



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Aislamiento e identificación de componentes en la corteza de tallo de
Erythrostemon yucatanensis (Greenm.) Gagnon & GP Lewis con
actividad anti-hemaglutinina y determinación del efecto de la
modificación estructural en su actividad biológica

Tesis que presenta

M.C. Tania Ortiz López

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: BIOTECNOLOGIA)

Mérida, Yucatán, México

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 Tania Ortiz López titulado **Aislamiento e identificación de componentes en la corteza de tallo de *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis con actividad anti-hemaglutinina y determinación del efecto de la modificación estructural en su actividad biológica**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, Química de productos Naturales con actividad antiviral, Laboratorio de química de productos naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Rocío Borges Argáez y codirectora la Dra. Guadalupe Ayora Talavera, perteneciente al programa de posgrado en Ciencias de la salud del laboratorio de Virología en el Centro de investigaciones regionales, UADY, Yucatán.

Atentamente

Dra. Cecilia Hernández Cepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 23 de octubre de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: Tania Ortiz López

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto CONACYT clave 27652 titulado “Aislamiento y evaluación antiviral de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* y *Caesalpinia yucatanensis*” bajo la dirección de la Dra. Rocío Borges Argáez y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a las directoras de esta tesis doctoral, la Dra. Rocío Borges y la Dra. Guadalupe Ayora, por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por la dirección y el rigor científico que facilitó el desarrollo de este proyecto. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a sus grupos de investigación.

Asimismo, quiero agradecer el apoyo técnico de la MC. Fabiola Escalante en análisis por CG-MS, el MC. Francisco Chí por la colecta del material vegetal, el MC. José Martín Baas por análisis FT-IR y la QBB. Mirbella Cáceres por análisis HPLC, a mis predecesores en este proyecto de investigación la M.C. Lisette Cetina y el M.C. Ángel May gracias por sus aportaciones a este proyecto, y a mis compañeros de laboratorio gracias por su apoyo académico y por la amistad que me han brindado.

Este trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos motiva a crecer como personas y como profesionistas. Gracias a mis padres por su apoyo incondicional y especialmente a mi hermana Lizbeth, porque siempre ha sido mi modelo seguir, agradezco enormemente sus consejos y enseñanzas que siempre me motivan a seguir creciendo como persona y profesionalmente.

Finalmente, quiero agradecer al CONACYT por la beca otorgada (786325) para poder realizar mis estudios de Doctorado en ciencias biológicas en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

- Presentación de cartel “Chromatographic profile of fractions with anti-hemagglutinin activity obtained from the stem bark of *Caesalpinnia yucatanensis*” en el XVIII National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology (SMB 2019)
 - Presentación de conferencia “Productos naturales con actividad antiviral” en la semana de Ingeniería Ambiental virtual 2021 (SIAV 2021), del ITSUR del Tecnológico Nacional de México.
 - Presentación de cartel virtual “Bioassay-guided fractionation of anti-hemmagglutinin components of *Caesalpinnia yucatanensis* stem bark extract” en el congreso internacional de la Sociedad Mexicana de Química (CISQM 2021).
 - Presentación de video de química flash “Terpenes isolated from the stem bark extract of *Erythrostemon yucatanensis* with anti-hemagglutinin activity against influenza virus AH1N1” en el congreso internacional de la Sociedad Mexicana de Química (CISQM 2021).
 - Publicación de artículo científico: “Ortiz-López, T.; Borges-Argáez, R.; Ayora-Talavera, G.; Canto-Ramírez, E.; Cetina-Montejo, L.; May-May, Á.; Escalante-Erosa, F.; Cáceres-Farfán, M. Bioassay-Guided Fractionation of *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis Components with Anti-hemagglutinin Binding Activity against Influenza A/H1N1 Virus. *Molecules* 2022, 27, 5494”. Agosto 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27175494>.
-

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las mujeres que, a pesar de los obstáculos han logrado posicionarse en la ciencia consiguiendo el reconocimiento profesional por su talento y esfuerzo.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	VIII
LISTADO DE TABLAS	XV
ABREVIATURAS	XVII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1 CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	5
ANTECEDENTES	5
1.1 LOS VIRUS DE INFLUENZA.....	5
1.2 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	7
1.3 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE INFLUENZA A (VIA)	10
1.4 TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS CONTRA INFLUENZA.....	12
1.5 PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE NUEVOS ANTIVIRALES	15
1.6 <i>ERYTHROSTEMON YUCATANENSIS</i>	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
2 CAPÍTULO II	27
FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO DE CORTEZA DE TALLO DE ERYTHROSTEMON YUCATANENSIS (GRENM) GAGNON & GP LEWIS.....	27
2.1 INTRODUCCIÓN	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.2.1 Colecta y procesamiento del material vegetal: Extracto metanólico (EY)....	29
2.2.2 Ensayo de inhibición de hemaglutinación (IHA)	31
2.2.3 Fraccionamiento biodirigido del extracto EY	33
2.2.3.1 Cromatografía en capa delgada (CCD y cromatografía en capa delgada preparativa CCD-P)	33
2.2.3.2 Cromatografía de partición	34
2.2.3.3 Cromatografía líquida de vacío (CLV)	35
2.2.3.4 Cromatografía en columna flash (CCF).....	35
2.2.3.5 Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC UV-DAD).....	36
2.2.3.6 Cromatografía de permeación en gel (CPG).....	36
2.2.3.7 Cromatografía de adsorción por gravedad (CCA)	37
2.3 RESULTADOS	38
2.3.1 Extracto de corteza de tallo de <i>Erythrostemon yucatanensis</i>	38
2.3.2 Fraccionamiento del extracto MeOH (EY).....	39
2.3.3 Fraccionamiento de la parte hexánica (EY2) por CLV	41
2.3.4 Fraccionamiento de EY26 por CLV.....	45
2.3.5 Fraccionamiento de EY2612 por CCF	48
2.3.6 Fraccionamiento de EY26: UHPLC UV-DAD (ACN/MeOH/H ₂ O).....	50

2.3.7	Fraccionamiento de EY2634 mediante Cromatografía en placa preparativa	52
2.3.8	Fraccionamiento de EY26: Cromatografía en columna de adsorción.....	53
2.3.9	Fraccionamiento de EY24: Cromatografía líquida de vacío	56
2.3.10	Fraccionamiento de EY25: Cromatografía líquida de vacío	57
2.3.11	Fraccionamiento de EY212: Cromatografía de permeación en gel	59
2.3.12	Fraccionamiento de EY212: Cromatografía en columna de adsorción.....	60
2.3.13	Fraccionamiento de EY212-8: Cromatografía de permeación en gel	62
2.3.14	Fraccionamiento de EY212-9: Cromatografía de permeación en gel	62
2.4	DISCUSIÓN	65
3	CAPÍTULO III	66
	IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES CON ACTIVIDAD ANTI-HA Y EFECTO DE LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE SU ESTRUCTURA	66
3.1	INTRODUCCIÓN	66
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	68
3.2.1	Técnicas cromatográficas	68
3.2.1.1	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-UV-Vis)	68
3.2.1.2	Cromatografía de ultra alto rendimiento (UHPLC-UV-DAD)	68
3.2.1.3	Cromatografía de ultra alto rendimiento UHPLC-MS/MS-QqQ	68
3.2.1.4	Cromatografía de gases acoplada un espectrómetro de masas GC-MS	69
3.2.2	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR-ATR)	69
3.2.3	Resonancia magnética nuclear (RMN- ¹ H)	69
3.2.4	Cuantificación de componentes mediante cromatografía de gases (GC-FID)	70
3.2.5	Derivatización de componentes con actividad IHA	71
3.2.5.1	Metodología de reacción de acetilación:	72

3.3	RESULTADOS	73
3.3.1	UHPLC-UV-DAD	73
3.3.2	HPLC-MS/MS-QqQ	75
3.3.3	HPLC (UV-Vis, PDA)	76
3.3.4	FTIR-ATR	77
3.3.5	GC-MS	78
3.3.6	Resonancia magnética nuclear (RMN- ¹ H).....	82
3.3.7	Cuantificación de los componentes en TO2 mediante Cromatografía de gases (GC-FID) por el método de Estándar Interno.	83
3.3.8	Modificación química de la mezcla TO2: β -sitosterol, estigmasterol y campesterol con actividad IHA.....	88
3.4	DISCUSIÓN	92
4	CAPÍTULO IV.....	95
ACTIVIDAD IHA DE LA MEZCLA DE ESTEROLES Y SUS DERIVADOS ACETILADOS.		
		95
4.1	INTRODUCCIÓN	95
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS	97
4.2.1	Crecimiento y mantenimiento de las células MDCK.....	97
4.2.2	Disolución de muestras	98
4.2.3	Ensayo de citotoxicidad	98
4.2.4	Propagación del virus AH1N1 en células MDCK.....	99
4.2.5	Determinación del título viral de la cepa A/Yucatán/2370/09 (H1N1)	101
4.2.5.1	Dosis infectiva de cultivo de tejidos al 50 % (TCID ₅₀)	101
4.2.5.2	Ensayo en placa (PFU/mL).....	102
4.2.6	Ensayo de reducción de efecto citopático (co-tratamiento)	103

