^1) y espectrométricos; así mismo se sugirió la presencia de una flavona conocida como hesperidina. También se realizó el bioensayo anti-neuraminidasa en las fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hoja e inflorescencias de *E. yucatanensis*, obteniendo resultados significativos que muestran un comportamiento dosis-respuesta, es decir que a concentraciones de 400 $\mu\text{g/mL}$ se logra inhibir la actividad de neuraminidasa, obteniendo un obteniendo $\text{IC}_{50} > 3 \mu\text{g/mL}$ en las subfracciones de inflorescencias, lo cual nos indica que estas y/o compuestos de ambos extractos podrían actuar como candidatos para el uso de agentes antivirales contra el virus de la influenza A H1N1.

ABSTRACT

Erythrostemon yucatanensis (Greenm) is a native species of distribution in the Yucatan Peninsula, Mexico, also known as *Caesalpinia yucatanensis* or *Taa kín ché'*. Previous studies identified the biological activity in leaves, flowers and seeds showing the presence of compounds with biological activity; On the other hand, bioguided studies of antiviral activity at co-treatment (viral hemagglutinin) and post-treatment (viral neuraminidase) levels of leaf extracts of this species allowed the isolation of 5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-chromen-4-one, a flavone reported for the first time in the genus *Erythrostemon*, as one of those responsible for the activity against viral hemagglutinin, leaving the active components at the neuraminidase level unclear. Therefore, in the present work, the main objective was a phytochemical analysis of the leaf and flower extracts of *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm) distributed in the area of Sierra Papacal, Yucatán, as well as the characterization of components with anti-neuraminidase activity. To obtain the active metabolites, fractionation and a biodirected assay were followed using an enzymatic method of inhibition of viral neuraminidase, which is obtained from *Clostridium perfringens*. For the detection of the presence or absence of active metabolites, liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used, and an analysis of the fractions obtained by VLC with the highest anti-neuraminidase activity was performed. A gel permeation chromatography was performed for the active fraction (CYVF12), obtaining a compound identified as Corilagin named as CYS-N key (3.6 mg), where its structure was confirmed by spectroscopic methods (NMR- ¹H), likewise it was suggested the presence of a flavone named as hesperidin. The anti-neuraminidase bioassay was also carried out on the fractions obtained from the methanolic extracts of leaves and inflorescences of *E. yucatanensis*, obtaining significant results that show a dose-response behavior, that is, at concentrations of 400 µg/mL it is possible to inhibit the neuraminidase activity, obtaining an IC₅₀ >3 µg/mL in the subfractions of inflorescences, which indicates that these and/or compounds of both extracts could act as candidates for the use of antiviral agents against the influenza A H1N1 virus.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son definidas como organismos autótrofos pluricelulares que tienen células eucariotas y una reproducción sexual, las cuales cuentan con células con cloroplastos con diferentes pigmentos tales como las clorofilas a y b. Estas tienen la capacidad de transformar compuestos inorgánicos a compuestos orgánicos por medio de la fotosíntesis, por lo que sostienen la vida en la biósfera por la producción de oxígeno que generan (Margulis, 2009). Sin embargo, las plantas además de su metabolismo primario el cual se encuentra presente en todos los seres vivos, estas poseen un metabolismo secundario el cual les permite tanto la producción, como el almacenamiento de compuestos de una naturaleza química diversa. Dichos compuestos son derivados del metabolismo secundario, por lo cual se conocen como tal y cuentan con propiedades biológicas de principal interés o bien su uso y/o aplicación en medicamentos, insecticidas, colorantes entre otros (García y Pérez, 2009). Incluso algunos metabolitos secundarios son activados participando en el mecanismo de defensa de las plantas, cuando se sienten amenazadas ya sea contra el ataque de herbívoros y/o patógenos, de lo contrario a las defensas físicas, las cuales son más fácil de identificar ya que son características de la estructura de las plantas, un claro ejemplo son las espinas, cutículas gruesas o follajes fibrosos, un ejemplo de esto se encuentra en la rosa (*Rosa spp.*), por otra parte está la defensa fenológica, la cual se refiere a las etapas del ciclo de vida de la planta que se desfasan de los tiempos de sus depredadores o patógenos (Quirós *et al.*, 2009) y por último las defensas de asociación las cuales son aquellas relaciones mutualistas que se establecen entre la planta y otra especie, ya sea hongos, insectos o bacterias.

Las plantas medicinales son una fuente de metabolitos secundarios, siendo aquellos los que proporcionan las propiedades terapéuticas características de cada especie, las cuales son de gran importancia para el control de diferentes enfermedades. México, es conocido por su gran diversidad de flora, la cual cuenta con un aproximado de 26,000 especies empleadas en diversos usos como la alimentación, salud, entre otros. La Península de Yucatán, es conocida por su flora muy particular en donde abundan las especies de la familia de las fabáceas (leguminosas), a la cual pertenece *Erythrostemon yucatanensis*. Se ha demostrado que extractos de *E. yucatanensis* presentan actividad antiviral *in vitro* a nivel pos-tratamiento contra virus de influenza AH1N1, siendo las partes vegetales activas: las hoja e inflorescencias. Por lo anterior, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad anti-neuraminidasa de extractos de hoja y flor de de esta especie colectada en la localidad de Sierra Papacal, Yucatán.

Capítulo I.

1. Antecedentes

1.2 Plantas Medicinales

Las plantas medicinales se han empleado de distintas formas desde hace más de 50,000 años. La Organización Mundial de la Salud señala que más de 20,000 especies se utilizan para fines medicinales, siendo un recurso importante a nivel mundial. Sin embargo, hoy en día su uso se ve afectada por el deterioro ambiental, disminuyendo en gran parte el legado cultural. El uso de las plantas medicinales puede ser una solución a la problemática donde los fármacos sintéticos provocan efectos negativos colaterales, siendo necesario el estímulo al consumo de productos naturales, por lo que juegan un papel fundamental en la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de éstos. Se han reportado alrededor de 2500 plantas vasculares en la península de Yucatán, de las cuales aproximadamente 750 especies tienen usos medicinales (Méndez & Duran, 2009).

Tabla 1. Reportes de algunas plantas medicinales con actividad antiviral

Virus	Especie	Estudio realizado	Efecto antiviral	Referencia
Herpes	<i>Carissa edulis</i> Vahl	<i>in vivo - in vitro</i>	Actividad antiviral	<i>Tolo et al., 2006</i>
Influenza	<i>Geranium</i> <i>sanguineum</i>	<i>in vivo - in vitro</i>	Reducción de efectividad viral	<i>Pantev et al., 2006;</i> <i>Serkedjieva y Hay,</i> <i>1997</i>
VIH	<i>Phyllanthus</i> <i>amarus</i>	<i>in vitro</i>	Inhibición de la replicación	<i>Notka et al., 2004</i>
Poliovirus	<i>Guazuma</i> <i>ulmifolia</i>	<i>in vivo - in vitro</i>	Inhibición de la replicación	<i>Felipe et al., 2006</i>

1.3 Metabolitos secundarios en plantas

Las plantas poseen rutas metabólicas por las que sintetizan una gama extremadamente amplia de sustancias llamadas metabolitos secundarios. Dichas sustancias resultan ser de interés debido a sus efectos farmacológicos, debido a la presencia de sustancias que se conocen como “principios activos”, (Fikry, Khalil & Salama, 2019). Estos metabolitos secundarios son el resultado de las reacciones enzimáticas de las plantas, como funciones de atracción, defensa o señalización, estos compuestos se clasifican en varios grupos, principalmente como los nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Los cuales generalmente son resultado de reacciones en cadena provenientes del metabolismo secundario de la planta y resultan no ser esenciales para ella. Estos compuestos químicos han sido utilizados desde épocas prehispánicas en la medicina tradicional y hoy en día se siguen realizando estudios para enriquecer el conocimiento de sustancias que sirvan como base de medicamentos. Las rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos de un determinado grupo se encuentran entrelazadas con otro, debido a que el producto del catabolismo de un tipo de compuesto puede ser el inicio de la génesis de otro. Un determinado compuesto puede ser utilizado en el metabolismo primario o secundario de otro, dependiendo de la especie, etapa vegetativa y del medio ambiente en dónde se encuentre. Entre otros factores las variables climáticas que afectan el rendimiento de los metabolitos secundarios en las plantas medicinales son la temperatura, humedad, radiación solar, luz y calor, régimen de vientos y química del suelo. La competencia por nutrientes con otros organismos es otro factor que influye en la producción de metabolitos secundarios, así como la protección de insectos y/o otros animales (Domínguez, 1973).

1.4 Factores que afectan los metabolitos secundarios (MS) en plantas

Se ha demostrado que en plantas los diferentes tejidos, pueden poseer diferentes propiedades medicinales en las diferentes etapas de desarrollo (Bartwal *et al.*, 2013), esto porque los factores (bióticos y abióticos) influyen en el desarrollo desde el inicio. y posteriormente la diferenciación de estructuras celulares particulares involucradas en la biosíntesis y almacenamiento de MS (Broun *et al.*, 2006). También la presencia de los metabolitos secundarios en las plantas varía principalmente dependiendo del área geográfica donde se encuentren, así como las condiciones de crecimiento (Fikry *et al.*, 2019; Zinicoscaia, 2020). Sin embargo, es importante mencionar que el crecimiento y el desarrollo de las plantas suelen ser provocados o inhibidos por diferentes factores ambientales, por lo que la adaptación de la morfología, anatomía y funciones fisiológicas

de las plantas a los cambios bióticos y abióticos puede influir en la acumulación de metabolitos secundarios (Ma y Zhan, 2010).

1.4.1 Factores Bióticos y Abióticos

La síntesis de MS puede variar dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta, así como los niveles constitutivos solo aumentan como parte de la respuesta ante un estrés biótico o abiótico. Este aumento en los niveles de MS, resulta ser sumamente importante para la supervivencia de la planta, debido a que la síntesis se deriva del metabolismo primario y algunos compuestos resultan ser tóxicos para la misma planta. Por tal motivo los MS constituyen una parte importante en la respuesta de defensa de las plantas sometidas ya sea a heridas y/o al ataque por parte de las plagas (Sepúlveda, 2007). Otra importante función de los compuestos del metabolismo secundario es la alelopatía, es decir, intervenir en la defensa química de las plantas. De esta forma los MS que son secretados por una planta, pueden interaccionar con otra y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato produciendo un efecto negativo o positivo sobre ella. Las condiciones ambientales influyen en la síntesis de los compuestos con actividad alelopática potencial, pero ésta vuelve a ser afectada por la interacción con el ambiente, la cual puede ser modificada por las distintas condiciones ambientales a las que se ve expuesta (Kobayashi, 2004). Estos incrementan su concentración cuando la planta está bajo diferentes condiciones meteorológicas. En general, la síntesis de fenoles varía y está inducida por factores ecológicos como la radiación UV, estrés hídrico (Chaves y Escudero, 1999) u ozono (Sandermann *et al.*, 1998), siendo además de influir en la síntesis también puede potenciar su actividad.

Una amplia familia de MS como los compuestos fenólicos, son producidos por las plantas en respuesta a estrés abiótico tales como la altitud elevada, frío, sequía, deficiencia de nutrientes, radiación UV. En plantas superiores, los fenilpropanoides como el ácido hidroxicinámico, ésteres de cinamoil y flavonas, flavonoles y antocianinas proveen protección contra UV-A y UV-B y también resultan ser tóxicos para insectos y fungistáticos (Korkina, 2007). En resumen, la formación de MS se encuentra regulada por distintos factores internos y externos que se encuentran relacionados, afectando a la fisiología vegetal.

1.5 Flora Peninsular de Yucatán y principales familias vegetales

Dentro de la península de Yucatán podemos encontrar una variedad vegetal particular en donde se reconocen 2 394 taxones a nivel de especie, la cual se compone de 956 géneros con 161 familias nativas y/o asilvestrados. En 2010, se reportó la estimación de flora total con un aproximado de 3 000 especies en donde las familias más relevantes en la península son: *Fabaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*, *Orchidaceae* y *Euphorbiaceae* con 230, 216, 147, 132 y 113 especies (taxones), respectivamente. Por otra parte, los géneros más diversos son *Ipomoea*, *Croton*, *Euphorbia*, *Cyperus* y *Rhynchospora* con 34, 32, 32,30 y 28 géneros, respectivamente (Carnevali *et al.*, 2010).

1.5.1 Familia *Leguminosae* (*Farbaceae*)

A nivel mundial la familia de las leguminosas son una de las tres familias de angiospermas más numerosas con un aproximado de 730 géneros y más de 19,400 especies distribuidas en las regiones cálidas y templadas. Esta familia incluye árboles, arbustos o hierbas, dicha familia se encuentra dividida en tres subfamilias: *Mimosaceae*, *Caesalpiniaceae* y *Papilionaceae*, en México se encuentran alrededor de 140 géneros y 1850 especies de esta familia.

Las leguminosas representan una de las familias de mayor importancia agrícola y económica a nivel mundial, ya que muchas especies de cultivos pertenecientes a estas son utilizadas en la producción de distintos productos, tales como combustible, fibras, aceites esenciales, entre otros.

1.5.2 Subfamilia *Caesalpiniaceae*

Este género se encuentra integrado por más de 2500 especies que se encuentran principalmente en los trópicos y subtrópicos de los hemisferios, principalmente en América, África y Asia. Las selvas tropicales, bosques, sabanas o semidesiertos forman parte de su amplia variedad de hábitat, distribuyendo entre altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 3600 - 4000 m sobre el nivel del mar. Principalmente los representantes de esta subfamilia son árboles, la mayoría con raíces tubulares, arbustos o hierbas, hojas pecioladas, bipinnadas o pinnadas, flores grandes o medianamente pequeñas, suelen ser generalmente bisexuales de color amarillo, rojizas o rosadas (Ulibarri, 2008).

1.5.3 Género *Caesalpinia*

Este género pertenece a la subfamilia *Caesalpinieae* el cual está integrado por 140 especies, el cual a su vez pertenece a la familia *Leguminosae*, que se encuentra ampliamente distribuida en América, África y Asia. El género *Caesalpinia* es caracterizado por tener hojas bipinnadas, foliolos pequeños y numerosos o bien grandes y pocos, herbáceas o coriáceas; flores medianas o muy grandes, usualmente amarillas o rojas y sus vainas suelen ser oblongas o lanceoladas.

El nombre *Caesalpinia* fue propuesto mucho tiempo atrás, incluido en la magna obra *Species Plantarum* por Carlos Linneo en 1753, desde esta fecha se han descrito nuevos taxones asignados a dicho género. Sin embargo, con el paso del tiempo se han logrado describir otros géneros parecidos y que en algún momento llegaron a transferirse a *Caesalpinia*. Este género ha sido estudiado ampliamente en distintas actividades biológicas, tales como la actividad antiviral (Chiang *et al.*, 2003) con el reporte de aislamiento de flavonoides (Islas *et al.*, 2011), actividad analgésica (Balido *et al.*, 2012), antitumoral (Gallego, 2016). Así mismo Balido y colaboradores en el 2012 reportaron el aislamiento de triterpenos con actividad antibacteriana en este género, también se reportan diterpenos con actividad anti-inflamatoria (Bello, 2016), cumarinas, taninos y saponinas (Yhasminie, 2019). Por lo cual se considera que este género cuenta con una gran variedad de MS, entre los cuales se pueden encontrar desde triterpenos, flavonoides, fenoles aromáticos, fenilpropanoides (Wei *et al.*, 2013), siendo los diterpenos los componentes mayoritarios de este género *Caesalpinia* (Gallego, 2016).