4.2.7	Ensayo de inhibición de la actividad de unión de la HA a las células MDCK	104
4.3	RESULTADOS	106
4.3.1	Citotoxicidad de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados.....	106
4.3.2	Título viral de la cepa A/Yucatán/2370/09 (H1N1)	107
4.3.3	Reducción del efecto citopático del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) mediante co-tratamiento con componentes con actividad IHA.	110
4.3.4	Efecto del tiempo de co-tratamiento del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) en la actividad de unión de la HA viral.	111
4.4	DISCUSIÓN	113
5	CAPÍTULO V	115
	DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	115
5.1	DISCUSIÓN	115
5.2	CONCLUSIONES GENERALES	117
5.3	PERSPECTIVAS	117
	BIBLIOGRAFÍA	118
	ANEXO 1: ENSAYOS BIOLÓGICOS	128
	ANEXO 2: ARTÍCULO PUBLICADO	134
1.	Introduction	135
2.	Materials and Methods	136
2.1.	PLANT MATERIAL	136
2.2.	METHANOLIC EXTRACT FRACTIONATION	136

2.3. BIOLOGICAL ASSAYS	137
2.3.1. Cells and Viruses.....	137
2.3.2. Cytotoxicity Assay	137
2.3.3. Cytopathic Effect Reduction Assay	137
2.3.4. Hemagglutination Inhibition Assay	138
2.3.5. Plaque Assay.....	138
2.3.6. RNA Extraction and Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	139
2.3.7. Data Analysis and Interpretation	139
2.4. BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION OF LEAF EXTRACTS.....	139
2.5. BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION OF STEM BARK EXTRACTS.....	140
2.6. CHARACTERIZATION OF ANTI-HA COMPOUNDS IN C4.....	140
2.6.1. Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR).....	140
2.6.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	140
2.6.3. NMR Structure Elucidation.....	140
3. Results.....	141
3.1. ANTIVIRAL ACTIVITY OF LEAF, ROOT AND STEM BARK FRACTIONS OF E. YUCATANENSIS	141
3.2. LEAF COMPONENTS FROM E. YUCATANENSIS WITH ANTI-HA ACTIVITY	141
3.3. STEM BARK FRACTIONS FROM E. YUCATANENSIS WITH ANTI-HA ACTIVITY.....	142
3.4. INHIBITION OF VIRUS HA BINDING AND INFECTION BY COMPONENT C4 FROM THE STEM BARK OF E. YUCATANENSIS	144

4. Discussion.....	146
5. Conclusions.....	147
References.....	147

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 El virión de Influenza, está constituido por diez proteínas estructurales diferentes: la Hemaglutinina (HA), la Neuraminidasa (NA), la nucleoproteína (NP), la nucleocápside que contiene a la ribonucleoproteínas (vRNP) (reunión de la NP con el ARN viral), las tres proteínas PB2, PB1 y PA, que forman el complejo ARN polimerasa, la proteína matriz (M1) y el canal iónico (M2). Creado con Biorender.com y Power point.....	6
Figura 1.2 Entrada celular mediada por la hemaglutinina viral. Creado con Biorender.com y Power point.....	8
Figura 1.3 Ciclo de replicación del virus de influenza A. Creado con Biorender.com y Power point.....	9
Figura 1.4 Deriva antigénica del virus de influenza A. Creado con Biorender.com y Power point.....	10
Figura 1.5 Cambios antigénicos del virus de influenza A. Creado con Biorender.com y Power point.....	11
Figura 1.6 Mecanismo de acción de los antivirales actualmente disponibles en el mercado durante el ciclo de replicación del virus de influenza. Creado con Biorender.com y Power point.....	14
Figura 1.7 Estructuras de flavonoides reportados con actividad antiviral. Creado con ChemDraw y Power point.	16
Figura 1.8 Estructuras de alcaloides reportados con actividad antiviral. Creado con ChemDraw y Power point.	17
Figura 1.9 Estructuras de triterpenoides reportados con actividad antiviral (Wang <i>et al.</i> , 2016, Yu <i>et al.</i> , 2014).....	18
Figura 1.10 Diagrama de estrategia experimental a seguir para el aislamiento e identificación de los componentes con actividad anti-HA presentes en la corteza de tallo de <i>Erythrostemon yucatanensis</i>	25

Figura 2.1 <i>Erythrostemon yucatanensis</i> (Greenm.) Gagnon & GP Lewis (nombre maya: taa k'in che) fotos tomadas en el jardín botánico Roger Orellana del Centro de investigación científica de Yucatán, en enero del 2019.....	29
Figura 2.2 Maceración estática con metanol de la corteza del tallo de <i>E. yucatanensis</i> , filtración y concentración del extracto crudo metanólico en un rotavapor a presión reducida.....	30
Figura 2.3 Interpretación de resultados obtenidos en placa para los ensayos de inhibición de hemaglutinación (Creada con Power point).....	31
Figura 2.4 Extracto metanólico de la corteza del tallo de <i>Erythrostemon yucatanensis</i> (izquierda), partición liquido-liquido del extracto utilizando una mezcla de disolventes MeOH/ACN/Hx (1:1:3), utilizando un embudo de separación (derecha).....	39
Figura 2.5 Fraccionamiento del extracto de corteza de tallo de <i>Erythrostemon yucatanensis</i> . (A) Diagrama de proceso de extracción. (B) Cromatografía en capa delgada del extracto metanolico crudo y de la parte hexánica.....	40
Figura 2.6 Fraccionamiento de EY2 (Parte Hx). (A) Cromatografía líquida de vacío (CLV). (B) CCD de las 14 fracciones obtenidas.	42
Figura 2.7 Resultados de actividad IHA de las fracciones, del primer monitoreo de las 14 fracciones obtenidas de la parte hexánica mediante CLV. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).	43
Figura 2.8 Ensayo IHA. (A)Resultados de IHA de las fracciones de EY2. (B) Porcentaje de IHA de las fracciones de la parte hexánica (EY2). (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos)	44
Figura 2.9 Fracciones de EY26 obtenidas mediante CLV. (A) Cromatografía en capa delgada de las fracciones obtenidas de EY26. (B) Diagrama de fraccionamiento.....	46
Figura 2.10 Placa de IHA y porcentaje de inhibición de hemaglutinación de las fracciones de EYA2B6 obtenidas mediante CLV. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).	47
Figura 2.11 Fraccionamiento de EY2612. (A) CCD de los tubos colectados por CCF1	

utilizando un sistema de polaridad creciente. (B) Diagrama de fraccionamiento. (C) CCD de los tubos colectados por CCF2 utilizando como referencia $R_f=0.46$. (D) Fracciones obtenidas mediante CCF1. (E) Fracciones obtenidas mediante CCF2. 49

Figura 2.12 Resultados de IHA de las fracciones de EY2612 mediante CCF. Los resultados encerrados en el recuadro corresponden a las fracciones de mayor rendimiento. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos)..... 50

Figura 2.13 Fraccionamiento de EY26. (A) CCD de las fracciones obtenidas mediante UHPLC. (B) Diagrama de fraccionamiento..... 51

Figura 2.14 Ensayo IHA de las fracciones de EY26 mediante UHPLC. La fracción EY2634 fue la única que mostró actividad IHA. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos)..... 52

Figura 2.15 Fraccionamiento de EY2634 mediante CCD-P. (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD-P de EY2634, TO1 $R_f=0.46$ y TO2 $R_f=0.31$. (C) CCD de fracciones de EY26. (D) CCD de EY2634, TO1 y TO2. 53

Figura 2.16 Fraccionamiento de EY26 mediante cromatografía en columna de gravedad. (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD de las fracciones obtenidas. (C) Columna de gravedad empleada. 54

Figura 2.17 Ensayo IHA de TO1, TO2 y fracciones de EY26 obtenidas por CCG que en CCD mostraron bandas que corresponden a TO1 y TO2. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos). 55

Figura 2.18 Fraccionamiento de EY24 mediante cromatografía líquida de vacío (CLV). (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD de fracciones obtenidas, la banda señalada en círculo rojo corresponde a TO2..... 57

Figura 2.19 Fraccionamiento de EY25 mediante cromatografía líquida de vacío (CLV). (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD de fracciones obtenidas, la banda señalada en círculo rojo corresponde a TO2..... 58

Figura 2.20 Fraccionamiento de EY212. (A) CPG de EY212. (B) Diagrama de fraccionamiento. (C) CCD de fracciones obtenidas de CPG. (D) CCD de fracciones

obtenidas por CCA. (E) CCA de EY212 obtenidas mediante CCA y CPG.	60
Figura 2.21 Ensayo IHA de fracciones de EY112 que mostraron perfiles cromatográficos más simples (EY212-8 y EY212-9), comparadas con fracciones que anteriormente mostraron actividad IHA. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).	61
Figura 2.22 Fraccionamiento de EY212-8 y EY212-9 mediante CPG.	63
Figura 2.23 Diagrama general de fraccionamiento biodirigido con el ensayo IHA de los componentes bioactivos en el extracto de corteza de tallo de <i>E. yucatanensis</i>	64
Figura 3.1 Ecuaciones para obtener los valores de Área* y de Concentración*, curva de calibración para calcular la relación de concentración de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2.	71
Figura 3.2 Diagrama de proceso empleado para la acetilación de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol.	72
Figura 3.3 Perfil cromatográfico de las fracciones de EY2 obtenidas mediante CLV y que tienen actividad anti-hemaglutinina (A-H).....	73
Figura 3.4 Perfil cromatográfico de las fracciones de EY26 obtenidas mediante CLV y que tienen actividad anti-hemaglutinina (anti-HA).....	74
Figura 3.5 Perfil de UHPLC-MS de EY26 esta fracción tiene tres componentes con pesos de 576.4 para el pico 1, 580.4 para el pico 2, y 584.5 para el pico 3.....	75
Figura 3.6 Perfil cromatográfico de TO2 mediante HPLC-UV-Vis a una longitud de onda de 210 nm.....	76
Figura 3.7 Espectro de FTIR de TO2.	77
Figura 3.8 Perfil cromatográfico de TO2 obtenido mediante GC-MS, pico 1 campesterol (TR=20.1 min), pico 2 estigmasterol (TR=20.4 min), pico 3 β -sitosterol (TR=20.9 min). ..	78
Figura 3.9 Perfil de fragmentación masico (GC-MS) de fitoesteroles, picos principales con RT de 20.10 min, 20.40 min y 20.90 min.....	79