En la medicina tradicional del estado de Yucatán se han descrito el uso de las plantas de este género, tales como *Caesalpinia criatata* L., *Caesalpinia gaumeri* greenman, *Caesalpinia platyloba* S. Watson, *Caesalpinia pulcherrima* y *Caesalpinia vesicaria*, así como el uso en tratamientos de una gran variedad de enfermedades.

Comúnmente se utilizan las hojas y/o partes aéreas de las plantas pertenecientes a este género, en donde se han reportado el aislamiento de flavonoides, flavonas, chalconas, terpenos y ácido gálico, reportados por Ogunlana y colaboradores en el 2015 en los extractos etanólicos de *C. Bonduc* así como actividad citotóxica significativa contra células HeLa (Ogunlana *et al.*, 2015). Por otro lado, en el 2016 se reportó el aislamiento de una nueva cumarina, 7 compuestos pertenecientes al grupo de los fenoles y dos nuevos homoisoflavanos a partir de extractos etanólicos de hojas de *C. spinosa* (He *et al.*, 2016).

1.5.4 *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm) Gagnon & G.P. Lewis

Conocida comúnmente como *Caesalpinia yucatanensis* o *Poincianella yucatanensis* Britton & Rose, se encuentra como un árbol que puede medir hasta 10 metros de altura y tiene un tronco de hasta 15 cm de diámetro, sus ramas son jóvenes puberulentos; pintas de 4 a 7, foliolos de 2 a 4 pares y suelen ser oblongas e ovaladas con 2 o 3.5 cm de largo, pueden llegar a formarse racimos de 5 a 15 cm de largo, cortos o puberulentos y unos pétalos de 1.5 cm, de color amarillos oblongas e ovaladas, con estambres igual a los pétalos; leguminosas lineal-oblonga (CICY, 2011).



Figura 1. *Erythrostemon yucatanensis*

Esta especie tiene una época de floración que se encuentra en los meses de enero a marzo y de noviembre a diciembre, mientras que sus frutos se dan en los meses de enero a abril. Esta especie resulta de gran importancia ya que es nativa de la Península de Yucatán, aunque también se puede encontrar distribuida en Chiapas y Tabasco, así como en Belice, Guatemala y Honduras. En Yucatán se conoce comúnmente con su nombre maya, taan k'in che 'o también k'aan pok'ool k 'uum.

1.6 Actividad biológica detectada en *E. Yucatanensis*

Se han reportado diferentes estudios sobre el género *Caesalpinia* en donde se muestra que contiene una gran variedad de MS, como terpenos, flavonoides, chalconas, homoisoflavonoides, que han mostrado una gran cantidad de actividades biológicas (Tabla 2), tales como actividad antiviral, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, entre otras. También se ha reportado que en este género abunda el contenido de diterpenos, tales como furanoditerpenos que poseen actividad contra la malaria, actividad antiviral y anticancerígena.

Tabla 1.2 Reportes de actividad biológica del género *Caesalpinia*

Especie	Actividad biológica	Parte	Extracto/Compuesto	Referencia
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Antibacterial, Antifungico, Antiviral (Herpes)	Parte aérea	Homoisoflavonoides Flavonoides	(Das-Kumar, 2009) (Chiang <i>et al.</i> , 2003)
<i>Caesalpinia sappan</i>	Antiviral (Influenza) Antioxidante	 Duramen	 3-desoxisappanchalcona, sappanchalcona Brazileína, protosappanina A y B, extracto etanólico	 (Liu <i>et al.</i> , 2009) (Jun-Wei, 2008)
<i>Caesalpinia bundoc</i>	Inhibición de glutathion S-transferasa Antioxidante Antimalaria	Corteza Hojas Semillas	 Extracto etanólico Extracto metanólico Extracto diclorometano; diterpenos	 (Udenigwe <i>et al.</i> , 2007) (Mandal, 2009)
<i>Caesalpinia minax</i>	Antiviral (virus respiratorio sincitial)	Semillas	Espirocaesalmina	(Udenigwe, 2007)

Anteriormente en el grupo de trabajo del laboratorio en Productos Naturales de la Dra. Rocío Borges Argáez se realizó un estudio para la evaluación antiviral de extractos vegetales de plantas nativas de la Península de Yucatán, encontrando que el extracto hexánico del tallo de *Caesalpinia yucatanensis* presentó resultados significativos contra la cepa pandémica viral A/México/InDRE/797/2010 la cual es resistente a oseltamivir con unos valores de IC₅₀ menores a 0.78 ug/ml y con un IS (Índice de Selectividad) de 64.70. Dicho extracto mostró

un efecto inhibitorio en la entrada del virus a la célula, en donde se realizó un fraccionamiento biodirigido de los extractos de tallo de *E. yucatanensis* que permitió la identificación de sus componentes activos. Adicionalmente, se propuso que el modo de acción antiviral del extracto de corteza del tallo evaluado in vitro empleando la línea celular de MDCK (células de riñón canino), actúa ya sea mediante el bloqueo de la entrada del virus a la célula o la inhibición de la fusión de la hemaglutinina viral con el ácido siálico de la célula.

Tabla 1.3 Efecto antiviral de fracciones de *E. yucatanensis* contra el virus de Influenza A H1N1 a nivel co-tratamiento (Cetina-Montejo, 2012).

FRACCIÓN	A/Yucatán/2370/09 MOI:0.001		A/México/InDRE797/10 MOI:0.01	
	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AV1	>25	4	>25	4
AV2	>25	4	8.01	12.48
AV3	>25	4	>25	4
AV4	<0.195	48.51	<0.195	48.51
AV5	<0.195	368.97	<0.195	368.97
AV6	2.57	29.8	<0.78	98.21
AV7	2.51	16.61	4.83	8.63
AV8	6.27	8.04	<0.78	64.70
AV9	>6.25	2.55	>6.25	2.55
AV10	>6.25	1.95	>6.25	1.95

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

IS: Índice de selectividad. IS: CC₅₀/IC₅₀

MOI: Multiplicidad de infección, siglas en inglés

Posteriormente se realizaron nuevos estudios para identificar en las fracciones y particiones compuestos con actividad antiviral empleando el ensayo de reducción del efecto citopático contra las cepas de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) por medio de tres estrategias de posibles modos de acción: la inhibición de entrada del virus a la célula (pre-tratamiento y co-tratamiento), o si actúan inhibiendo la replicación del virus o la salida del virus (pos-tratamiento). Los resultados obtenidos mostraron que una fracción denominada AV5 presentó actividad antiviral en el pos-tratamiento contra la cepa A/México/InDRE/797/10 con un IC₅₀ de 3.62 µg/mL y un IS (Índice de Selectividad) de 19.87. Posteriormente se analizó esta fracción por medio de cromatografía en capa delgada, en donde se observaron 6 componentes principales. Por lo que se pudo concluir que las fracciones y particiones de *C. yucatanensis* cuentan con actividad antiviral contra el virus de Influenza A, pudiendo actuar bloqueando la entrada del virus y/o inhibiendo su replicación, o bien actuando a nivel de la neuraminidasa viral.

Tabla 1.4. Efecto antiviral de las fracciones de *E.yucatanensis* contra el virus de la influenza A a nivel pos-tratamiento (Cetina-Montejo, 2012).

FRACCIÓN	A/Yucatán/2370/09 MOI:0.001		A/México/InDRE797/10 MOI:0.01	
	IC ₅₀ (µg/mL)	IS*	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AV1	>25	4	>25	4
AV2	>25	4	>25	4
AV3	>25	4	>25	4
AV4	>6.25	1.51	>6.25	1.51
AV5	>6.25	11.51	3.62	19.87
AV6	>25	3.06	>25	3.06
AV7	>25	1.66	>25	1.66
AV8	>25	2.01	>25	2.01
AV9	>6.25	2.55	>6.25	2.55
AV10	>6.25	1.95	>6.25	1.95

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

IS: Índice de selectividad. IS: CC₅₀/IC₅₀

MOI: Multiplicidad de infección, siglas en inglés

Estudios más recientes, realizados en el CICY en 2018, en el mismo laboratorio y empleando el ensayo de inhibición en la hemaglutinación identificaron y aislaron el compuesto activo, el cual pertenece al grupo de las flavonas. Así mismo, se observó que este compuesto es abundante en muestras de la localidad de Sierra Papacal durante la temporada seca, lo cual confirma que los factores ambientales tales como temperatura y/o humedad juegan un papel fundamental en la producción de este compuesto activo, y por lo tanto son importantes de considerar para la posibilidad de usar este compuesto contra el virus de Influenza A/H1N1 (Canto-Ramirez, 2018).

1.7 Influenza

La influenza A es conocida por ser una enfermedad viral, la cual representó una grave amenaza para la humanidad a inicios del siglo XX, dejando un aproximado de 10 millones de muertes alrededor del mundo. En el 2009, la variante de la influenza A, la H1N1 se propagó de modo pandémico, siendo un virus nuevo formado por la combinación de un virus aviar, porcino y humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el informe de actualización número 72 del día 25 de octubre del 2009, informó 44 000 casos a nivel mundial, de los cuales 5 700 fueron extremadamente críticos (WHO, 2009a). En México, país donde se inició la pandemia, se confirmaron un total de 72,504 casos PCR positivos, con un total de 1,244 defunciones (Cordona *et al.*, 2009).

El virus de la influenza, pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, es un grupo de agentes con genoma ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla, segmentada, con una polaridad negativa y una envoltura lipoproteica. Este virus se divide en tipo A, B y C, y a su vez se subdividen en subtipos, dependiendo de las diferencias antigénicas de las glicoproteínas de superficie: la Hemaglutinina y la Neuraminidasa. La hemaglutinina de los virus influenza, constituye el principal determinante antigénico; está representada de forma mayoritaria en el virión y participa de forma directa con el proceso de infección. Esta glicoproteína posee la propiedad de aglutinar *in vitro* glóbulos rojos de diferentes especies animales y este fenómeno es llamado hemaglutinación, y es utilizado para la detección y cuantificación del virus.

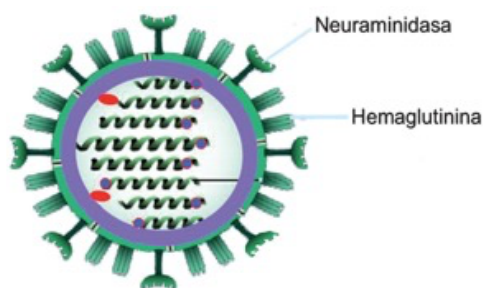


Figura 2. Estructura del virus de la influenza A en donde se observa dos de sus principales glicoproteínas, la neuraminidasa y la hemaglutinina.

Para el caso de la influenza pandémica por AH1N1 se indicó la administración de antivirales de primera generación, siendo éstos los inhibidores del canal de iones, como la Amantadina y Rimantadina, que actúan sobre la proteína viral M2, la cual es esencial después de la fusión del virus con la membrana endosómica; sin embargo, se han reportado efectos

secundarios con el uso de estos antivirales, asociados con el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal (Amarelle *et al.*, 2017).

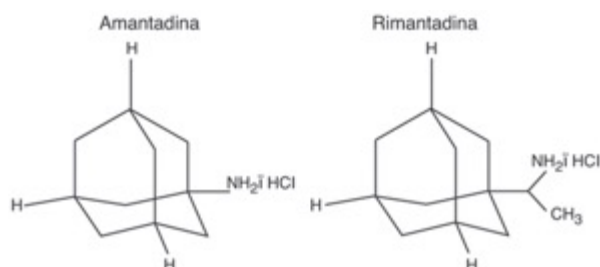


Figura 3. Estructura química de antivirales inhibidores del canal M2: Amantadina y Rimantadina (Deback, 2007).

Por otro lado, se encuentran los antivirales de segunda generación, los inhibidores de la neuraminidasa, la cual es la enzima que permite la liberación del virus desde la célula infectada, y favorece su diseminación. Entre los inhibidores de la neuraminidasa se encuentran los compuestos oseltamivir y zanamivir, que han demostrado inhibir la neuraminidasa y ser efectivos en el tratamiento de la influenza A/H1N1.

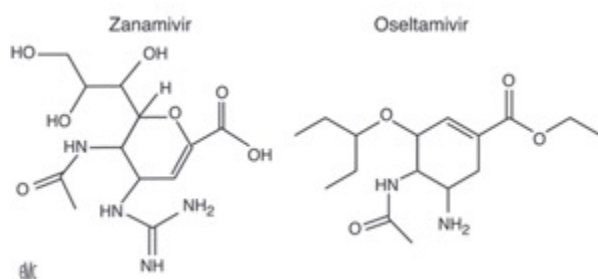


Figura 4. Estructura química de antivirales inhibidores de Neuraminidasa: Zanamivir y Oseltamivir (Deback, 2007).

El zanamivir es un análogo del ácido siálico y el oseltamivir inhibe la actividad sialidasa de la neuraminidasa viral (NA), compitiendo por la unión con el sitio activo de la NA. Sin embargo, en estos antivirales también han reportado efectos secundarios tales como el vómito, náuseas, dolor abdominal, diarrea, entre otros síntomas. Tomando en cuenta que el uso masivo de estos inhibidores de neuraminidasa a raíz de la pandemia ha preocupado la aparición de efectos adversos, así como la resistencia a estos fármacos. En consecuencia, existe una necesidad de identificar una nueva generación de antivirales.

Las plantas son consideradas una de las fuentes más importantes en el ecosistema, en donde un 40% del material vegetal es utilizado como fuente para medicamentos modernos. El conocimiento empírico basado en los conocimientos etnobotánicos junto con el fraccionamiento y el aislamiento biodirigido, tiene un gran potencial en la identificación de nuevos antivirales que podrían usarse contra el virus de la influenza A H1N1. En 1997 la OMS introdujo los recursos medicinales tradicionales, ya que el uso de las plantas es una de las formas de la medicina tradicional más universal y cultural, dando lugar a numerosas compañías privadas y corporaciones, que realizan investigación sobre compuestos activos, así como el desarrollo y formulaciones farmacéuticas a partir de extractos vegetales. Hoy en día existen numerosos extractos con actividad antiviral siendo de origen vegetal. El principio activo, el cuál es el responsable de la acción contra el virus, es comúnmente detectado por tamizaje fitoquímico y actualmente estos recursos se limitan debido a la deforestación y los avances con la industrialización.