Figura 3.10 Co-cromatografía mediante CG-MS, pico 1 campesterol, pico 2 estigmasterol, pico 3 β -sitosterol.....	80
Figura 3.11 Perfil cromatográfico de EY212-82 obtenido mediante GC-MS.....	81
Figura 3.12 Perfil cromatográfico de EY212-92 obtenido mediante GC-MS.....	81
Figura 3.13 Espectro ^1H - NMR de TO2.....	82
Figura 3.14 Curva de calibración de Campesterol y ecuación para su cuantificación.....	85
Figura 3.15 Curva de calibración de Estigmasterol y ecuación para su cuantificación.	85
Figura 3.16 Curva de calibración de β -Sitosterol y ecuación para su cuantificación.....	86
Figura 3.17 Diagrama de proceso de acetilación y Tabla de rendimiento de los derivados acetilados de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol	88
Figura 3.18 Perfil cromatográfico de Ac-TO2 obtenido mediante GC-MS	89
Figura 3.19 Espectro de FTIR de Ac-TO2: Derivados acetilados de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol.	90
Figura 3.20 Resultados de IHA de las fracciones TO2, estándares de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol, así como los derivados acetilados de TO2 (Ac-TO2). (V=virus+eritrocitos; E=Eritrocitos).....	91
Figura 3.21 Estructura química de los componentes identificados en TO2.	92
Figura 3.22 Estructura química de los componentes identificados en EY212.....	93
Figura 3.23 Derivados acetilados de la mezcla de esteroides Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol.	94
Figura 4.1 Procedimiento seguido para el crecimiento y mantenimiento de las células MDCK (Creada en Biorender.com).	97
Figura 4.2 Preparación de Stock (10 mg/mL) de la mezcla de esteroides (TO2), sus	

derivados acetilados (Ac-TO2), β -sitosterol (BS), estigmasterol (ES) y campesterol (CS). (Creada en Biorender.com).....	98
Figura 4.3 Metodología empleada en el ensayo de citotoxicidad. (Creada en Biorender.com).	99
Figura 4.4 Propagación de virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) en células MDCK. (Creada en Biorender.com).	100
Figura 4.5 Metodología para el ensayo de dosis infectiva de cultivo de tejido al 50% (TCID ₅₀) (Creada en Biorender.com).....	102
Figura 4.6 Proceso empleado para realizar ensayos en placa. (Creada en Biorender.com).	103
Figura 4.7 Metodología del ensayo de reducción de efecto citopático a nivel de co-tratamiento. (Creada en Biorender.com).	104
Figura 4.8 Metodología llevada a cabo para el ensayo de inhibición de unión de la HA a las células MDCK. (Creada en Biorender.com).....	105
Figura 4.9 Efecto citotóxico de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados	106
Figura 4.10 Ensayo de placa en células MDCK, placa de 6 pozos fijada y teñida. Las placas líticas aparecen como áreas circulares claras en la monocapa celular teñida con cristal violeta. Los números sobre los pocillos indican la dilución de la muestra de virus titulada.....	108
Figura 4.11 Ensayo TCID ₅₀ en células MDCK, placa de 96 pozos fijada y teñida. Los pozos vacíos indican efecto citopático completo, los pozos con solo algunas partes de la monocapa desprendida indican efecto citopático incompleto, en cambio los pozos con color violeta indican que no hay efecto citopático.	108
Figura 4.12 Ensayo de reducción de efecto citopático a nivel de co-tratamiento de TO2 (campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) y TO2-Ac (derivados acetilados de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) en células MDCK, MOI=0.01.	110

Figura 4.13 Efecto del tiempo de co-tratamiento de virus-TO2 en el ensayo de inhibición de actividad de unión de la HA, MOI=0.01.....	114
---	-----

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Rendimiento de extractos de corteza de <i>Erythrostemon yucatanensis</i> y de las fracciones obtenidas de la partición liquido-liquido.	38
Tabla 2.2 Rendimiento de fracciones obtenidas por cromatografía líquida de vacío de la parte hexánica (EY2).	41
Tabla 2.3 Rendimiento de fracciones obtenidas por cromatografía líquida de vacío de la fracción EY26	45
Tabla 2.4 Rendimiento de fracciones obtenidas en la cromatografía flash (EY262)	48
Tabla 2.5 Rendimiento de fracciones obtenidas en la CCF (EY2612).....	49
Tabla 2.6 Rendimiento fracciones de EY26 obtenidas mediante UHPLC-UV-DAD.....	51
Tabla 2.7 Rendimiento de fracciones obtenidas en CCD-P (EY2634).....	53
Tabla 2.8 Rendimiento de componentes aislados de en la cromatografía en columna de adsorción (EY26).....	54
Tabla 2.9 Rendimiento de componentes aislados en la cromatografía líquida de vacío de EY24.....	56
Tabla 2.10 Rendimiento de componentes aislados en la CLV de EY25.....	58
Tabla 2.11 Fracciones obtenidas de la CPG de EY212.	59
Tabla 2.12 Fracciones obtenidas en la CCA (EY212).	61
Tabla 2.13 Rendimiento de Fracciones de la CPG de EY212-8.....	62
Tabla 2.14 Rendimiento de Fracciones de la CPG de EY212-9.....	62
Tabla 3.1 Concentraciones calculadas de las diluciones de los estándares y la muestra TO2 (V1=Volumen inicial; AN=Analito; V2=Volumen final; C1=Concentración inicial;	

El=Estándar interno; C2=Concentración final).	83
Tabla 3.2 Datos de las áreas obtenidas a partir de los cromatogramas de las diluciones de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol con estándar interno (Vainillina).	84
Tabla 3.3 Datos de las áreas de los compuestos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol a partir de los cromatogramas de TO2 con estándar interno (Vainillina).	86
Tabla 3.4 Cuantificación de los compuestos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2	87
Tabla 4.1 Concentración citotóxica media de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados.	107
Tabla 4.2 Concentración inhibitoria media (CC50) de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados.	111
Tabla 4.3 Porcentaje de reducción de PFU/mL de la mezcla de esteroides TO2 y sus derivados Ac-TO2.....	112

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
CC50	Concentración citotóxica media
CC	Control Celular
CoTx	Co-tratamiento
CV	Control Viral
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCD-Ag	Cromatografía en capa delgada argentada.
CCD-P	Cromatografía en capa delgada preparativa
CCF	Cromatografía Flash
CLV	Cromatografía Líquida al Vacío
CG-EM	Cromatografía de gases – Espectroscopia de masas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
HA	Hemaglutinina
Hx	Hexano
IC50	Concentración inhibitoria media
IHA	Inhibición de la proteína hemaglutinina
IS	Índice de selectividad
MDCK	Madin darby canine kidney
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MOI	Multiplicidad de infección
NA	Neuraminidasa
REC	Reducción del efecto citopático
Rf	Factor de retención
TR	Tiempo de retención
μL	Microlitros

RESUMEN

Erythrostemon yucatanensis (Greenm.) Gagnon & GP Lewis, taa k'in che (nombre maya), es un árbol ampliamente distribuido en la Península de Yucatán, donde es utilizado como leña y sus flores para la producción de miel. En la medicina tradicional maya la infusión de sus ramas se utiliza para el tratamiento de enfermedades de filiación cultural (mal aire). En este trabajo se realizó el fraccionamiento del extracto de corteza de tallo de manera biodirigida con el ensayo de inhibición de hemaglutinación (IHA) de las cepas de virus de influenza H1N1: A/Yucatán/2370/09 y A/México/INDRE797/10 para aislar los metabolitos bioactivos. Mediante análisis cromatográficos y espectroscópicos se identificó una mezcla de fitoesteros (β -Sitosterol, Estigmasterol y Campesterol) en una de las fracciones (TO2) como los principales componentes con actividad IHA, estos fueron modificados químicamente mediante una reacción de acetilación para determinar el efecto en su actividad. Los ensayos biológicos demostraron que la mezcla de esteroides y sus derivados tenían un efecto en las etapas tempranas del ciclo de replicación viral. En el ensayo de reducción de efecto citopático a nivel de co-tratamiento la mezcla TO2 mostró $CI_{50}=3,125 \mu\text{g/mL}$ ($IS=62.84$), mientras que los derivados acetilados de TO2 (Ac-TO2) $CI_{50}=50 \mu\text{g/mL}$ ($IS=2.94$). A su vez en el ensayo de inhibición de formación de placas (PFU), TO2 mostró una inhibición del 94 % de PFU en los primeros 10 min de co-tratamiento, en cambio, Ac-TO2 mostró inhibición del 94% de PFU hasta los 60 min de co-tratamiento. Adicionalmente, se determinó la proporción de los esteroides en la mezcla, mediante el método de cuantificación por estándar interno, obteniéndose que la mezcla activa está conformada por 71.37% de β -Sitosterol, 17.55% de Estigmasterol y 11.07% de Campesterol. De acuerdo con los resultados, el mecanismo de acción de la mezcla de esteroides podría deberse al bloqueo de la hemaglutinina, lo que impide la unión de las partículas virales a la célula y a su vez la replicación viral del virus. Estos resultados representan un nuevo aporte acerca de la actividad antiviral de mezclas de fitoesteroides. Además, la presencia de estos tres esteroides como mezcla, en la industria de los alimentos, cosmética y farmacéutica, hacen viable su uso potencial como fitofármaco

ABSTRACT

Erythrostemon yucatanensis (Greenm.) Gagnon & GP Lewis, taa k'in che (Mayan name), is a tree widely distributed in the Yucatan Peninsula, where it is used as firewood and its flowers for honey production. In traditional Mayan medicine, the infusion of its branches is used for the treatment of diseases of cultural affiliation (mal aire). In this work, the fractionation of the stem bark extract was performed following a biodirected procedure, based on the hemagglutination inhibition assay (HI) of the H1N1 influenza virus strains: A/Yucatan/2370/09 and A/Mexico/INDRE797/10 to isolate the bioactive metabolites. Chromatographic and spectroscopic analyses identified a mixture of phytosterols (β -Sitosterol, Stigmasterol and Campesterol) in one of the fractions (TO2) as the main components with IHA activity, these were chemically modified by an acetylation reaction to determine the effect on their activity. Biological assays showed that the mixture of sterols and their derivatives had affect the early stages of the viral replication cycle. In the cytopathic effect reduction assay at the co-treatment level, the TO2 mixture showed an $IC_{50}=3,125 \mu\text{g/mL}$ ($SI=62.84$) and the Ac-TO2 acetylated derivatives of TO2 $IC_{50}=50 \mu\text{g/mL}$ ($IS=2.94$). In the plaque formation inhibition (PFU) assay, TO2 showed 94% inhibition of PFU in the first 10 min of co-treatment, Ac-TO2 showed 94% inhibition of PFU up to 60 min of co-treatment. Additionally, the proportion of sterols in the mixture was determined by the internal standard quantification method, obtaining that the active mixture is composed of 71.37% of β -Sitosterol, 17.55% of Stigmasterol and 11.07% of Campesterol. According to results, the mechanism of action of the sterol mixture could be due to the blockage of hemagglutinin, which prevents the binding of viral particles to the cell and in turn the viral replication of the virus. These results represent a new contribution about the antiviral activity of phytosterol mixtures. In addition, the presence of these three sterols as a mixture in the food, cosmetic and pharmaceutical industries makes their potential use as phytopharmaceuticals viable.

INTRODUCCIÓN

La influenza, comúnmente conocida como gripe, es una enfermedad infecciosa causada por los virus de influenza. Sus síntomas comunes incluyen fiebre alta, secreción nasal, dolor de garganta, dolores musculares, dolor de cabeza, tos, estornudos y cansancio (Kiani and Saeidi 2019). Los virus de la influenza estacional y pandémica pueden causar brotes importantes de enfermedades que conducen a una morbilidad de diversa gravedad. Es debido a esto, que las hospitalizaciones y las defunciones son más frecuentes en grupos de alto riesgo y se calcula que las epidemias anuales causan 3 a 5 millones de casos graves y 290 000 a 650 000 muertes (OMS, 2022). La transmisión de persona a persona se ve facilitada por varios factores, que incluyen títulos altos de virus infecciosos en el tracto respiratorio inmediatamente antes y al inicio de la enfermedad, un período de incubación corto y el potencial de propagación a través de múltiples rutas (por ejemplo, gotitas respiratorias, aerosoles y contaminación de las manos, autoinoculación) y en diversos entornos de transmisión (Kalil and Thomas, 2019).

Actualmente las estrategias de mitigación no farmacéuticas (distanciamiento social, restricciones de viaje y movimiento, medidas de higiene) han reducido la circulación de la influenza; sin embargo, este tipo de estrategias se ven limitadas por su deficiente cumplimiento y por aplicarlas de manera tardía (Hayden *et al.*, 2022). Además de que la falta de circulación global de influenza a lo largo de 2020 y principios de 2021 aumentó el número de personas con inmunidad reducida por la falta de exposición, lo que se tradujo en un aumento de susceptibilidad de la población a las infecciones por influenza (Laurie and Rockman, 2021). Por ejemplo, en México durante temporada de influenza estacional 2020-2021 únicamente se reportaron dos casos positivos de influenza, mientras que en la temporada 2021-2022 se reportaron 930 casos positivos de influenza y 20 defunciones. En otras palabras, a medida que han disminuido las infecciones por SARS-CoV-2 los casos de influenza han ido aumentando.

Los antivirales contra la influenza junto con las vacunas son la primera línea de defensa contra las infecciones por virus de influenza. Se ha demostrado que los antivirales actuales aprobados por la FDA son efectivos contra diferentes subtipos de virus. A pesar de ello, existe una preocupación mundial sobre las mutaciones adquiridas por los virus, que los vuelven resistentes a los diferentes antivirales (Caceres *et al.*, 2022). La medicina

tradicional proporciona una amplia diversidad de plantas que se pueden utilizar como una poderosa herramienta para la prevención de enfermedades, ya que las plantas medicinales tienen una amplia gama de compuestos con capacidades protectoras que ayudan a combatir infecciones virales en diferentes etapas del ciclo de replicación (Akram *et al.*, 2018). Sus compuestos bioactivos representan una alternativa para la generación de nuevos medicamentos seguros que pueden ser clave para encontrar tratamientos con menos efectos secundarios y a su vez mejorar las modalidades terapéuticas disponibles (Nadaf *et al.*, 2019).

Aproximadamente el 30% del mercado farmacéutico y el 11% de los medicamentos esenciales se basan en plantas, por lo que las propiedades antivirales de las plantas medicinales requieren una exploración adicional para ser utilizadas como medios de tratamiento de enfermedades virales (Khuntia *et al.*, 2022). El presente proyecto tiene como objetivo determinar el potencial antiviral de *Erythrostemon yucatanensis* contra el virus de influenza, para lo cual se estableció realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto de corteza de tallo de esta planta y así poder identificar los componentes que le confieren su actividad antiviral.

1 CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

ANTECEDENTES

1.1 Los virus de influenza

Los virus de influenza son una amenaza global para la salud humana debido a que causan epidemias anuales en todo el mundo. Sin embargo, la mayor amenaza para los humanos son los virus de influenza A (VIA), puesto que han sido los responsables de cuatro pandemias entre 1918 y 2009 (Harrington *et al.* 2021). Siendo la pandemia de 1918 la más devastadora con un registro de entre 20 y 40 millones de muertes en todo el mundo (Ayora, 1999). Los cuadros clínicos de influenza pueden variar, desde infecciones asintomáticas o una infección leve de las vías respiratorias, hasta una enfermedad grave con fiebre alta, escalofríos, dolor muscular, neumonía e incluso la muerte (Auladell *et al.*, 2022). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tasa global anual de brotes de influenza oscila entre el 20 % y el 30 % de la población infantil y hasta el 10 % de la población adulta; el número de muertes por influenza es de aproximadamente 290 000 a 650 000 anualmente (WHO, 2022).

Los VIA están conformados por ocho segmentos de ARN los cuales pueden sustituirse mediante reordenamiento genético cuando dos o más virus infectan la misma célula para finalmente producir una nueva variante (Girard *et al.*, 2010). La diversidad de huéspedes y la variabilidad genética fueron responsables de la pandemia de 2009 (H1N1), en la que una serie de eventos de reordenamiento entre los virus H1N1 aviar, H3N2 humano y porcino, produjo una nueva cepa de influenza que a través de los cerdos se transmitió al humano y entre humanos de manera sostenida (Suarez, 2016). Aunque la pandemia de influenza de 2009 fue comparativamente leve en la mayoría de los grupos de edad, los eventos que llevaron a su aparición demuestran lo impredecible de las pandemias de influenza (Neumann and Kawaoka, 2022).

Los VIA (Figura 1.1) pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*; de manera general poseen una morfología esférica debido a su envoltura viral. La envoltura viral está formada por la membrana plasmática de la célula huésped y contiene proteínas en la superficie, las cuales controlan su capacidad de infección. Entre estas, la hemaglutinina (HA) facilita la unión a la célula huésped y la neuraminidasa (NA) libera las nuevas partículas virales de la célula huésped; al mismo tiempo estas dos proteínas son los antígenos que permiten la identificación de los virus de influenza en subtipos (Cauldwell, Long, Moncorgé, & Barclay, 2014). La HA y NA son particularmente variables, puesto que se han descrito 18 subtipos de HA y 11 de NA para la influenza tipo A (Zarubaev *et al.*, 2015a).