1.8 Ciclo de replicación

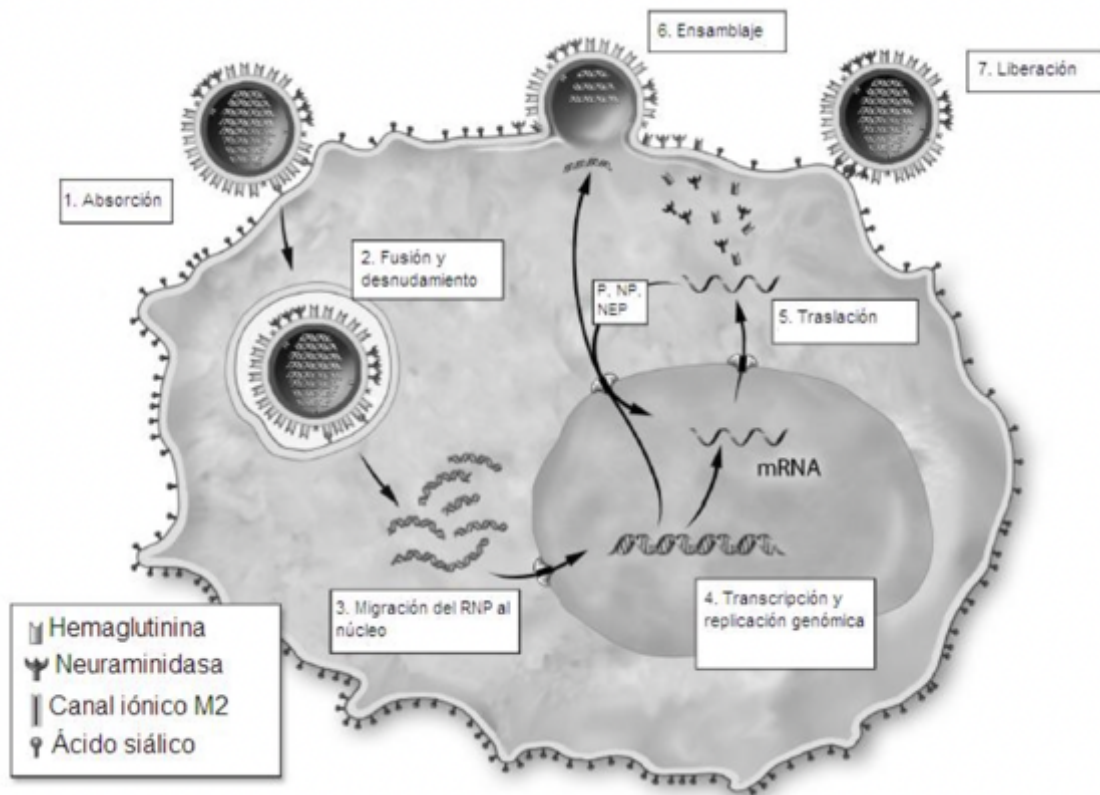


Figura 5. Esquema de ciclo de replicación (Beigei-Bray et al., 2008).

El ciclo de replicación del virus de la influenza A inicia cuando la Hemaglutinina (HA), una glicoproteína viral de superficie, se une al receptor celular de ácido siálico y el virus es transportado al interior de la célula en una vesícula endocítica. Posteriormente se da una acidificación en el endosoma lo que provoca la fusión de la membrana viral y el endosomal, así como un flujo de protones a través del canal iónico M2. Generando la disociación de ribonucleoproteínas (RNPs) el cual es un conjunto de moléculas que contienen proteínas y ARN) de la proteína matriz M1 y su liberación en el citoplasma. El siguiente paso se da cuando la RNP se transporta al núcleo, donde el complejo de la polimerasa viral realiza la transcripción y replicación del genoma. Posteriormente el ARNm resultante se transporta al citoplasma para su traducción a proteína. La producción de nuevos componentes de la proteína NP es transportada de regreso al núcleo para asociarlo con los nuevos segmentos de genoma; la salida de los nuevos RNPs es facilitada por las proteínas NS2 (NEP). Mientras que la superficie de las proteínas HA, Neuraminidasa (NA) y M2 se procesan en el retículo endoplásmico (RE), son glicosiladas en el aparato Golgi y se transportan a la membrana celular. Por último el ensamblaje de los viriones es realizado como la asociación entre los RNPs y la proteína M1 con las colas citoplasmáticas de la NA y HA. Donde la NA

corta los enlaces de ácido siálico, lo que libera al virus de la célula huésped (Das *et al.*, 2010; Beigei *et al.*, 2008).

1.9 Ensayo biodirigido: actividad anti-neuraminidasa

La neuraminidasa es una de las enzimas claves para la propagación viral en la célula huésped, por lo que es un blanco de estudio empleado para la búsqueda de nuevos antivirales. Se han desarrollado varios métodos para evaluar la actividad de la neuraminidasa y evaluar la eficacia de los inhibidores de la neuraminidasa. En estos procedimientos, el ácido 2'-O- (4-metilumbeliferil) -N-acetilneuramínico (4-Munana) se utiliza a menudo como sustrato. En estos ensayos basados en enzimas, el 4-Munana se escinde por la acción de la neuraminidasa, y el producto fluorogénico, donde el 4-metilumbeliferona (4-Mu), se libera y se cuantifica fluorimétricamente. En general, los ensayos de inhibición de neuraminidasa se llevan a cabo mezclando los compuestos de prueba con la enzima neuraminidasa (ya sea la enzima recombinante o la suspensión de virus); la mezcla se incuba y luego se agrega 4-Munana. Después de un tiempo de incubación adecuado a 37°C (vide infra), la reacción se termina añadiendo una solución de parada. Posteriormente la intensidad de la fluorescencia de 4-Mu se mide utilizando una longitud de onda de excitación de 350 a 360 nm y monitoreando la emisión a 450 a 460 nm. La cantidad de 4-Mu liberada es inversamente proporcional a la actividad inhibidora de la especie en consideración.

En el 2019, Jang y colaboradores realizaron un estudio en donde comprobaron que los extractos etanolicos de *Geranii herba*, así como sus componentes inhiben la actividad neuraminidasa en el virus de influenza A H1N1, H3N2 e Influenza tipo B. Tambien se reporto el uso de esta metodología de inhibición de la neuraminidasa proveniente de *Clostridium perfringens*, probando que los dimeros de naftoquinonas obtenidas de *L. eythorhizon* podrian ser usadas en un tratamiento prometedor contra el virus de la influenza (Yuan *et al.*, 2014).

2. Justificación

La influenza es una enfermedad ocasionada por un virus de ARN de una sola cadena. Los virus de influenza se clasifican en A, B y C, siendo el del tipo A el de mayor importancia para el hombre por su alta capacidad de mutación y recombinación genética. Se estima que a nivel mundial 500 millones de personas (7.14% de la población total) se enferman de influenza, ocasionando entre 3 y 5 millones de casos severos y de 250 a 500 mil defunciones cada año.

Desde 1997 la Organización mundial de Salud (OMS) aprobó el empleo de plantas medicinales y medicamentos herbolarios con actividades biológicas, tales como: antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, entre otras.

En el caso de la influenza, la capacidad de los virus de mutar y dar lugar a nuevos agentes infecciosos capaces de evadir la respuesta de nuestro sistema inmune, así como generar resistencia a los antivirales comerciales, apremia la constante búsqueda de nuevos tratamientos más efectivos y con escasos efectos secundarios. *Erythrostemon yucatanensis* es una especie vegetal con propiedades antivirales contra virus de influenza resistentes a oseltamivir, en donde aún se desconoce el o los componentes antivirales presentes en sus partes vegetales de hojas e inflorescencias, en especial los que actúan a nivel neuraminidasa, siendo el objetivo de la presente investigación.

3. Pregunta de investigación

¿Las particiones y fracciones obtenidas de los extractos metanólico de hoja y flor de *Erythrostemon yucatanensis* contienen metabolitos secundarios con actividad anti-neuraminidasa?

4. Objetivo General

Evaluar la actividad anti-neuraminidasa de extractos de hoja y flor de la especie vegetal *Erythrostemon yucatanensis* distribuida en la localidad de Sierra Papacal, Yucatán.

5. Objetivos Particulares

5.1 Aislar y purificar metabolitos mayoritarios con actividad anti-neuraminidasa en extractos de hojas e inflorescencias de *Erythrostemon yucatanensis* colectadas en Sierra Papacal.

5.2 Caracterizar los compuestos mayoritarios que cuentan con actividad anti-neuraminidasa presentes en los extractos de hoja y flor de *Erythrostemon yucatanensis*.

Capítulo II. Materiales y Métodos

2.1 Estrategia experimental

Los extractos metanólicos de *E. yucatanensis* fueron obtenidos previamente a partir de muestras colectadas en la localidad de Sierra Papacal, colectados en el mes de junio del 2018 por el M.C Ernesto Canto (Instalaciones de CICY en el parque Científico y Tecnológico de Yucatán ubicado en Sierra Papacal). Esta colecta dio lugar a la obtención de 1264 g de material vegetal de hoja y 560 gr de inflorescencias, las cuales fueron secadas en un horno a temperatura no mayor a 42°C, posteriormente el material vegetal fue molido, pesado y extraído con MeOH. El material extraído fue preservado en refrigeración a 4°C hasta su análisis correspondiente.

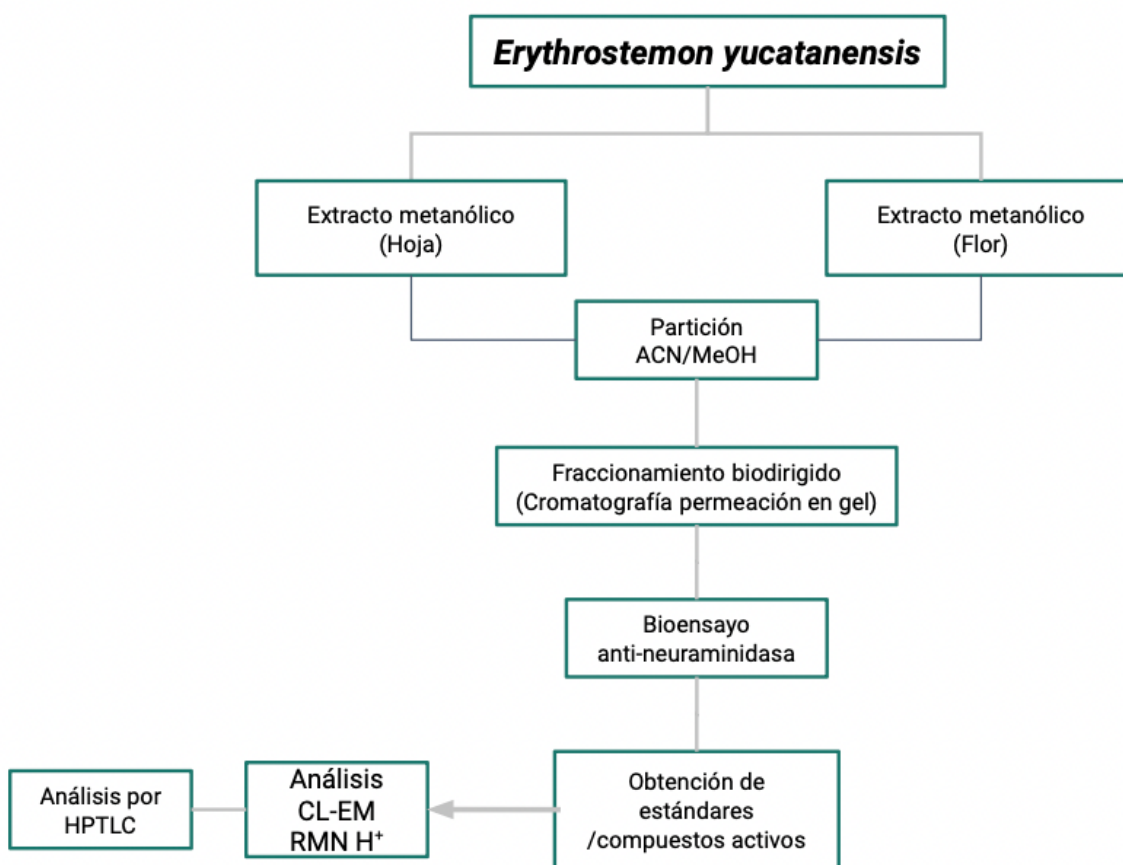


Figura 6. Esquema general de estrategia experimental.

2.2 Metodología experimental

2.2.1 Material y equipo

Para la metodología que se empleó en la extracción del material vegetal fueron necesarios disolventes de grado industrial destilados en el laboratorio. Las hojas se molieron en una licuadora comercial. La eliminación del disolvente del extracto metanólico y las obtenidas en partición líquido-líquido con ACN se realizan en un rotavapor marca Buchi R-151. Las muestras obtenidas se procesaron en una balanza analítica marca OAHUS PA 114C. Para el análisis de las placas cromatográficas se utilizó el revelado con ácido sulfúrico al 5% y la visualización de los componentes fue en una cámara de UV 245 - 365 nm (Chromato-Vue C-75). Para el fraccionamiento de los extractos se utilizó una columna cromatográfica líquida al vacío, así como sílica gel (malla 60-200) y finalmente los bioensayos se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano (Corning) y el equipo de lector de placas Cytation3 imagin reader BioTek. Finalmente en el análisis por HPLC donde se emplearon disolventes grado HPLC los cuales se obtienen comercialmente.

2.2.2 Obtención de material vegetal

Para las colectas mensuales de *E. yucatanensis*, estas se realizaron en el 2018 en las instalaciones del CICY en el parque científico de Yucatán, ubicado en la localidad de Sierra Papacal, donde se colectaron 1264 g de material vegetal (hojas) las cuales fueron previamente secadas en un horno a máximo 42°C; posteriormente se añadió 1.5 L de MeOH y se dejó reposar.



Figura 7. Procesamiento de material vegetal de *E. yucatanensis*.

2.2.3 Procesamiento de material vegetal y obtención de extractos metanólicos

El material vegetal posteriormente fue molido usando una licuadora comercial marca Oster, posteriormente se agregó MeOH a temperatura ambiente dejándolo reposar por 24 horas y repitiendo este proceso tres veces. Al término de cada extracción, se filtró y concentró a presión reducida en un rotaevaporador a 40°C obteniendo así el respectivo extracto metanólico. El material extraído será preservado en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis.

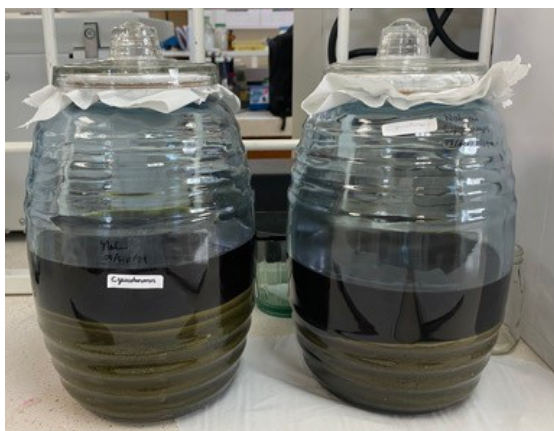


Figura 8. Extracción masiva con MeOH de *E. yucatanensis*.

2.2.4 Fraccionamiento

Se tomaron 1264 g del material obtenido previamente (seco y molido) y se sometió a extracción a temperatura ambiente dejándolo reposar en metanol (MeOH) durante 24 horas y se realizaron tres repeticiones sucesivas a cada individuo. Al finalizar cada extracción se filtró y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador a 40°C con una presión de 337 pa, obteniendo como resultado final de 38.1 g de extracto MeOH el cual fue preservado en refrigeración a 4°C, para su posterior análisis.

2.2.5 Partición líquido-líquido de extracto MeOH

Se tomaron los 38.1 g de extracto MeOH de *E. yucatanensis* y se sometió a una extracción líquido-líquido con un volumen total de 50 mL, utilizando 40 mL de Hexano y 10 mL de ACN:MeOH. La fase no polar (Hx) se separó empleando un embudo de separación y la fase polar ACN:MeOH fue sometida a una segunda extracción con Hx (mL). Este proceso se realizó 3 veces y sus fracciones correspondientes fueron secadas en rotaevaporador a una presión de 337 pa y transferidas a viales para preservarse en refrigeración.



Figura 9. Partición en embudo de separación con fases polar (MeOH/ACN) y no polar (Hx) de *E. yucatanensis*.