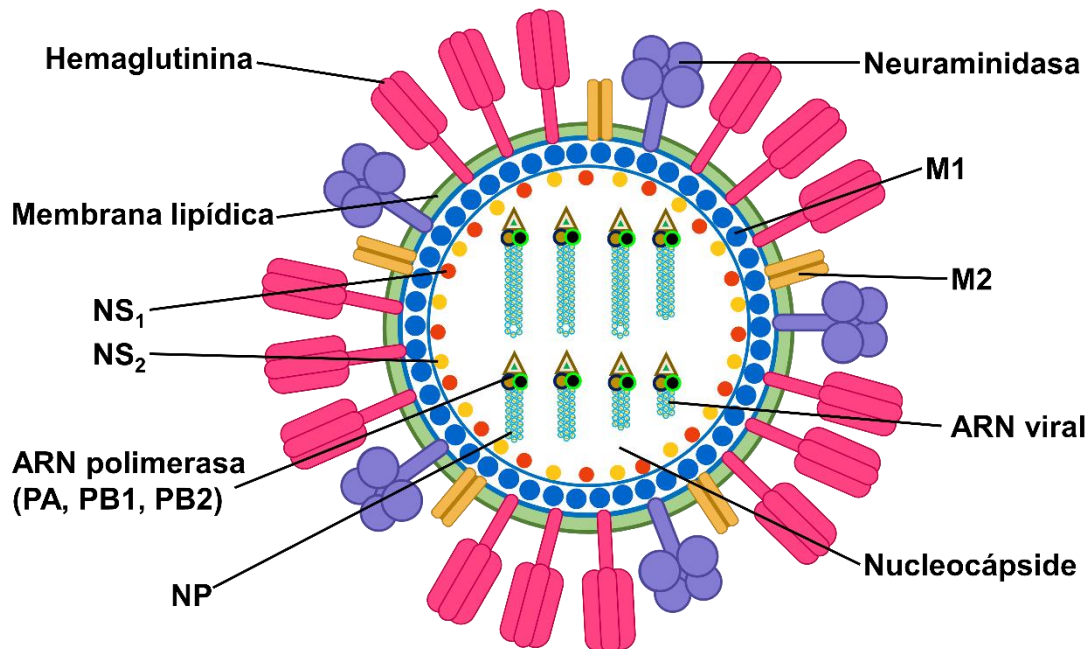


Figura 1.1 El virión de Influenza, está constituido por diez proteínas estructurales diferentes: la Hemaglutinina (HA), la Neuraminidasa (NA), la nucleoproteína (NP), la nucleocápside que contiene a la ribonucleoproteínas (vRNP) (reunión de la NP con el ARN viral), las tres proteínas PB2, PB1 y PA, que forman el complejo ARN polimerasa, la proteína matriz (M1) y el canal iónico (M2). Creado con Biorender.com y Power point.

La otra proteína superficial es la M2, que forma el canal iónico. Debajo de la envoltura de glicoproteínas del virus hay una matriz formada por la proteína M1 que encierra el núcleo (Krammer y Palese, 2015). Dentro de la proteína matriz se encuentra el genoma viral compuesto por 8 segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo y las proteínas de exportación nuclear no estructurales (NS1 y NS2) (Hutchinson, 2018). El ARN viral monocatenario (vARN) está recubierto con nucleoproteínas (NP) formando un complejo con la ARN polimerasa. El complejo ARN polimerasa consta de tres subunidades (PB1, PB2 y PA) y es necesaria para la transcripción del material genético viral durante la replicación del virus de la influenza (Kosik y Yewdell, 2019).

1.2 Ciclo de replicación viral

Los VIA al llegar a las células del epitelio respiratorio inician su proceso de infección utilizando las proteínas en la envoltura viral. El sitio de unión al receptor HA une el virus a los glicoconjugados de superficie que contienen residuos de ácido siálico (AS) terminales (Figura 1.2). Este proceso es asistido por la actividad sialidasa de la NA, que permite suprimir células no productivas y escanear la superficie celular para la unión productiva con receptores sialilados (Krammer y Palese, 2015). A pesar de la falta de información precisa sobre el receptor, se sabe que la HA de los VIA humanos tienen preferencia hacia los enlaces α -2,6 (Figura 1.2 paso 1), mientras que los VIA aviares hacia los α -2,3. Sin embargo, las preferencias de unión de la HA con los enlaces de AS en un huésped en particular, no son esenciales para la infección, pero es más crítico para la transmisión. Esto implica que el "receptor" de los VIA muestra un tropismo celular significativo en las vías respiratorias o que los VIA pueden usar potencialmente más de un receptor (Heida *et al.*, 2021).

La unión al receptor mediada por la HA desencadena la endocitosis del virión (Figura 1.2 paso 1). Una vez dentro de la célula el virus se traslada al endosoma, donde el pH más bajo facilita un cambio conformacional en la HA, exponiendo el péptido de fusión (ubicado en la región HA2) para su inserción en la membrana endosomal (Figura 1.2 paso 2). La conformación de la HA comienza a colapsar, lo que promueve la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal. Luego, el canal iónico (M2) se abre para liberar las ribonucleoproteínas virales (vRNP) de la proteína matriz (M1) al acidificar el interior viral

(pH~5) (Figura 1.2 paso 3) (Skehel & Waterfield, 1975). La HA colapsa aún más conformando un trímero de horquillas para promover la formación del poro de fusión (Figura 1.2 paso 4). En consecuencia, se liberan las vRNP en el citosol (Figura 1.2 paso 5); las señales de localización nuclear expuestas (NLS) en las vRNP son reconocidas por la proteína adaptadora importina- α , lo que lleva al reclutamiento de importina- β (Figura 1.2 paso 6) que dirige a las vRNP al complejo del poro nuclear, donde se transportan al nucleoplasma. (Figura 1.2 paso 7) (Wohlbold y Krammer, 2014). Si bien los procesos de entrada y fusión de los VIA ocurren bastante rápido (~10 min), la importación nuclear puede requerir aproximadamente 1 hora, demostrando que los factores de importación nuclear de la célula hospedera capturan y transportan de manera eficiente a las ribonucleoproteínas virales (vRNP) (Suarez, 2016).

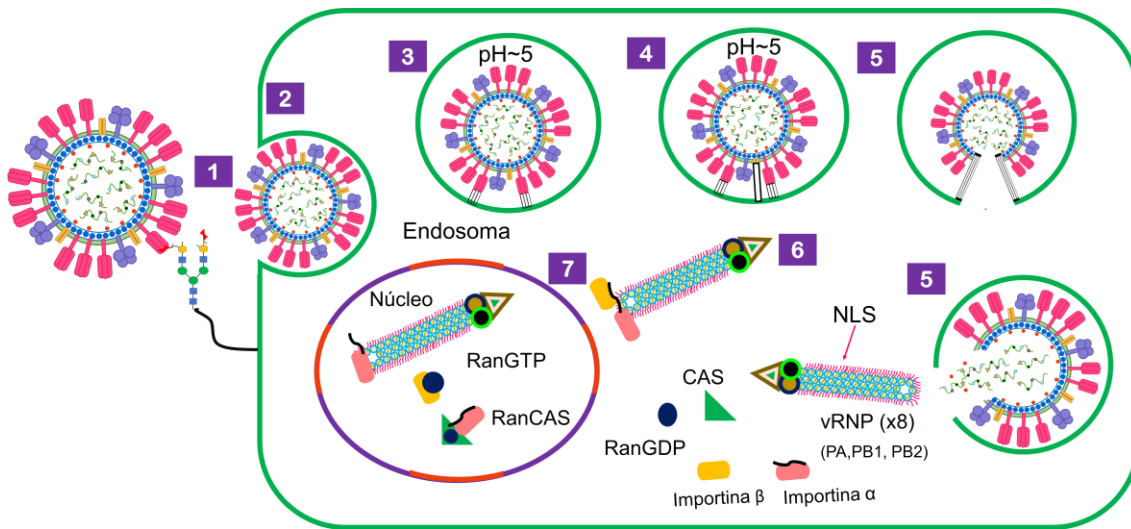


Figura 1.2 Entrada celular mediada por la hemaglutinina viral. Creado con Biorender.com y Power point.

Dentro del núcleo, la transcripción y replicación del ARN viral se lleva a cabo a través de las actividades enzimáticas del complejo de ARN polimerasa unido a las vRNP. Este proceso consta de dos pasos: la transcripción del ARN complementario (ARNc), seguido de la transcripción de nuevas copias de ARNv utilizando los ARNc como moldes. La transcripción del ARNm viral ocurre por la asociación de la ARN polimerasa viral (subunidad PA) con el dominio C-terminal de la ARN polimerasa celular (Cap-ARNm). (Figura 1.3 paso 5). Al final de la replicación, las ribonucleoproteínas virales (vRNP) se

exportan desde el núcleo y se transportan a las regiones de gemación en la membrana plasmática (1.3 paso 6). La síntesis de proteínas IAV depende completamente de la maquinaria de traducción de la célula huésped. Después de la exportación nuclear, la traducción de los ARNm virales se divide entre los ribosomas citosólicos (para PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 y M1) y los ribosomas asociados al retículo endoplásmico (ER) para las proteínas de membrana HA, NA, y M2 (York and Fodor, 2013) (Figura 1.3 paso 7). Después de la síntesis, las proteínas se oligomerizan y son transportadas a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática (Figura 1.3 paso 8) donde la HA y la NA se han co-localizado, con la proteína M2 en el límite de brotación para dar paso al ensamblaje final (Figura 1.3 paso 9) (Shimizu *et al.*, 2011) (Ferhadian *et al.*, 2018). Por último, la NA asiste la liberación de los nuevos viriones llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces glucosídicos (Rossman & Lamb, 2011) (Figura 1.3 paso 10).

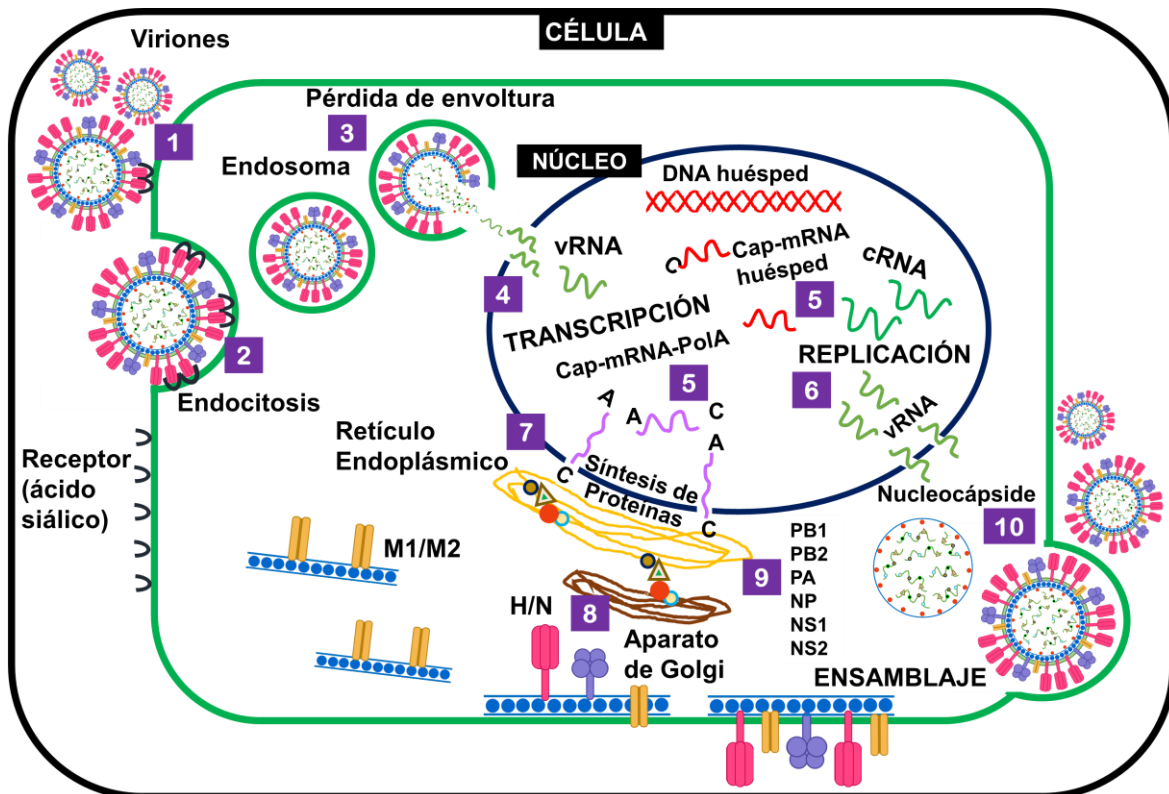


Figura 1.3 Ciclo de replicación del virus de influenza A. Creado con Biorender.com y Power point.

1.3 Variabilidad genética del virus de influenza A (VIA)

Un desafío importante en la lucha contra los VIA es la evolución constante de sus antígenos de la superficie (HA y NA) en respuesta a la presión del sistema inmunitario del huésped (Liu *et al.*, 2019). La naturaleza del genoma segmentado de los VIA permite el intercambio de información genética durante el proceso de infección de una célula, con diferentes virus que pueden provenir de especies animales o humanas. Estas variaciones antigénicas se conocen como deriva antigénica y cambio antigénico (Garten *et al.*, 2009).

La deriva antigénica se refiere a los cambios en los epítopes de las glucoproteínas HA y NA, que surgen por la selección de mutantes con alta frecuencia (Wang *et al.*, 2019). En otras palabras, durante la replicación de los VIA ocurren alteraciones que provocan mutaciones en sus genes. Estas mutaciones virales se producen porque la ARN polimerasa encargada de replicar el genoma viral carece de capacidad de corrección de errores (Figura 1.4) (Erbelding *et al.*, 2018).

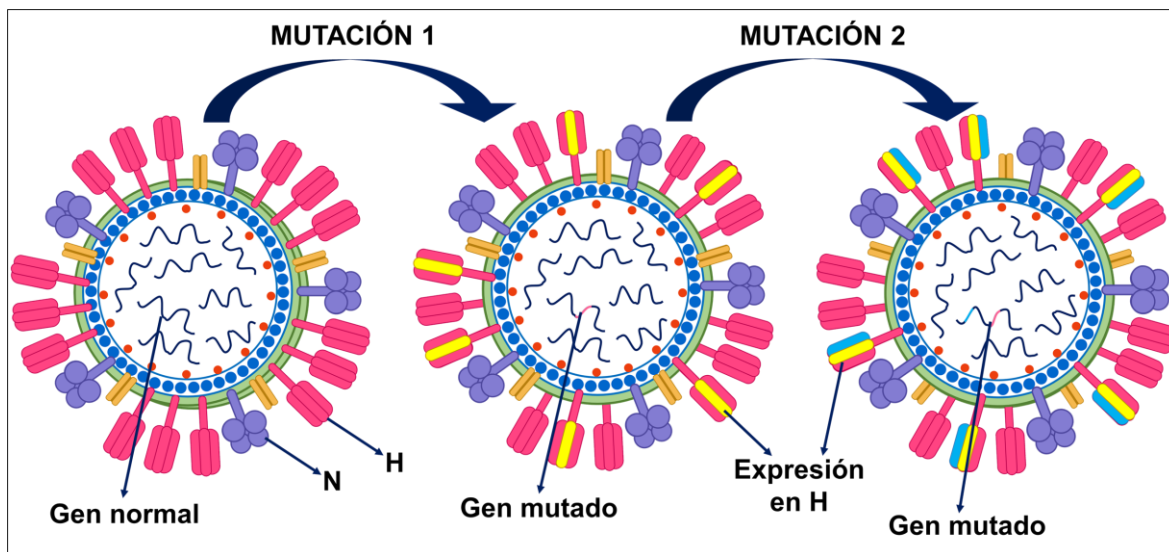


Figura 1.4 Deriva antigénica del virus de influenza A. Creado con Biorender.com y Power point.

La segunda variación antigénica es el cambio antigénico, que da origen a la aparición de nuevas cepas, con antígenos de superficie diferentes a los ya existentes (Klingen *et al.*, 2018). Este se produce cuando ocurre el reordenamiento genético de dos o más subtipos de VIA que infectan simultáneamente a la misma célula (Wang *et al.*, 2019). Por ejemplo, una célula de cerdo es infectada simultáneamente por dos VIA, uno de origen humano (H1N1) y otro de un ave acuática (H3N2). Una vez que todos los genes están dentro de la célula, ocurre un reordenamiento que genera un cruce de los segmentos de ARN viral; dando como resultado una combinación de virus de influenza de los subtipos H3N2, H1N1, H1N2 y H3N1 (Figura 1.5). Estos cambios se producen de manera impredecible y es por ello que surgen importantes epidemias y pandemias en el mundo (Dou *et al.*, 2018).

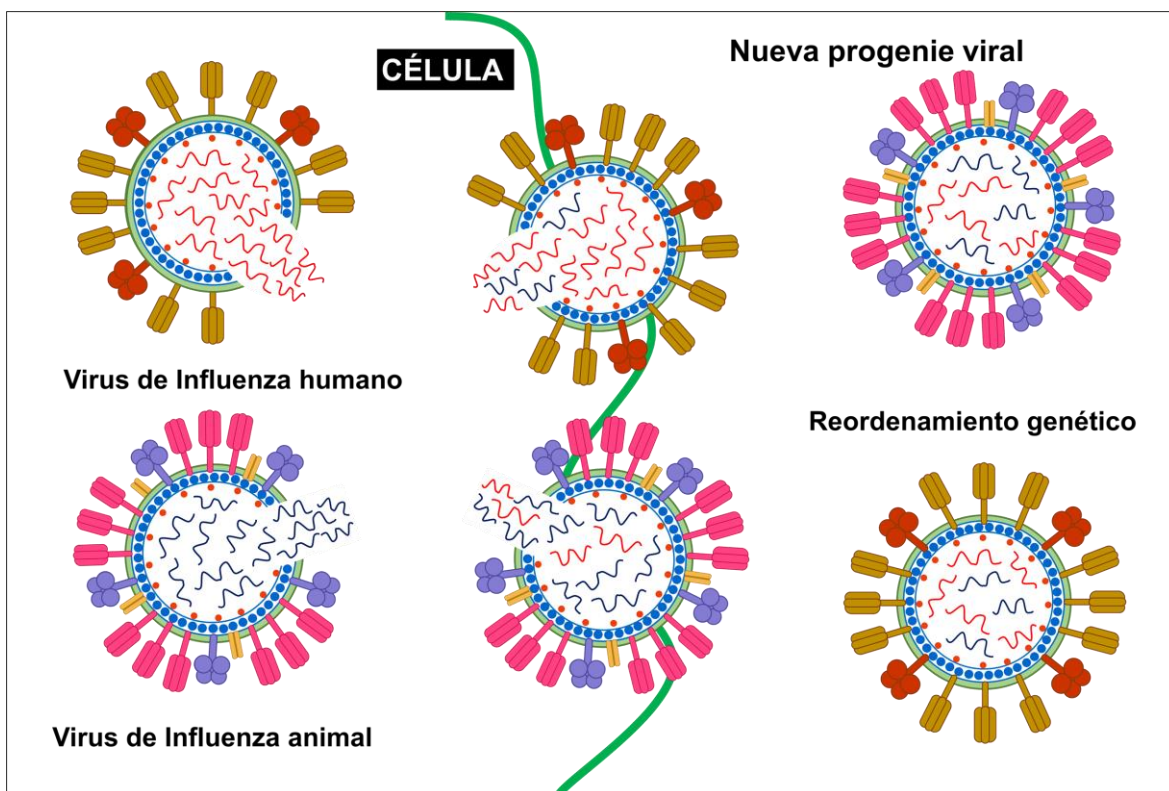


Figura 1.5 Cambios antigénicos del virus de influenza A. Creado con Biorender.com y Power point.