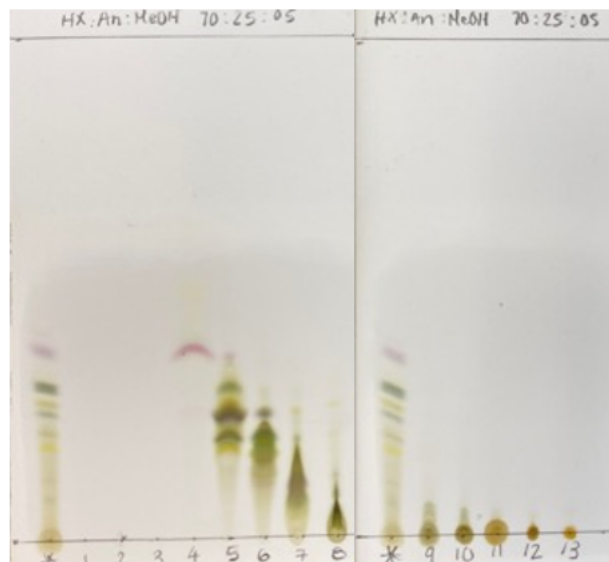
2.2.6 Fraccionamiento por Cromatografía Líquida al Vacío de extracto de ACN:MeOH

El extracto de hoja de ACN se fraccionó mediante cromatografía líquida al vacío (CLV) siguiendo metodologías de Canto-Ramirez y Cetina-Montejo (2018). Utilizando una fase estacionaria de sílica gel (13 cm de ancho por 5 cm de alto) y un sistema de gradiente de hexano-acetona (Hx/An) se obtuvieron 13 fracciones a las cuales se les asignó las claves: CYV1 a 13 (Figura 9). Posteriormente se realizó la de actividad anti-neuraminidasa con las fracciones más polares obtenidas, para identificar aquellas que tengan actividad y purificar los compuestos activos (Tabla 2).



Figura 10. Cromatografía líquida al vacío (CLV) con una fase estacionaria de sílica gel (13 cm de ancho x 5cm de alto) empleando un gradiente de Hx-An.

(A)



(B)

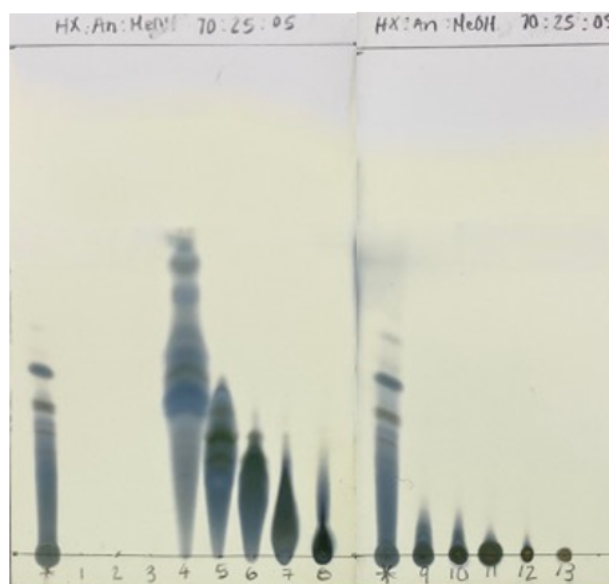


Figura 11. (A) CCD de fracciones obtenidas por CLV, donde se observa la presencia de compuestos con distinta polaridad en un sistema Hx:An:MeOH 70:25:05. Las fracciones CYV1-6 las de menor polaridad, CYV6-8 de mediana polaridad y CYV8-13 las de mayor polaridad, siendo estas últimas las de principal interés. **(B)** Fracciones CYV1 a 13 reveladas con ácido sulfúrico al 5%.

Tabla 2. Rendimiento de fracciones obtenidas por VLC.

Muestra	Cantidad (g)	Porcentaje (%)
Fracción 1	0.0057	0.0223
Fracción 2	0.0068	0.0266
Fracción 3	0.0045	0.0176

Fracción 4	0.0318	0.1247
Fracción 5	0.2627	1.0301
Fracción 6	0.4589	1.7996
Fracción 7	0.4417	1.7321
Fracción 8	0.7001	2.7454
Fracción 9	0.3513	1.3776
Fracción 10	0.4173	1.6364
Fracción 11	7.5671	29.6749
Fracción 12	2.0818	8.1639
Fracción 13	0.0298	0.1168

Tabla 2.1 Rendimiento de fracciones obtenidas de CYV-12 (500 mg).

Fracción	Cantidad
CYS-A	34.9 mg
CYS-B	27.6 mg
CYS-C	39.2 mg
CYS-D	24.7 mg
CYS-E	212.9 mg
CYS-F	6 mg
CYS-G	35.6 mg
CYS-H	22.4 mg
CYS-I	15.3 mg
CYS-J	14.2 mg
CYS-K	8 mg
CYS-L	5.2 mg
CYS-M	1 mg
CYS-N	1.5 mg

2.3 Ensayo de inhibición de la enzima neuraminidasa: actividad anti-neuraminidasa

Para el ensayo de actividad anti-neuraminidasa se empleó la metodología descrita por Kongkamnerd (2011) con ligeras modificaciones, donde el extracto metanólico se concentró y se disolvió con solventes orgánicos en distintas concentraciones a analizar (400, 200, 100, 50, y 25 µg/mL). La fracción utilizada fue la CY-V12, la cual se purificó por cromatografía en permeación de gel. Para dicho ensayo se usó 4-Mu, y 2-N-morfolino-etanosulfónico (Mes) y glicina de Sigma. 4-Munana (2'-O-[4-metilumberiferil-N-ácido acetilneuramínico) adquirida comercialmente. Es importante mencionar que para este bioensayo se utiliza la enzima NA producida por el organismo bacteriano *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) (N2876-25U Lote #SLCD5639).

En general, los ensayos de inhibición de neuraminidasa se llevan a cabo mezclando los compuestos de prueba con la enzima neuraminidasa (ya sea la enzima recombinante o la suspensión de virus); la mezcla es incubada por 5 minutos utilizando como tampón una solución de acetato de sodio a 50 mM, ajustada a pH 5,0 con HCl y posteriormente se agrega 4-MUNANA. En este bioensayo se registra la intensidad de la fluorescencia de 4-MU, la cual se mide utilizando una longitud de onda de excitación de 350 - 360 nm y monitoreando la emisión a 450 - 460 nm. La cantidad de 4-MU liberada es inversamente proporcional a la actividad inhibitoria del extracto o compuesto en análisis.

Tabla 2.2 Volúmenes utilizados en el bioensayo anti-neuraminidasa

Reactivo	Concentración	Volumen
Acetato de Sodio	5 mM	110µl
Neuraminidasa	0.2 U/ml	10µl
Compuesto / Extracto	400 - 25 µg/ml	10µl
4- MUNANA	0.5 mM	20µl
	V_{Total}	150µl

Para la validación del ensayo, se utilizó como control positivo de la inhibición de neuraminidasa la Quercetina, la cual tiene un valor de IC₅₀ aproximado a 21µM.

Para el análisis de los resultados obtenidos se procedió a un análisis estadístico utilizando el programa OriginPro8 y el cálculo del IC₅₀ se realizó utilizando un ajuste no lineal con el

programa GraphPad, reportando los resultados con su media. Los datos resultan ser significativos utilizando $p < 0.05$, empleando el método ANOVA.

2.4 Cromatografía por permeación de gel de extractos MeOH de hojas

Se realizó un fraccionamiento de la fracción activa con clave CYV12 por medio de una columna de permeación en gel, la cual se empacó con Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). Dicha fracción se sometió a una cromatografía de permeación en gel utilizando 500 mg de la muestra CYF12 en una columna de 30 cm de altura y un diámetro de 1.5 cm y un sistema de metanol 100% para la separación por tamaño de partícula. Se obtuvieron 107 nuevas fracciones de aproximadamente 2 ml cada una, las cuales fueron reunidas en base a la similitud de las bandas entre las fracciones que se observaron en la cámara de revelado con una longitud de onda de 254 y 365 nm, obteniendo un resumen total de 14 fracciones las cuales fueron asignadas con la clave CYS-A a CYS-N.

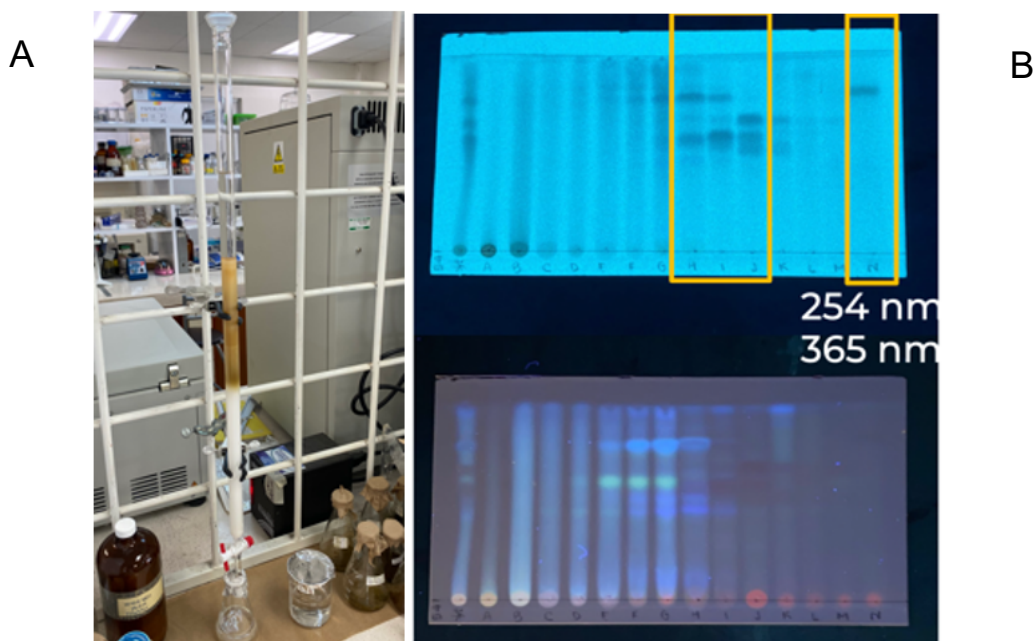


Figura 12. (A) Cromatografía por permeación de gel, muestra CYV12 (500 mg) en un sistema metanol 100%. (B) CCD de las fracciones obtenidas asignadas con clave CYS-A a CYS-N, reveladas en cámara UV en longitudes de onda de 254 nm y 365 nm.

Analizando los resultados obtenidos se decidió trabajar con las fracciones con clave CYS-J y CYS-N, ya que se pudo observar en la placa de CCD que son menos complejas en comparación con las demás fracciones. Posteriormente se procedió a su purificación por medio de cromatografía de permeación en gel. La purificación de esta fracción (CYV12) se realizó por triplicado para aumentar el rendimiento de las fracciones de interés, en donde se obtuvo un total de 4.4 mg de muestra CYS-N. Posteriormente se realizó nuevamente una cromatografía de permeación en gel con 52.5 mg de la muestra con clave CYS-J en una columna de 30 cm de altura y un diámetro de 1.5 cm, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y un sistema gradiente de EtOH 100 % para la separación por tamaño de partícula y las fracciones fueron recolectadas en tubos de ensayo con una cantidad de 2 mL aproximadamente.

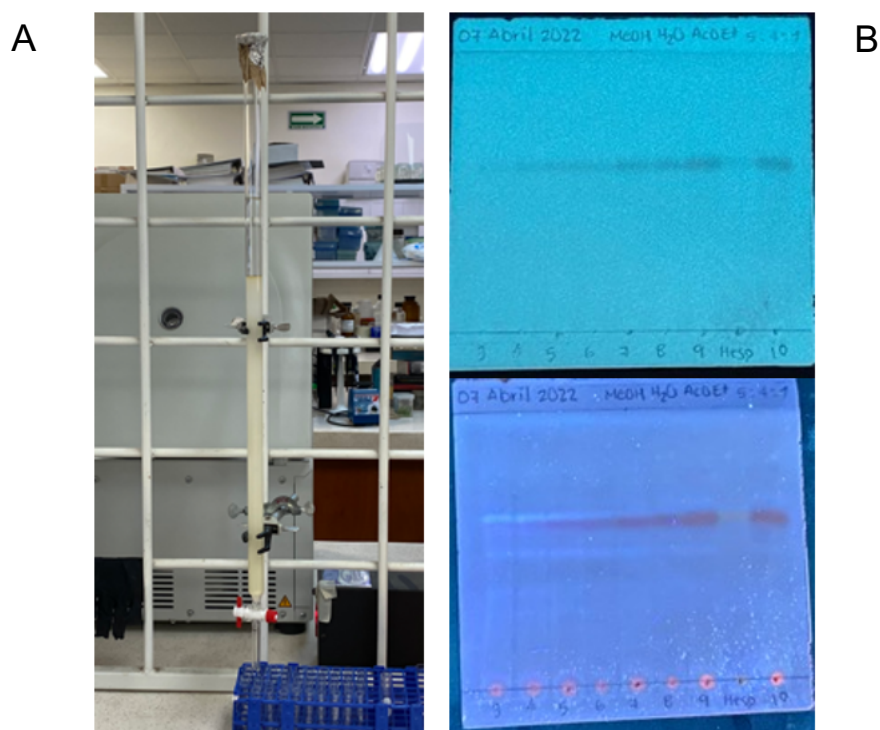


Figura 13. (A) Cromatografía por permeación en gel con muestra CYS-J (52.5 mg) en un sistema EtOH 100%. (B) Placas CCD de las fracciones obtenidas asignadas con clave CYSJ-1 a CYSJ-10 en comparación con un estándar obtenido en el laboratorio de productos naturales del flavonoide conocido como Hesperidina, corrido en un sistema de MeOH:H₂O:AcOEt 5:4:1, revelada en cámara UV con longitudes de onda de 254 nm y 365 nm.

2.4.1 Cromatografía por permeación en gel de extractos MeOH de inflorescencias

A partir de los extractos metanólicos de inflorescencias de *E. yucatanensis* se procedió a la purificación utilizando cromatografía de permeación en gel con una columna de 52 cm de altura y 1 cm de diámetro empacada con Sephadex LH-20, con un sistema gradiente MeOH:H₂O 1:1 hasta MeOH 100% para la fracción con clave CYFB6 con una cantidad de 70 mg, y posteriormente se purificó la segunda fracción obtenida de las inflorescencias con clave CYFB7 con una cantidad de 35.6 mg de muestra en un sistema MeOH 100%, donde se reportan los siguientes resultados obtenidos.

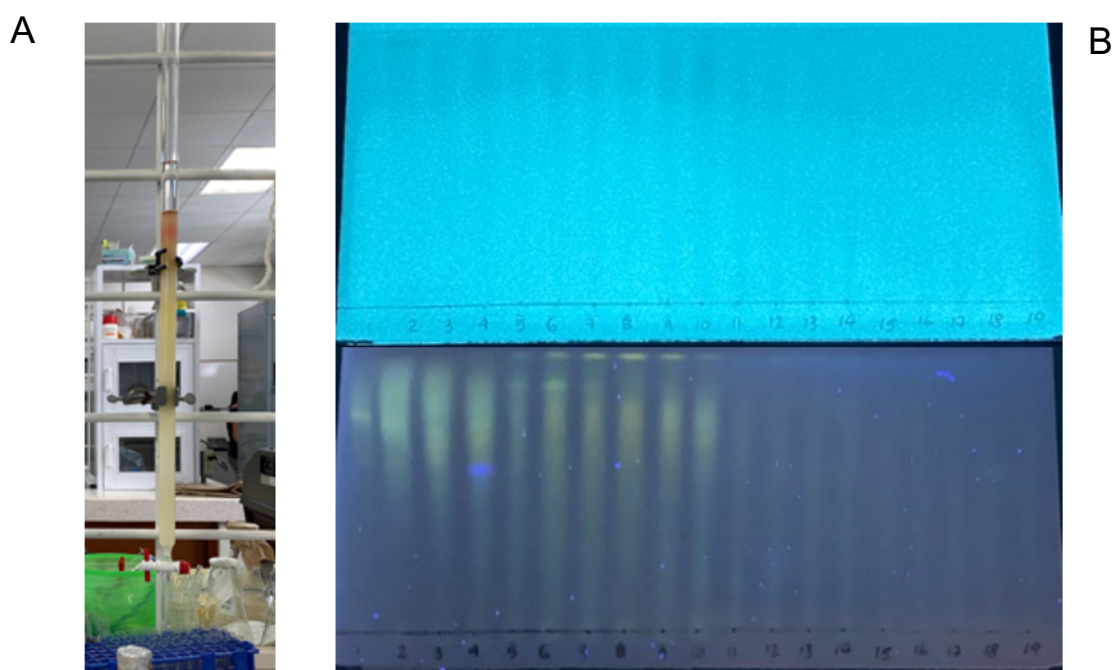


Figura 14. (A) Cromatografía por permeación de gel con muestra CYFB6 (70 mg) en un sistema gradiente MeOH:H₂O 1:1 hasta MeOH 100%. (B) Placas CCD de fracciones obtenidas asignadas con clave CYFB-1 a CYFB-19, reveladas en cámara UV en longitudes de onda de 254 nm y 365 nm.

Tomando en cuenta la polaridad de las fracciones obtenidas debido al sistema de gradiente utilizado (MeOH:H₂O) las fracciones fueron sometidas a una liofilización, para eliminar el residuo de agua que pudieran contener.

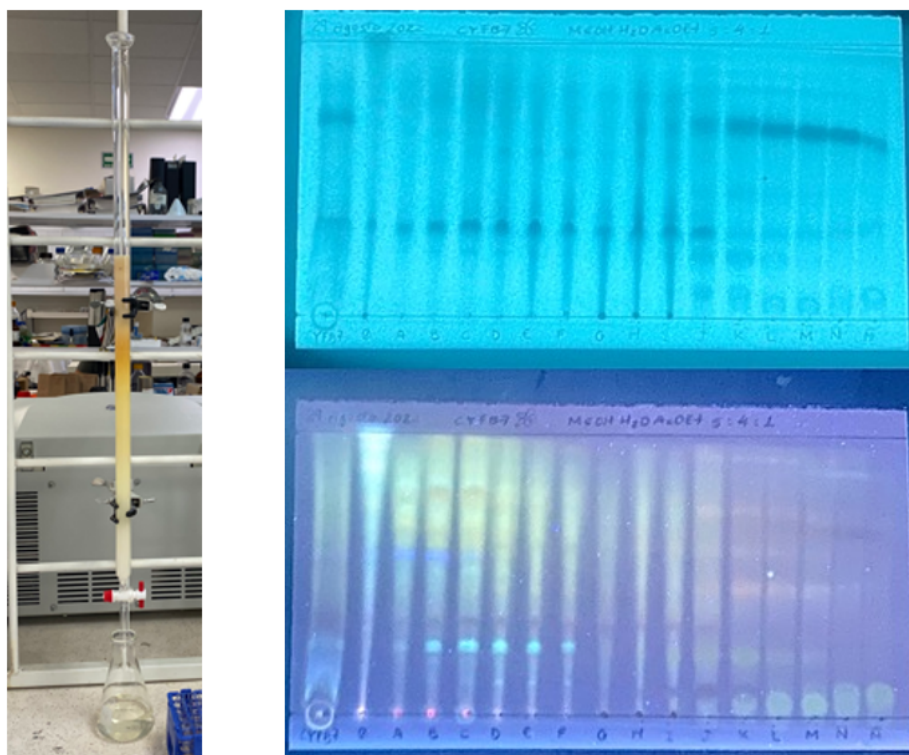


Figura 15. (A) Cromatografía por permeación de gel con muestra CYFB7 (35.6 mg) en un sistema gradiente MeOH 100%. (B) Placas CCD de fracciones obtenidas asignadas con clave CYFB7-A a CYFB7-Ñ, reveladas en cámara UV en longitudes de onda de 254 nm y 365 nm.

2.5 Análisis cromatográfico por CG/EM y CL/EM de la subfracción de hoja de *E. yucatanensis*.

La cromatografía es un método físico de separación en la cual los compuestos a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales se encuentra en reposo (fase estacionaria) y la otra (fase móvil) se encuentra en movimiento en una dirección determinada. Este método resulta ser de gran utilidad para analizar extractos crudos y fracciones, así como para el aislamiento y purificación de compuestos que se encuentren en los extractos. Para el análisis por CG/EM de la subfracción obtenida por cromatografía de permeación en gel con clave CYS-N se empleó un equipo de cromatografía de gases Agilent Technologies modelo 6890 Network acoplado a espectrometría de masas Agilent Technologies modelo 5975B ínter MSD controlado por una computadora HP. Se usó una columna no polar de 25 m de longitud, 0.320 mm de diámetro y 0.52 μm de espesor con una temperatura inicial de

120 ° C durante 2 minutos hasta llegar a 300°C durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron al 5% en disolución con MeOH y se inyectó 1 µL de la solución a una temperatura del inyector de 50 °C. Por otro lado, para el análisis por CL/EM de la subfracción obtenida por la cromatografía de permeación en gel, se mandó a analizar la subfracción con clave CYS-N debido a que se pudo observar en sus análisis por CCD que esa fracción podría ser un compuesto purificado.

Los espectros de masas fueron generados con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA) con un sistema de ionización HESI-II, con una fuente de gas configurada a 60 con un gas auxiliar a 20 y un capilar a temperatura de 310 °C, voltaje de 4 kV en modo positivo. Los solventes utilizados fueron de grado espectrometría de masas. Las muestras fueron resuspendidas en metanol y suplementadas con 0.1 % de ácido fórmico. La fragmentación CID (Collision Energy Dissociation) se utilizó para fragmentar los iones con Helio. Su resolución en el analizador de masas de Orbitrap para la adquisición de espectros MS fue de 24000 y para los espectros MS/MS de 12000. Posteriormente su separación cromatográfica fue llevada a cabo en una columna Hypersil GOLD aQ (100 x 2.1 mm i.d., 3 µm) con un gradiente de 0.1% de ácido fórmico en agua (solvente A) y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B) fue empleado durante la separación con el sistema UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA).

Se empleó un flujo de 0.2 mL/min y un volumen de inyección de 2 µL. El gradiente consistió en la variación de la proporción del solvente B desde 5% hasta 20% durante 1 min, y luego hasta 100% en 10 min, se mantuvo en 100% por 0.5, después bajo a 10% en 1 min, manteniéndose en 10% por 11.7 min. El procesamiento de los espectros se realizó con el programa MassFrontier.

Capítulo III. Resultados y Discusión

3.1 Rendimiento de extractos metanólicos

A partir de 1,2674 g de hoja seca se obtuvo 38.1 g de extracto MeOH con un rendimiento muy bajo, del 3.01%. Este extracto fue fraccionado como se indica en la Tabla 8, dando un mayor rendimiento la fracción de acetonitrilo, la cual se continuó fraccionando hasta la purificación de los componentes de interés.

Tabla 3. Rendimiento de fracciones obtenidas de extractos metanólicos de hojas.

Muestra	Cantidad (g)	Porcentaje (%)
Material vegetal (hojas)	1264	
Extracto MeOH	38.1	3.01
Fracción hexánica (Hx)	11.6	30.44
Fracción de acetonitrilo (ACN)	26.5	69.55

3.2 Caracterización espectroscópica

3.2.1 Análisis de perfil másico obtenido por CL/EM de las subfracciones CYS-N y CYS-H de *E. yucatanensis*.

Los espectros de masas de las muestras CYS-N y CYS-H se generaron con el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Los iones moleculares de las muestras CYS-N y CYS-H, son de la forma $[M + H]^+$. Por tanto, cada señal del espectro másico corresponde a un ion molecular cuya masa será la del compuesto más una unidad ("Sonda H-ESI. Guía del usuario," 2008).

En el siguiente apartado se muestran los espectros de masas de algunos de los picos principales que se obtuvieron para las muestras CYS-N y CYS-I, si bien, es importante mencionar que se requieren de datos más precisos como RMN ^1H , RMN ^{13}C y técnicas bidimensionales, para llegar a la identificación completa de la estructura del compuesto propuesto. Sin embargo, el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap con un sistema de ionización HESI-II, acoplado a un cromatógrafo de líquidos nos permite obtener datos importantes, como son el peso molecular y el tipo de fragmentación característico de cada compuesto, así como el número de componentes que se encuentren presentes en la muestra; sin embargo, muchas veces es posible observar picos que no son fácilmente identificables ya que posiblemente se deban a impurezas debido a la matriz misma del

extracto o bien a la presencia de la formación de artefactos al momento de ionización de la muestra.

El análisis por CL-EM de la fracción CYS-N indicó la presencia de 7 picos con tiempos de retención de 0.90, 1.11, 7.27, 7.44, 7.50, 7.56, 7.58 y 7.67 minutos, en donde se muestra en el espectro másico las señales que tuvieron mayor coincidencia con el compuesto propuesto por la base de datos. El compuesto con tiempo de retención de 0.90 – 1.11 minutos tuvo un ión molecular a 657.06 $[M+Na]^+$ que, de acuerdo con su patrón de fragmentación corresponde a corilagina, un ligno tanino. De manera general, los glucósidos de lignano pierden fácilmente el residuo de azúcar para dar lugar al lignano original o bien una fracción del mismo, ejemplo de ello es el fragmento observado a m/z 393.07. El espectro también nos muestra un fragmento en donde ocurrió una adición de $[MeOH]$ el cual corresponde al pico de m/z 497.08; entre otros fragmentos identificados están el fragmento a m/z 365.06 y m/z 303.01. Estos datos sugirieron la presencia del lignotanino corilagina y de acuerdo con su peso molecular, le corresponde la fórmula molecular $C_{27}H_{24}O_{18}$ (Figura 16).

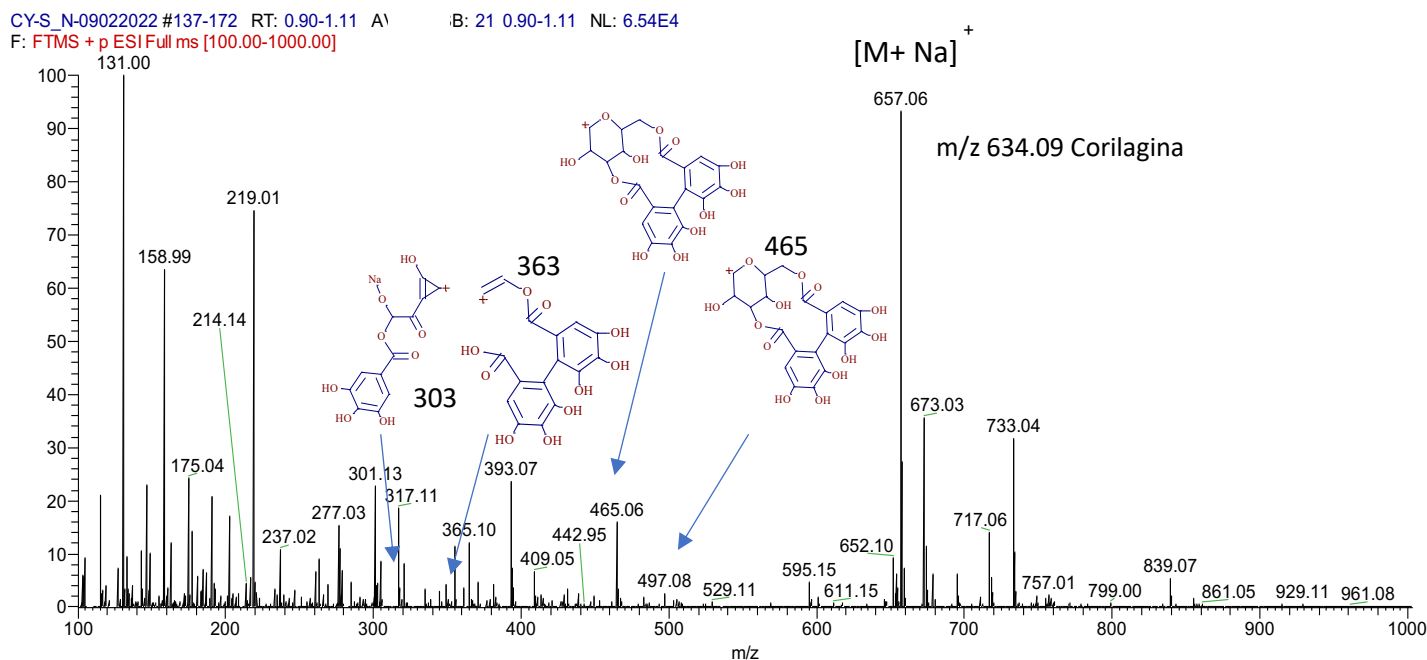


Figura 16. Perfil másico de la muestra CYS-N, en donde se observa el fragmento a m/z de 657.06 $[M+Na]^+$ correspondiente a Corilagina.

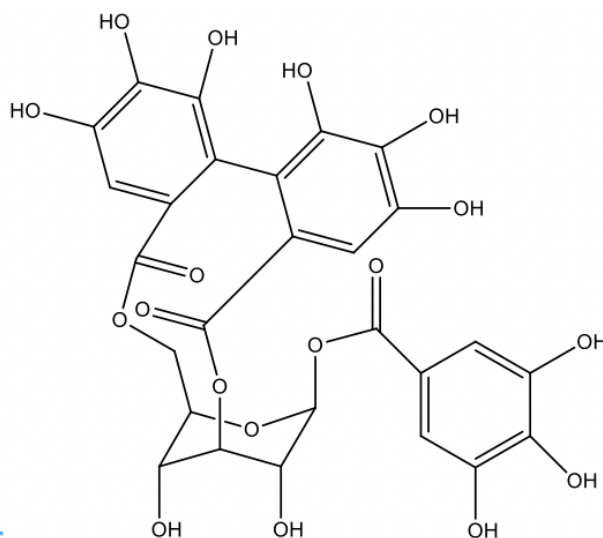


Figura 17. Estructura de Corilagina.

La corilagina es un compuesto perteneciente a los elagitaninos, que son compuestos que se componen de un grupo galoilo y hexahidroxidifenoilo (HHDP) unidos a una glucosa. Este compuesto natural fue descubierto por Schmidt y colaboradores en 1951, aislado en *Caesalpinia coriaria*. También se ha reportado que la corilagina cuenta con una amplia gama de actividades biológica entre ellas sobresalen antibióticos, lactámicos, actividad antiviral, antimicrobiana y efecto antihipertensivo.

Por otra parte, la muestra CYS-I fue analizada obteniéndose el perfil másico en donde se observaron los siguientes fragmentos principales: un fragmento a m/z de 611.15 que corresponde a una ganancia de protón del ión molecular y un fragmento a m/z 449.10, lo cual nos indica pérdida de una molécula de ramnosa típico de flavonoides ramnoglicosilados; de acuerdo al ión molecular, el compuesto tiene una fórmula molecular de $C_{28}H_{34}O_{15}$ la cual sugiere la presencia de una flavona denominada Hesperidina (Figura 18). Sin embargo, se requieren realizar más análisis espectroscópicos para confirmar la identidad de este compuesto.