1.4 Tratamientos terapéuticos contra influenza

En la lucha contra los virus de influenza continuamente se realizan investigaciones para desarrollar nuevos agentes antivirales, y vacunas cuyas composiciones se reconfiguran cada año debido a la constante evolución del virus (Kiani *et al.*, 2019). Es así que la utilidad de los antivirales se vuelve más clara cuando se antepone el enorme impacto social y económico de la actual pandemia de COVID-19, a la falta de opciones de vacunas en una población humana altamente susceptible a nuevas enfermedades (Auladell *et al.*, 2022). Por otra parte, la aparición de cepas resistentes vuelve ineficaces a los antivirales disponibles. Por lo que, las nuevas líneas de investigación proponen la identificación de nuevas dianas terapéuticas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos o carbohidratos) con un papel clave durante la infección viral (Zarubaev *et al.*, 2015b).

Los antivirales actuales se pueden clasificar de acuerdo con la etapa del ciclo viral en la que actúan, bloqueando alguna proteína objetivo (Figura 1.6). Primeramente, se hablará de los bloqueadores del canal iónico amantadina y rimantadina, cuya función es bloquear la liberación del ARN viral desde el endosoma hacia el citoplasma. Algunos de los virus que actualmente se encuentran en circulación son resistentes a estos antivirales, por lo que actualmente no se recomienda su uso clínico. Ambos antivirales están aprobados mundialmente, aunque la amantadina no está aprobada en la unión europea (Duwe *et al.*, 2021).

En el caso de los bloqueadores de la Neuraminidasa (INA) éstos actúan bloqueando la liberación de los nuevos viriones de las células infectadas y así detienen la propagación viral. Existen 4 medicamentos utilizados clínicamente: oseltamivir, zanamivir, peramivir y laninamivir; los primeros tres están aprobados para su uso en todo el mundo, incluido EUA y la UE, mientras que Laninamivir únicamente está aprobado en Japón. Los análisis globales de susceptibilidad reducida a los INA revelaron una baja de prevalencia en las últimas diez temporadas. Las dependencias internacionales como la Organización mundial de la Salud (WHO), el Centro para el control de enfermedades (CDC), y la Organización panamericana de la salud (PAHO), recomiendan el uso de los INA para tratar personas hospitalizadas con riesgo de complicaciones (Hayden *et al.*, 2022).

Los inhibidores de la polimerasa dependiente del ARN (vRNP) de los VIA comprenden tres subunidades, la endonucleasa PA, polimerasa PB1, y la subunidad PB2 que participan en la unión con el CAP. Debido a las funciones de este complejo de Polimerasa estas tres subunidades representan objetivos prometedores para desarrollar nuevos antivirales. Solo los inhibidores de PA y PB1 están aprobados para la prevención y tratamiento de la influenza. Baloxavir marboxil inhibe la actividad cap-snatching de la subunidad PA de la polimerasa viral, lo que impide la síntesis del ARNm viral. Ensayos clínicos realizados en pacientes infectados por cepas con modificaciones en la subunidad PA, han mostrado una baja barrera de resistencia al baloxavir marboxil. Este profármaco está aprobado en todo el mundo. El Favipiravir actúa como sustrato alternativo de PB1 incorporándose en el ARN viral lo que genera viriones no viables a través de mutagénesis letal. Sin embargo, a pesar de ser un antiviral de amplio espectro actualmente solo está disponible en Japón (Ison *et al.*, 2021).

Finalmente, los inhibidores de HA no se han desarrollado ni utilizado clínicamente en el mismo grado que otros antivirales. El modo de acción de estos inhibidores es interferir con la unión de la HA al receptor o la fusión mediada por la HA; por lo que, van dirigidos al dominio de unión al receptor o al tallo que contiene al péptido de fusión. El primer fármaco utilizado clínicamente como inhibidor de la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal inducida por la HA fue el Arbidol. Este fármaco de amplio espectro actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III y IV en EUA, y en los cuales no se ha reportado resistencia antiviral (Ginex *et al.*, 2021).

Recientemente, varios compuestos han mostrado una actividad *in vitro* prometedora como inhibidores de la fusión. La *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) es una molécula pequeña que, como el Arbidol, interfiere con la fusión viral. El tallo de HA, al estar más conservado que el dominio de la cabeza, se ha estudiado como un objetivo para anticuerpos ampliamente neutralizantes. Sobre la base de las interacciones moleculares de estos anticuerpos con los epítomos del tallo, se identificó una molécula pequeña, JNJ4796, que imita las interacciones de los anticuerpos del tallo ampliamente neutralizantes. Los inhibidores de la función peptídica como el Flufirvitide-3 que inhibe los subtipos H1, H3, H5 y los virus de influenza B *in vitro* y en hurones, se está evaluando en un ensayo clínico de fase II en EUA.

Los inhibidores del sitio de unión al receptor de la HA, son moléculas que imitan el efecto de los residuos de ácido siálico en los receptores de la célula huésped bloqueando la unión de la HA al receptor celular. Estos incluyen sialilglucopolímeros, sialósidos dendríticos y liposomas que contienen ácido siálico (Bai *et al.*, 2021).

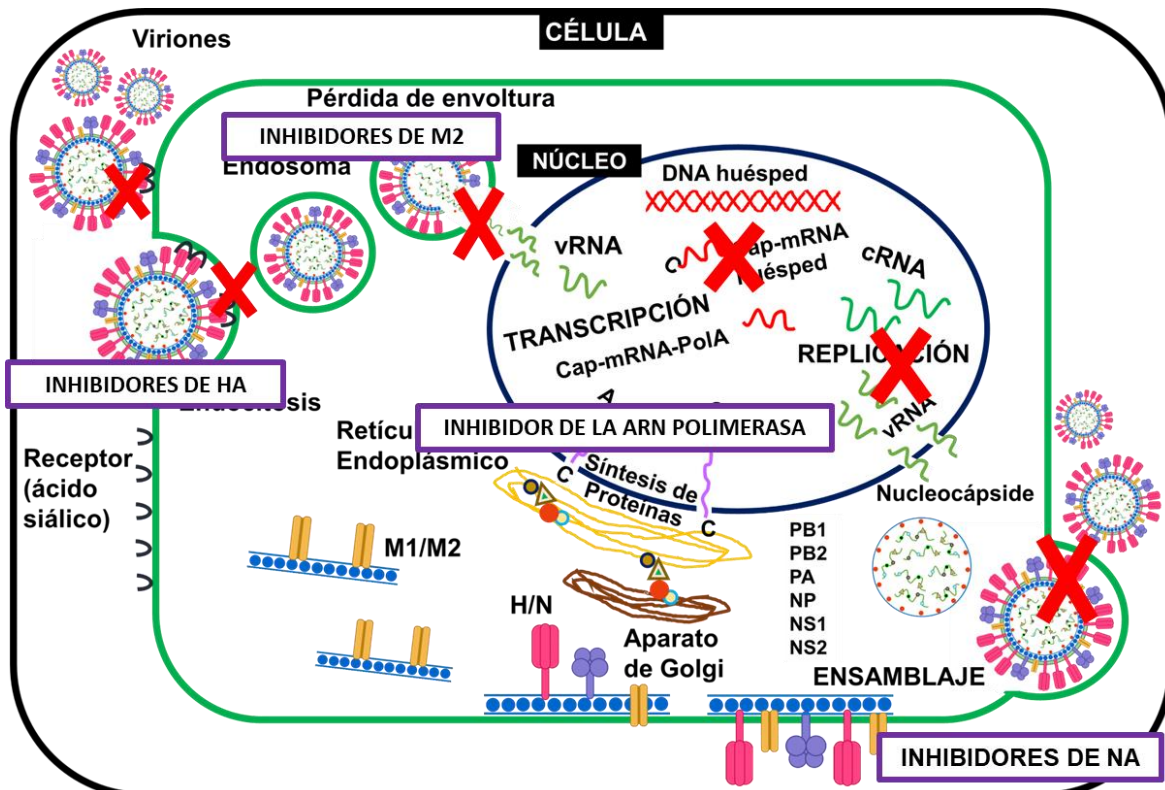


Figura 1.6 Mecanismo de acción de los antivirales actualmente disponibles en el mercado durante el ciclo de replicación del virus de influenza. Creado con Biorender.com y Power point.

1.5 Plantas medicinales como fuente de nuevos antivirales

La rápida evolución de los VIA conduce a una reducción en la eficacia de las vacunas, y la aparición de cepas resistentes vuelve a los medicamentos actuales ineficientes para lograr un efecto terapéutico óptimo. Esto ha impulsado la continua investigación para la búsqueda de nuevos medicamentos antivirales (Flerlage *et al.*, 2021). Varios enfoques han sido utilizados con este objetivo, incluido el uso de productos naturales para el desarrollo de nuevos antivirales (Nielsch *et al.*, 2016).