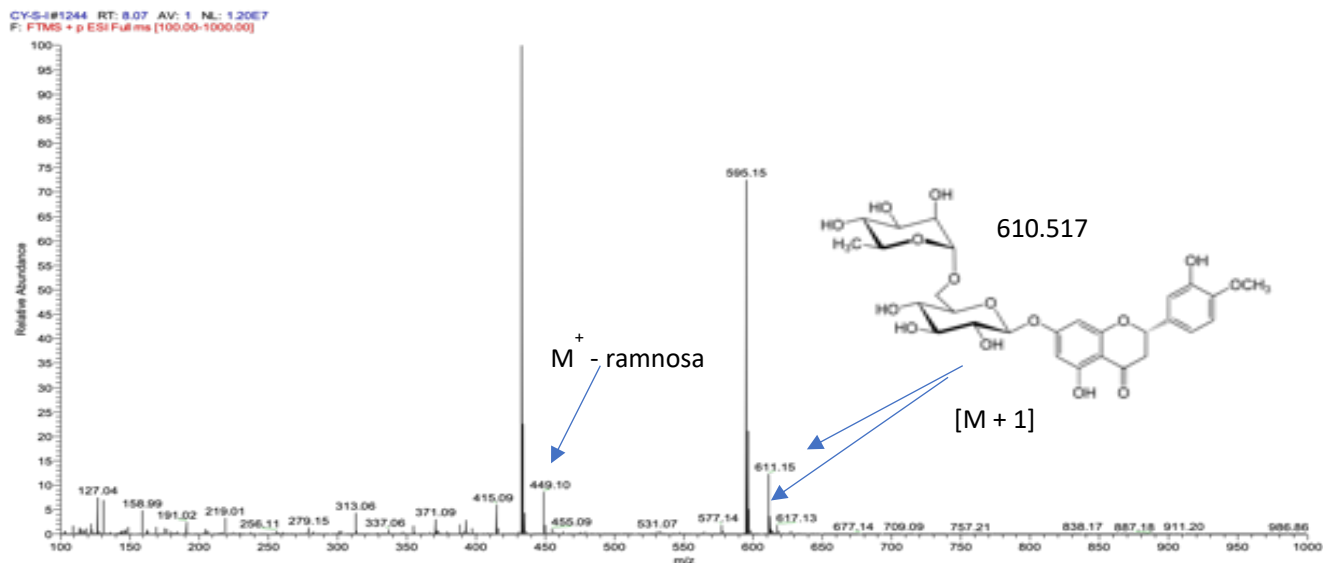


Figura 18. Perfil másico de la muestra CYS-H, en donde se observa la estructura de Hesperidina

3.2.2 Análisis espectroscópico RMN de CYS-N

Para el análisis de Resonancia magnética Nuclear (RMN), se utilizó un equipo marca VARIAN/AGILENT modelo Premium-COMPACT de 400 MHz con un campo magnético de 14.1 T. La muestra CYS-N (3.1 mg), fue disuelta en acetona deuterada realizando la obtención del espectro a temperatura de 50°C. En el espectro de protón se aprecian desplazamientos químicos típicos de protones en anillos aromáticos a δ 6.5 – 7.1, también se observa la presencia de protones oxigenados (OH) lo cual nos indica que hay presencia de compuestos fenólicos así como señales δ 3.5-4.2 característicos de protones de azúcar.

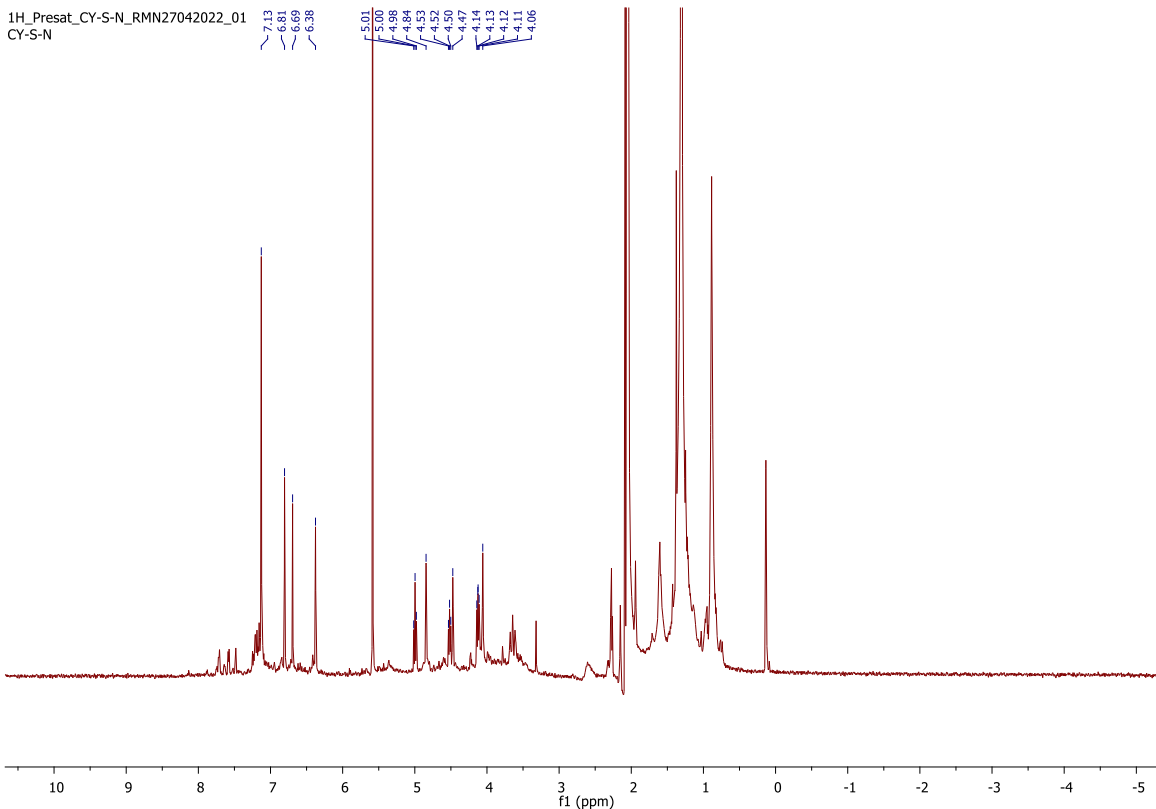


Figura 19. Espectro de RMN-¹H del compuesto activo con la estructura que coincide con el nombre de Corilagina disuelto con acetona-D₆ (600 MHz).

Al realizar una comparación entre ambos espectros se pudo corroborar que las señales identificadas corresponden a lo reportado por Yagi y colaboradores en 1974, que, en combinación con los datos recabados de espectrometría sugieren la presencia de corilagina.

Tabla 3.1 Comparacion de los datos de RMN – ¹H de Corilagina con lo reportado por Yagi *et al.*, 1974.

Posición	Compuesto CY-N RMN- ¹ H (600 MHZ Acetona- d ₆)	Corilagina RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO- d ₆)*
3	7.13 (s, 2H, CH)	δ 7.01 (s, 2H, CH)
4	6.69 (s, 1H)	δ 6.55 (s, 1H, CH)
5	6.38	δ 6.47
6	6.20 Glucosa	Glucosa δ 6.20 (d, 1H, J 7.0 Hz, CH)
7	4.53 (s, 1H,CH)	4.58 (s, 1H, CH)
8	4.47 (m, 1H, CH)	4.35 (m, 1H, CH)
11	4.14 (m, 1H, CH)	4.19n- 4.22 (m, 1H, CH)
13	4.06 (d, 1H, J 7 Hz, CH)	3.98 (d, 1H, J 7.0 Hz, CH)

*δ ppm

La corilagina es un compuesto perteneciente a los elagitaninos, que son compuestos que se componen de un grupo galoilo y hexahidroxidifenoilo (HHDP) unidos a una glucosa. Este compuesto natural fue descubierto por Schmidt y colaboradores en 1951, aislado en *Caesalpinia coriaria*, en donde se reporta que este compuesto contiene glucosa. También se ha reportado que la corilagina cuenta con una amplia gama de actividades biológica entre ellas sobresalen antibióticos, lactámicos, actividad antiviral, antimicrobiana y efecto antihipertensivo.

Anteriormente ya se habían estudiado otras plantas pertenecientes al género *Caesalpinia*, demostrando diversas actividades biológicas tales como anticonvulsivas, antiviral con el virus del herpes, adenovirus, entre otros. Sin embargo, no se había reportado anteriormente el aislamiento de estos compuestos: corilagina y hesperidina en *E. yucatanensis*, hasta el día de hoy.

3.3 Análisis de Concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀) de fracciones obtenidas por VLC.

La neuraminidasa (NA) es la glicoproteína transmembranal la cual está compuesta por cuatro subunidades idénticas (Air, 2012) y la segunda principal de superficie en los virus de influenza A y B. Sin embargo, no está presente en el tipo C. La principal función de esta glicoproteína es escindir los residuos terminales de ácido siálico que se encuentren en las superficies celulares y así liberar los viriones de la progenie, facilitando la liberación del virus de las células infectadas. (Bai et al., 2021). Hoy en día existen distintos ensayos enzimáticos donde se utilizan como sustratos derivados fluorescentes de ácido siálico, lo que permite analizar la actividad anti-neuraminidasa de manera eficiente y sin costos excesivos. En el presente trabajo de investigación se utilizó el 4-ácido4-metilumbeliferil-a-D-N-acetilneuramínico y la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* para el análisis de actividad anti-neuranimidasa en extractos y fracciones de *E. Yucatanensis*.

Se evaluaron las fracciones polares con clave CYV 9 a 12, preparando cada muestra a una concentración de 10 mg/mL, en donde se seleccionaron aquellas que disminuyeran la velocidad de reacción enzimática, considerándose candidatos a una posible actividad anti-neuraminidasa. En el siguiente apartado se observan los gráficos obtenidos de cada muestra analizada.

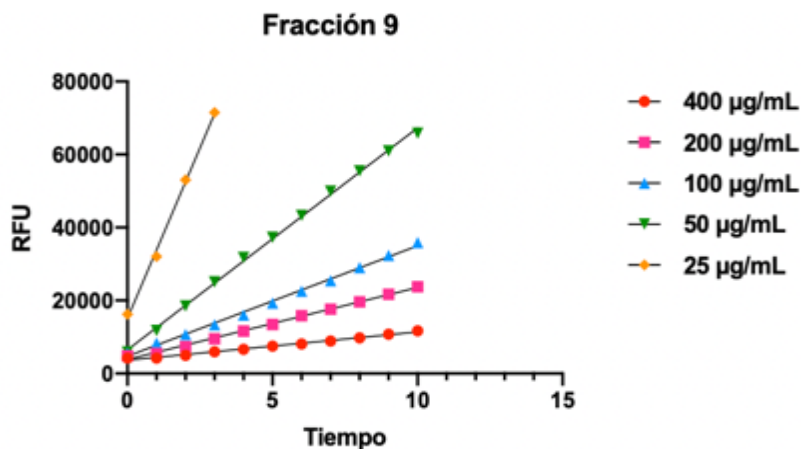


Figura 20. Gráfico de la actividad anti-neuraminidasa obtenida de la fracción CYV-9 con concentraciones de 400 a 25 µg/mL.

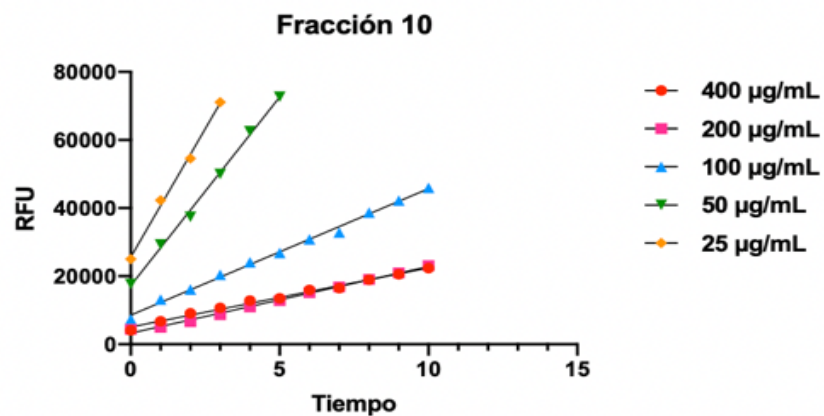


Figura 21. Gráfico de la actividad anti-neuraminidasa obtenida de la fracción CYV10 con concentraciones de 400 a 25 µg/mL.

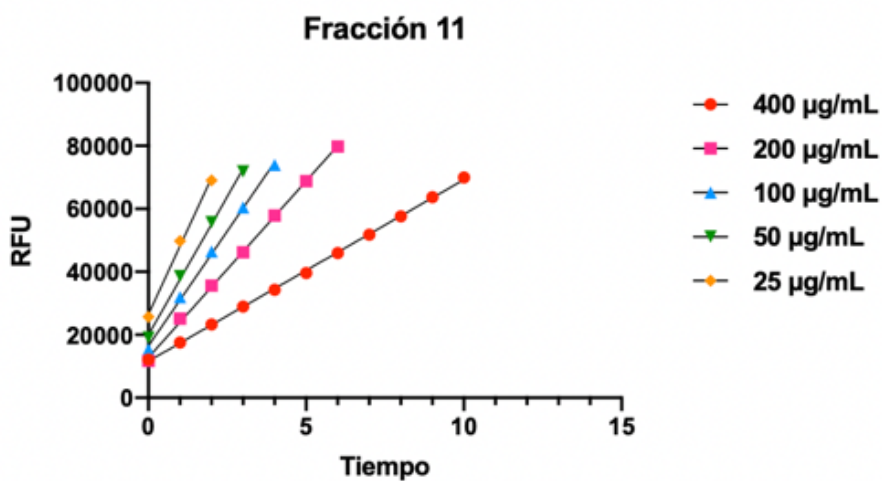


Figura 22. Gráfico de la actividad anti-neuraminidasa obtenida de la fracción CYV11 con concentraciones de 400 a 25 µg/mL.

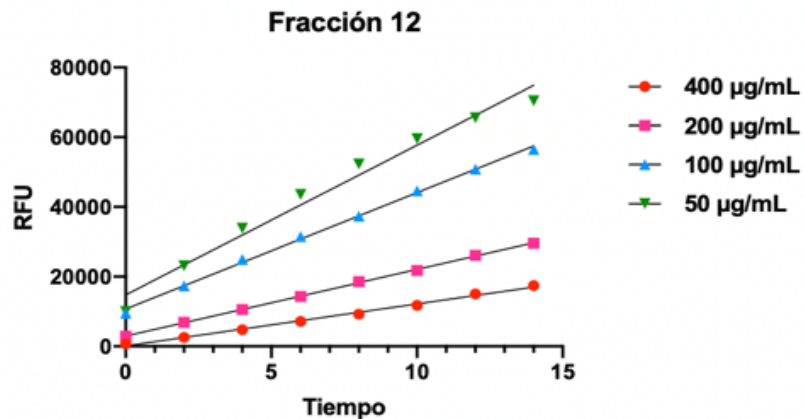
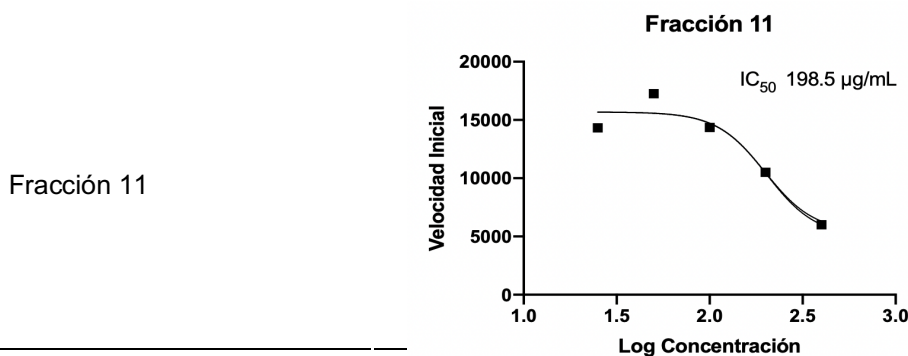
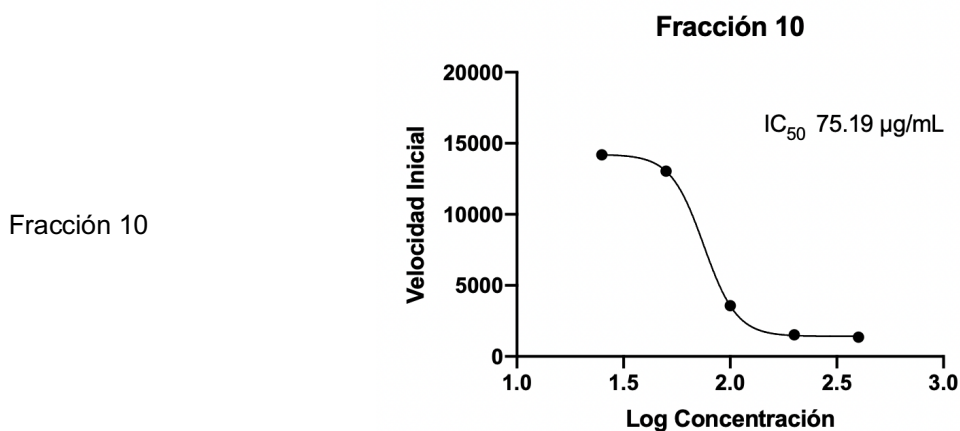
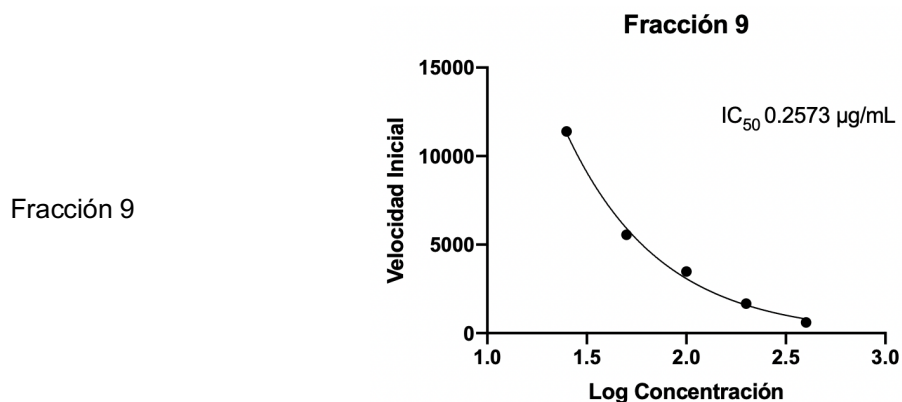


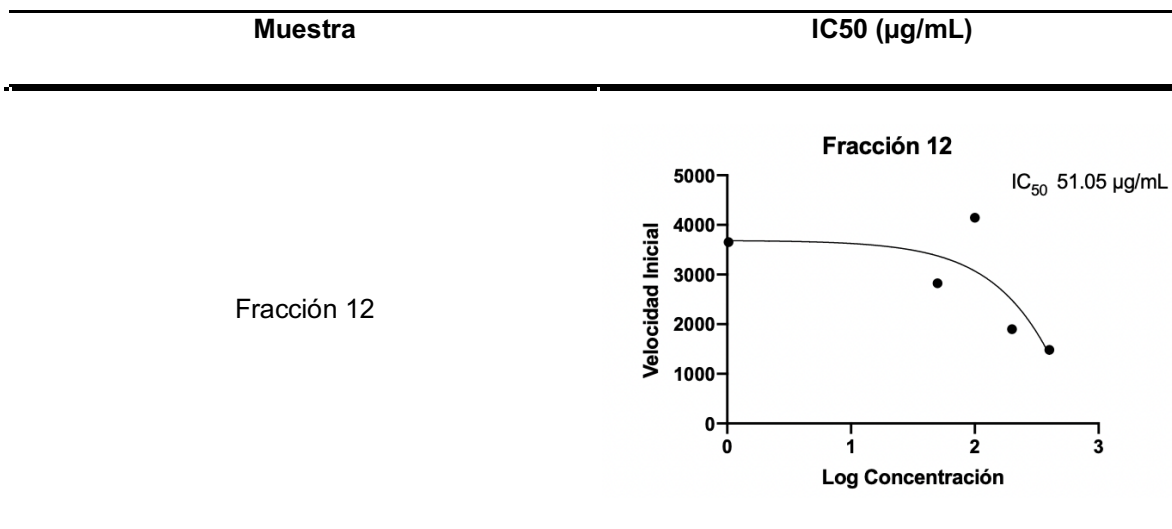
Figura 23. Gráfico de la actividad anti-neuraminidasa obtenida de la fracción CYV12 con concentraciones de 400 a 50 µg/mL.

Al realizar una comparación de los gráficos obtenidos de las fracciones más polares obtenidas por VLC del extracto metanólico de hoja de *E. yucatanensis* se observó que la fracción con mayor actividad inhibitoria de NA es la muestra con clave CYV12, ya que en el gráfico se observa más fuerte inhibición de la fluorescencia vs el aumento de las concentraciones analizadas. Posteriormente se calculó la concentración inhibitoria media obteniendo un resultado IC₅₀ de 100.6 µg/mL, por lo cual considerando este resultado del análisis de IC₅₀ y la cantidad de muestra, se procedió a la purificación de dicha fracción.

Tabla 3.2 Valores y gráficos de IC₅₀ de fracciones obtenidas por CLV de extracto de hoja de *E. yucatanensis*.

Muestra	IC ₅₀ (µg/mL)
Fracción 9	0.2573
Fracción 10	75.19
Fracción 11	198.5
Fracción 12	51.02





Es necesario analizar concentraciones más altas de las fracciones anteriores para obtener un valor significativo del IC₅₀, sin embargo, los valores de IC₅₀ fueron significativos para las fracciones 9, 10 y 12. También se observó un comportamiento similar entre las fracciones en cuanto a su dosis-respuesta, es decir la inhibición resulta ser dependiente a la dosis. Posteriormente se realizó el bioensayo para el análisis de las subfracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel de el extracto de hoja de *E. yucatanensis* con clave CYV12, siendo de interés las fracciones con clave CYS-I, CYS-J y CYS-N, ya que analizando las bandas observadas en las placas de CCD se observan pocos compuestos en esas subfracciones.

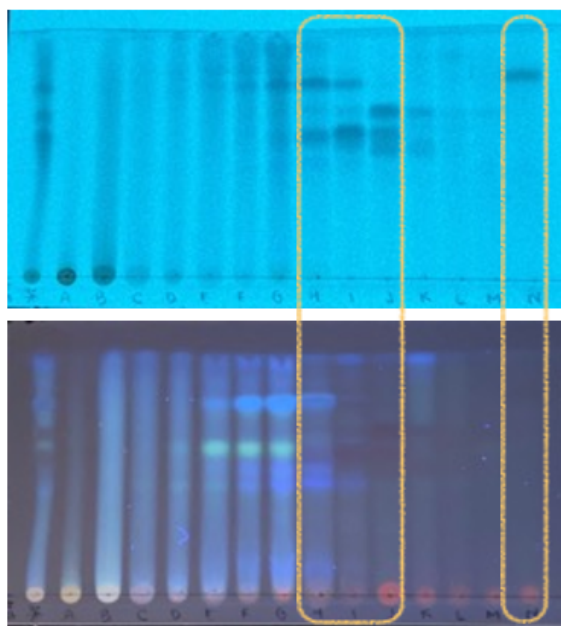
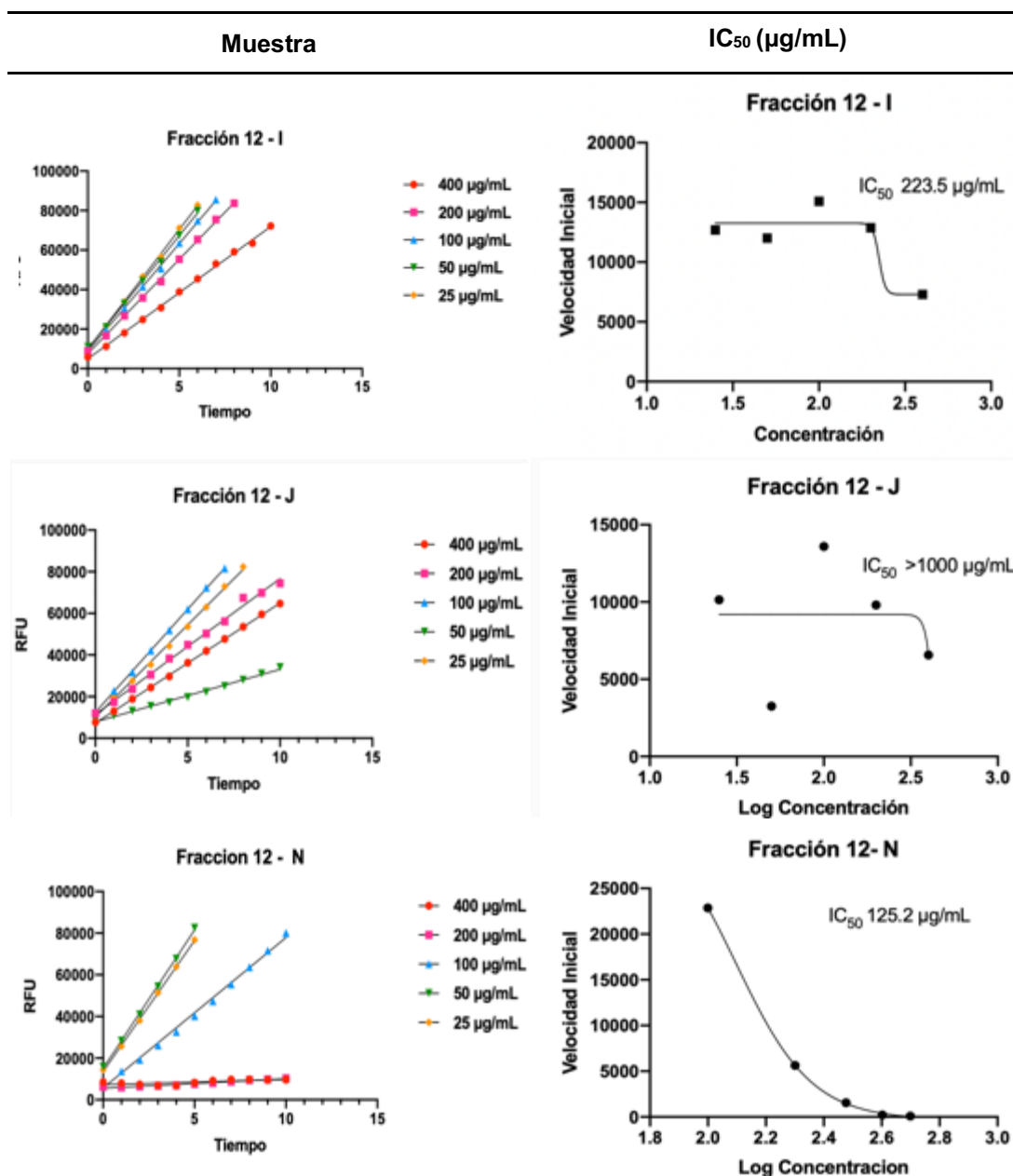


Figura 24. CCD de las fracciones obtenidas asignadas con clave CYS-A a CYS-N, reveladas en cámara UV en longitudes de onda de 254 nm y 365 nm

Tabla 3.3 Gráficos representativos de IC₅₀ de subfracciones obtenidas de la Fracción 12 (CLV).



Analizando los gráficos de la actividad anti-neuraminidasa de las subfracciones seleccionadas, llamó la atención el comportamiento de la muestra **CYS-N** en concentraciones de 400 a 25 µg/mL, donde se puede observar que a concentraciones > 100 µg/mL logra inhibir la fluorescencia; por otro lado en el gráfico del IC₅₀ se observa que la curva logra tener una tendencia sigmoideal, por lo que se propone un análisis con concentraciones más altas para confirmar el comportamiento dosis - respuesta de esta fracción.

Yeo y colaboradores (2015) reportaron que *Phyllanthus urinaria* L. contiene corilagina como el componente principal, el cual cuenta con un efecto antiviral contra el enterovirus. La corilagina es un compuesto perteneciente a los galotaninos, el cual está presente en una gran variedad de plantas, principalmente en *Dimocarpus longan* L. (*Sapindaceae*) (Li *et al.*, 2018), *P. urinaria* (Yeo *et al.*, 2015) y *Geranii Herba* (Jang, 2019). Se ha propuesto que la corilagina tiene potencial de inhibir la adsorción y la infección del SARS-CoV-2 en las células huésped humanas, convirtiéndolo en un potencial candidato de fármaco contra el COVID-19 (Yang *et al.*, 2021).

En el 2019, Jang y colaboradores realizaron bioensayos anti-neuraminidasa con extractos etanólicos de *Geranii Herba*, en donde pudieron identificar que este contenía como componente principal corilagina y reportaron un IC₅₀ de 34.0 µg/mL obtenido de dichos bioensayos, lo cual nos incentiva para seguir analizando más a fondo este compuesto, siendo un potencial candidato de inhibición en la replicación viral a nivel postratamiento.

3.3.1 Análisis de Concentraciones inhibitoria media (IC₅₀) de subfracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel.

Se evaluaron las subfracciones polares con clave CYV-12, preparando cada muestra a una concentración de 10 mg/mL como se describe anteriormente en el apartado 7.7, en donde se seleccionaron aquellas que tuvieran un comportamiento en cuanto a la disminución de la velocidad de reacción de la neuraminidasa, considerándose candidatos a una posible actividad anti-neuraminidasa. En el siguiente apartado se observan los gráficos obtenidos de cada muestra analizada.

Posteriormente se analizaron los valores relativos de fluorescencia realizando un ajuste no lineal utilizando el Software GraphPad, de tal forma que se obtuvieron los valores de IC₅₀ para todas las fracciones y subfracciones analizadas de *E. yucatanensis*.

Tabla 3.4 Resumen de valores de IC₅₀ para subfracciones obtenidas de hoja e inflorescencias de *E. yucatanensis*.

Fracción	IC ₅₀ (µg/mL)
CYS-12- H	56.77
CYS-12- I	215.9
CYS-12- J	>2000
CYS-12-N (Corilagina)	125.2

CYFB6 - K	0.6784
CYFB6 - L	2.537
CYFB6 - M	1.241
CYFB6 - N	168.6
CYFB6 - K - 3	403.3
CYFB6 - K - 5	0.9241

La tendencia mundial hoy en día es el recurrir a las plantas medicinales, debido a que lo antivirales de uso común muestran eficacia limitada, muchas veces acompañada de efectos adversos, siendo la farmacoterapia natural una alternativa para el tratamiento de afecciones respiratorias virales (Ban-Shabat *et al.*, 2020).

El género *Caesalpinnia* está constituido por especies de alto potencial farmacológico. Entre estas se encuentran los metabolitos con actividad antiviral, tal es el caso de los diterpenos de tipo casano que funcionan como inhibidores de la hemaglutinina, la cual es una proteína de superficie en el virus de la influenza, por tal motivo el presente trabajo reporta los primeros análisis de actividad anti-neuraminidasa en esta planta endémica de Yucatán. Actualmente no existen reportes fitoquímicos de las inflorescencias de *E. yucatanensis*. En la literatura se pueden encontrar escasos estudios de inflorescencias, donde sobresale un reporte relacionado a los extractos etanólicos y acuosos de *C. pulcherrima* que presentan actividades antioxidantes, analgésicas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias y antihelmínticas, como fue previamente reportado por Chiang en 2013 y Moteriyá en 2017. Posteriormente, Osman y colaboradores (2016), pudieron caracterizar un novedoso derivado del ácido octadecenoico, así como lograron aislar compuestos fenólicos y fitoesteroles a partir de flores de *C. gilliesi*. Por tal motivo resulta interesante el estudio fitoquímico y evaluación de actividad biológica de las inflorescencias de esta especie.

Al realizar un análisis a profundidad de los resultados obtenidos, estos datos refuerzan la hipótesis de actividad antiviral en las particiones y fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de hoja y flor de *Erythrostemon yucatanensis* ya que contiene metabolitos secundarios con actividad anti-neuraminidasa. En resumen, se puede decir que la efectividad de los compuestos en cada fracción podría deberse a su capacidad de inhibir la neuraminidasa de *C. perfringens*. Sin embargo, es importante resaltar que debe ser confirmada esta propuesta por medio de ensayos más específicos tales como viabilidad celular y/o pruebas citotóxicas *in vivo*, sugiriendo que estas serían candidatos para seguir estudiando a este nivel de tratamiento. También es importante mencionar que aquellos

valores obtenidos de IC_{50} para algunas fracciones y/o particiones que son $> 100 \mu\text{g/mL}$ resultan ser significativas, sugiriendo una posible actividad antiviral.

Capítulo IV. Conclusiones

4. 1 Conclusión

En el presente proyecto de investigación se puede concluir que *E. yucatanensis* contiene compuestos activos que sugieren una actividad antiviral potencial contra la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*.

Se identificó por primera vez en extractos metanólicos de hoja de esta especie el compuesto Corilagina, perteneciente a los lignotaninos así como se sugiere la presencia de la hesperidina, un flavonoide glicosilado, reportados por primera vez en esta especie vegetal. El análisis de otras subfracciones minoritarias de esta especie indicó la presencia de actividad anti-neuraminidasa con valores de $IC_{50} < 3 \mu\text{g/mL}$ para las subfracciones CYFB6 y fracciones de hojas de *E. yucatanensis*. Así mismo, es necesario confirmar estos resultados con ensayos *in vivo*, así como pruebas específicas para confirmar el mecanismo de acción de los compuestos aislados por primera vez en esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

Air, G., (2012). Influenza neuraminidase. Influenza and Other Respiratory Viruses, 6, 245–256.

Amarelle L, Lecuona E, Sznajder JI. (2017). Anti-Influenza Treatment: Drugs Currently Used and Under Development. Archive of Bronconeumology, 53(1):19-26. English, Spanish.

Anaya, A. L. (2003). Ecología Química. México, DF; Plaza y Valdez, 349 p.

Bai, Y., Jones, J.C., Wong, S.-S., Zanin, M., (2021). Antivirals Targeting the Surface Glycoproteins of Influenza Virus: Mechanisms of Action and Resistance. Viruses, 13,624. <https://doi.org/10.3390/v13040624>

Bashmakova, N., S. Kutovyy, V Yashchuk, D. Hovorun, M Losytskyy and L. Zaika. (2009). Optical spectroscopy studies of the interaction between a number of plant alkaloids and the DNA double helix in an aqueous solution. Ukrainian Journal of Physics, 54 (5), 471- 470

Beigel, J.; Bray, M. (2008). Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. Antiviral research, 78, 91-102.

Brockewell, C.; Webster, R.; Webby, R. (2009). Diversity of influenza viruses in swine and emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). Infuenza and other viruses, 3, 207-213.

C. Deback, J.-M. Huraux; Antivirales (excluidos los antirretrovirales), EMC - Tratado de Medicina, Volume 11, Issue 3, 2007, Pág 1-10, ISSN 1636-5410.

Carnevali Fernández-Concha, G.; J.L. Tapia-Muñoz, R. Duno de Stefano, y I.M. Ramírez. (2010). Flora ilustrada de la Península de Yucatán: Listado Florístico. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida.

Cetina Montejo, L. (2011). Evaluación antiviral de *Caesalpinia yucatanensis* contra el virus de la influenza A (H1N1) pandémico. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 38 p.

Chiang, L.; Chiang, W.; Liu, M.; Lin, C. (2003). In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. J. Antimicrobial Chemotherapy, 52, 194-198.

Chiang, L.; Ng, L. T., Cheng, P.-W., Chiang, W., Lin, C.-C., (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilica*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 32, 811-816.

Choi, JG., Kim, Y.S., Kim, J.H. *et al.*, (2019). Antiviral activity of ethanol extract of *Geranii Herba* and its components against influenza viruses via neuraminidase inhibition. Scientific Reports, 9, 12132.

Córdoba JA, Hernández M, Ortiz M, Martínez L, Lezana MA, López-Gatell H, Alpuche C. (2011). Perfil epidemiológico de la pandemia de la influenza A (H1N1) 2009 en México. Editorial Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de La Salud, Dirección General de Epidemiología. México DF, México.

Das, B.; Thirupathi, P.; Rvikanth, B.; Kumar, R. (2009). Isolation, Synthesis, and Bioactivity of Homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 57, 1139- 1141.

Das, K.; Aramini, J.; Ma, L.; R. Arnold. E. (2010). Structures of Influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. Nature Structural and Molecular Biology. 17, 530-538.

Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. Nature, 411, 843-847.

Felipe, A., Rincao, V.P., Benati, F.J., Linhares, R.E., Galina, K.J., de Toledo, C.E., Lopez, G.C., de Mello, J.C. y Nozawa, C. (2006). Antiviral Effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29 (6), 1092-1095.

Flora de la Península de Yucatán. Centro de investigación Científica de Yucatán. http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1455 (Consultado el 06 de Mayo del 2021).

Fikry, S., Khalil, N. & Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*, 9:41, 1-10.

He, D.-Y., Li, Y.-P., Tang, H.-B., Luo, L., Ma, R.-J., Wang, J.-H., Wang, L.-Q., (2016). Phenolic compounds from the twigs and leaves of Tara (*Caesalpinia spinosa*). *Journal of Asian Natural Products Research*, 18, 334–338.

Hidetoshi Yamada, Kohei Nagao, Kazutoyo Dokei, Yusuke Kasai, and Naoki Michihata. (2008). Total Synthesis of (–)-Corilagin., *Journal of the American Chemical Society*, 130 (24), 7566-7567.

García, P., Romero, M. J., Llanderal, A., Cermeño, P., Lao, M. T. & Segura, M. L. (2019). Effects of Drought Stress on Biomass, Essential Oil Content, Nutritional Parameters, and Costs of Production in Six *Lamiaceae* Species. *Water*, 11, 1-12.

Goudjil, M. B., Zighmi, S., Hamada, D., Mahcene, Z., Bencheikh, S. E. & Lajel, S. (2020). Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (*Lamiaceae*). *South African Journal of Botany*, 128, 274- 282.

Gutiérrez MC, Parry A, Tena M, Jorin J, Edwards R. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemical*, 1995;38(5):1 185-91

Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., & Miertus, S. (2011). The quenching effect of flavonoids on 4-methylumbelliferone, a potential pitfall in fluorimetric neuraminidase inhibition assays. *Journal of Biomolecular screening*, 16(7), 755-764.

Li, J., McClane, B.A. (2014). The Sialidases of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718 Differ in Their Properties and Sensitivities to Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1701–1709.

Lock, O., Cabello, I., y Doroteo, V. (2006). Análisis de Flavonoides en Plantas. *Analysis Of Flavonoids in Plants*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.

Margulis, L., & Chapman, M. J. (2009). Kingdoms and domains: an illustrated guide to the phyla of life on Earth. Academic Press, 631.

Méndez, M. and R. Durán (2009). Plantas medicinales yucatecas, un saber subvalorado. Ciencia Conocimiento Tecnología, 89, 73-75

Moteriya, P., Chanda, S., (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Caesalpinia pulcherrima* flower extract and assessment of their in vitro antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, and genotoxic activities. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 45, 1556-1567.

Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L. and Behra R. (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Science Technology, 42: 8959–8964.

Notka, F., Meier, G. y Wagner, R. (2004). Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. Antiviral Research, 64 (2), 93-102.

Oberdörster E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the brain of juvenile largemouth bass. Environmental Health Perspectives, 2004, (10) 112.

Ogunlana, O.O., He, W.J., Fan, J.T., Zeng, G.Z., Ji, C.J., Zheng, Y.Q., Olagunju, J.A., Akindahunsi, A.A., Tan, N.H., 2015. Report: Cytotoxic flavonoids from the young twigs and leaves of *Caesalpinia bonduc* (Linn) Roxb. Pak. Journal of Pharmaceutucal Research, 2021, 2191–2198.

OMS Medicina tradicional: definiciones [Internet]. WHO. [citado 24 de julio de 2016]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.

Osman, S.M., El-Haddad, A.E., El-Raey, M.A., abd El-Khalik, S.M., Koheil, M.A., Wink, M., 2016. A New Octadecenoic Acid Derivate from *Caesalpinia gilliesii* Flowers with Potent Hepatoprotective Activity. Pharmacognosy Magazine, 12, S332-S336.

Pantev, A., Ivancheva, S., Staneva, L. y Serkedjieva, J. (2006). Biologically active constituents of a polyphenol extract from *Geranium sanguineum* L. whit anti-influenza activity. Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen, 61c, 508-516.

Pascual Casamayor D, Pérez Campos YE, Morales Guerrero I, Castellanos Coloma I, González Heredia E. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. MEDISAN. 2014;18(10):1467–74.

Rajasekaran D, Palombo EA, Chia Yeo T, Lim Siok Ley D, Lee Tu C, Malherbe F, et al. (2013) Identification of Traditional Medicinal Plant Extracts with Novel Anti-Influenza Activity. PLoS ONE 8(11): e79293.

Ryan KG, Swinny EE, Matkham KR, Winefield. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. Phytochemical 2002, 59, 23-32.

Romo de Vivar, A. (2006). Química de la flora mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química, UNAM, México.

Shanaida, M. & Golembiovskaya, O. (2018). Identification and component analysis of triterpenoids in *Monarda fistulosa* L. and *Ocimum americanum* L. (*Lamiaceae*) aerial parts. Pharmaceutical Science, 13, 26-31.

Serkedjieva, J. y Hay, A.J. (1998). In vitro anti-influenza of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. Antiviral research, 37, 121-130.

Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(3).

Sepúlveda Jiménez, Gabriela. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas, Revista Mexicana de Fitopatología, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México, ISSN:0185-3309, disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>

Stanley, P., Flora of Yucatan. Field Museum of Natural History: Chicago, EUA. 1930; pág. 285.

Tolo, F.M., Rukunga, G.M., Muli, F.W., Njagi, E.N.M., Njue, W., Kumon, K., Mungaid, G.M., Muthaura, C.N., Muli, J.M., Keter, L.K., Oishi, E. y Kofi-Tsekpoa, M.W. (2006). Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 92–99.

United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Beltsville Area <http://www.arsgrin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?418913> (Consultado el 06 de Mayo del 2021).

Jun, H.; Xialoing, Y.; Wei, W.; Hau, W (2008). Antioxidant Activity In Vitro of Three Constituents from *Caesalpinia sappan* L. *Tsinghua Science and Technology*, 13, 471-479.

Mandal, S.; Hazra, B.; Sarkar, R.; Biswas, S.; Mandal, N. (2008). Assessment of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging activity of methanol extract of *Caesalpinia crest* Leaf. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.

Ulibarri, E. (2008). Los géneros de *Caesalpinioideae* (*Leguminosae*) presentes en Sudamérica. *Darwiniana*, 46, 69-163.

Udenigwe, C.; Ata, A.; Samarasekera, R. (2007). Glutathione S-transferase inhibiting chemical constituents of *Caesalpinia bon*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 442-445.

WHO 2009. World Health Organization. CDC protocol of real time RTPCR for influenza A (H1N1). [Online] (Actualizado 2011) Disponible en: <http://www.who.int> [Consultado el 11 Mayo del 2021]

Yanqin Yang, Dapeng Zhao, Kailong Yuan, Guojun Zhou, Yu Wang, Yanmeng Xiao, Chenxu Wang, Jingwei Xu & Wei Yang. (2015). Two new dimeric naphthoquinones with neuraminidase inhibitory activity from *Lithospermum erythrorhizon*, *Natural Product Research*, 29:10, 908-913.

Yeo, SG., Song, J.H., Hong, EH. (2015). Antiviral effects of *Phyllanthus urinaria* containing corilagin against human enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 in vitro. Archives of Pharmacal Research, 38, 193–202.

Cromatografía por permeación de gel para fracciones obtenidas de VLC 11

Se realizó un fraccionamiento por medio de una columna cromatografía de permeación en gel la cual se empacó con Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich), utilizando 500 mg de la muestra CYF 11, en una columna de 30 cm de altura, un diámetro de 1.5 cm y un sistema de metanol 100% para la separación por tamaño de partícula. Se recolectaron fracciones en tubos de ensayo de aproximadamente 2 ml cada una, las cuales fueron resumidas de acuerdo a la similitud que se observaron en la cámara de revelado con una longitud de onda de 254 y 365 nm, obteniendo los siguientes resultados:

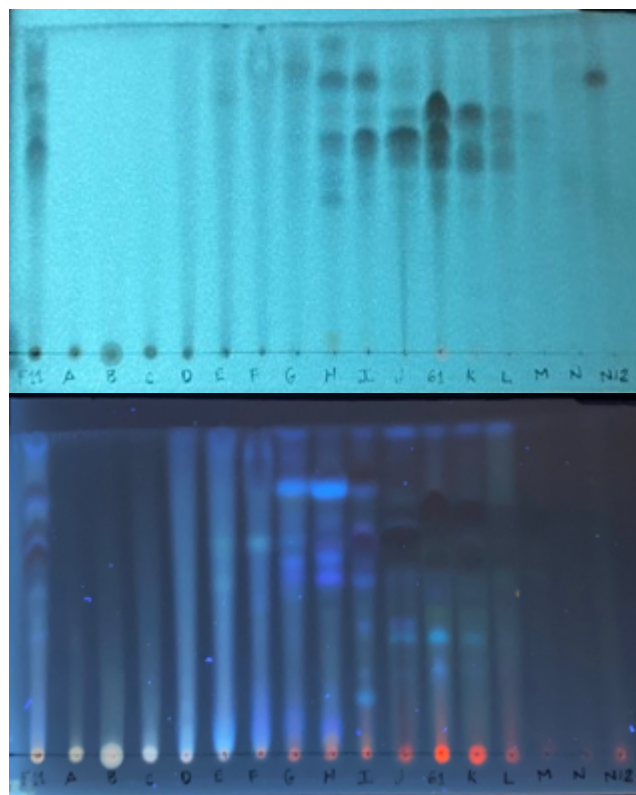


Figura 25. CCD de la fracción CYV 11, se obtuvieron las subfracciones asignadas con clave CYV11 A - N, reveladas en cámara UV en longitud de onda de 254 y 365 nm.

Se realizó este subfraccionamiento con esta fracción debido a que se pensó que las fracciones 11 y 12 y mostraban similitud en complejidad de sus compuestos y por el rendimiento obtenido de la fracción 11 (29.67%), sin embargo no se encontró el compuesto de interés (Corilagina).