Se han descubierto fármacos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades mediante el cribado de compuestos naturales de animales, microorganismos, organismos marinos y plantas. (Yin *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso de plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad, cuando el hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y remedios para mejorar su salud (Akram *et al.*, 2018).

Los productos naturales con potencial actividad antiviral para el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por virus (Influenza, COVID-19), representan una de las alternativas de preparación para el control y la prevención de futuras pandemias. El Ácido shikímico un producto natural que fue aislado e identificado a partir del fruto de la planta japonesa *Illicium religiosum*, sirvió como material de partida para la síntesis del fármaco Tamiflu (inhibidor de la neuraminidasa), que se utiliza en el tratamiento y la profilaxis de los virus de la influenza A y B (Rawat *et al.*, 2013). En la actualidad, el 25% de los medicamentos prescritos son de origen vegetal; así, varios medicamentos contra el cáncer y antiinfecciosos se han obtenido a partir de productos vegetales. Cabe mencionar que, en muchas partes del mundo, la gente sigue utilizandolas plantas tradicionales y sus productos para su salud, su modo de vida y su atención sanitaria primaria; se han registrado aproximadamente 2.500 especies de plantas medicinales en todo el mundo para tratar una gran variedad de dolencias y enfermedades (Kapoor *et al.*, 2017).

Las plantas tienen una variedad de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos, lignanos, cumarinas y alcaloides que tienen diversas actividades antiinfecciosas, así como actividades antioxidantes (Akram *et al.*, 2018). Se han reportado varios estudios de estos fitoquímicos que exhiben propiedades antivirales con diferentes virus como dengue, zika, chikungunya, hepatitis, rotavirus, herpes, influenza, VIH y VPH (Oliveira *et al.*, 2017).

Los flavonoides constituyen compuestos polifenólicos secundarios en las plantas que poseen actividad antioxidante, antibacterial y antiviral. Están ampliamente presentes en muchas frutas, semillas y vegetales como resultado del estrés abiótico (Zakaryan *et al.*, 2017). Las investigaciones más recientes sobre flavonoides se han centrado en los aspectos de su consumo en la salud humana. Especialmente, se han investigado diferentes flavonoides naturales que exhiben propiedades antivirales (Wang *et al.*, 2020). Se ha informado que la quercetina, un flavonol ampliamente distribuido en las angiospermas, presenta varios mecanismos de acción contra diferentes virus, como inhibición de la replicación del virus del dengue (Zandi *et al.*, 2011), inhibición de la fusión del VIA (H1N1, H3N2 y H5N1), mediante bloqueo de la unión de la HA (Wu *et al.*, 2015).

La Baicaleína un metabolito bioactivo proveniente de *Scutellaria baicalensis*, posee actividad anti-neuraminidasa contra las cepas A/FM1/1/47(H1N1) y A/Tailandia/K(H3N2) (Gao, Zu, Wu, Liu, & Du, 2011; Xu, Dou, Zhang, Guo, & Zhou, 2010). Las catequinas EGC y EGCG provenientes del té verde mostraron efectos inhibitorios sobre la acidificación de endosomas y lisosomas contra los virus de influenza A y B (Roomi *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014). Otro flavonoide que ha sido reportado con actividad antiviral contra influenza es la luteolina, un cristal amarillo, abundante en varias hierbas medicinales, frutas y verduras, que presentó inhibición de la neuraminidasa en la cepa A/Jinan/15/90 (H3N2) (Liu *et al.*, 2016); también se reportó que inhibe la fusión celular, interfiriendo en las primeras etapas del ciclo viral de las cepas A/Jiangxi/312/2006 (H3N2) y A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1) (Yan *et al.*, 2019).

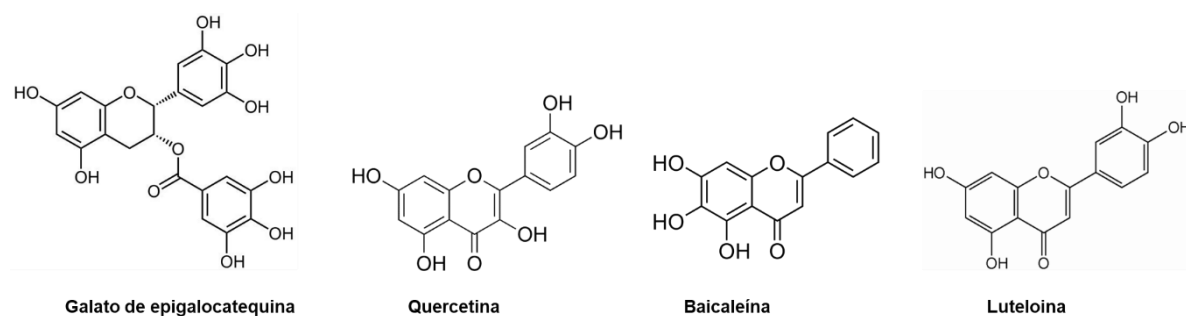


Figura 1.7 Estructuras de flavonoides reportados con actividad antiviral. Creado con ChemDraw y Power point.

Los alcaloides son metabolitos secundarios nitrogenados, que son sintetizados por las plantas a partir de aminoácidos. Los alcaloides generalmente están presentes en las plantas superiores y poseen varias actividades biológicas como anticancerígenas, antibacterianas, antivirales y antiasmáticas (Qiu *et al.*, 2014). En un estudio, se informó que la homonojirimicina (HNJ), un alcaloide extraído de *Commelina communis*, exhibe una fuerte actividad inhibitoria contra la infección por influenza en estudios *in vivo*, en los que los ratones infectados con la cepa A/PR/8/34 virus (H1N1) mostraron una buena tasa de supervivencia (Zhang *et al.*, 2013).

La dendrobina, un alcaloide de la planta *Dendrobium nobile*, tiene la capacidad de unirse a la nucleoproteína (NP), restringiendo la exportación nuclear, evitando así la replicación ARN viral en cepas del VIA, incluidas A/FM-1/1/47 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 H274Y (H1N1) y A/Aichi/2/68 (H3N2). Además, se demostró que los efectos sinérgicos de la dendrobina y el zanamivir inhiben significativamente la replicación del virus de la influenza A (Li *et al.*, 2017). La hirsutina, un alcaloide aislado de *Mitragyna hirsuta* fue reportado con actividad antiviral contra A/Philippine/2/82 (H3N2), inhibiendo la replicación viral (Takayama *et al.*, 1997). La berberina extraída de las raíces de *Hidrastis canadensis*, inhibió el crecimiento de las cepas de influenza A/PR/8/34 (H1N1) y AWS/33A (H1N1). Se sugirió que el posible mecanismo era un efecto postraduccional que estaría inhibiendo el tráfico/maduración de las proteínas del virus (Cecil *et al.*, 2011). Los alcaloides, con su efecto inhibitor sobre la replicación del virus de la influenza, pueden considerarse moléculas prometedoras, aunque se requieran estudios más completos para poder utilizarse en el futuro (Moradi *et al.*, 2018).

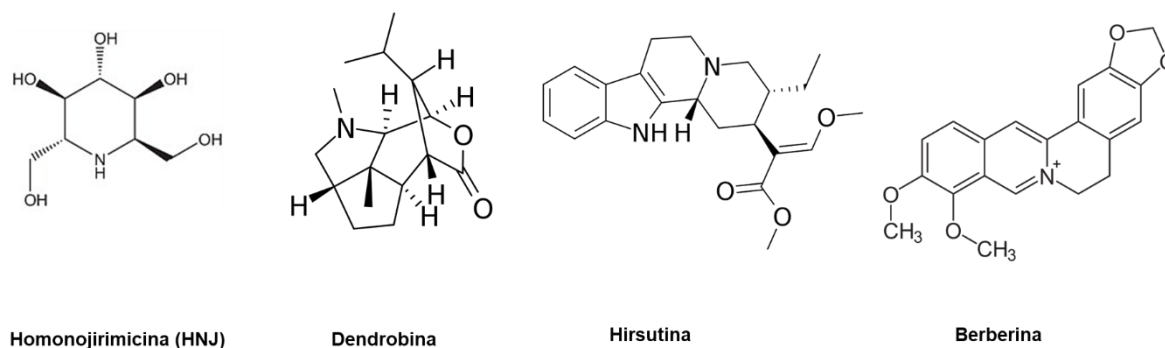


Figura 1.8 Estructuras de alcaloides reportados con actividad antiviral. Creado con ChemDraw y Power point.

Los terpenos están formados por 5 unidades de carbono o unidades de isopreno con hidrocarburos simples; pertenecen a la categoría más grande de metabolitos secundarios. Por otro lado, los terpenoides son solo formas modificadas de terpenos con varios grupos funcionales en diferentes posiciones. Los terpenoides, también llamados isoprenoides, son compuestos naturales presentes en las plantas y tienen un papel importante en productos farmacéuticos, terapéuticos y tratamientos a base de hierbas (Perveen *et al.*, 2018).

Los triterpenoides dilucidados de plantas y otros organismos tienen diversas actividades biológicas, incluida actividad antiviral. En un estudio realizado por Yu *et al.* (2014) informaron sobre ciertos triterpenos pentacíclicos (Y3, Q8, Figura 1.9) que exhiben características de estructura conservada y con actividad antiviral *in vitro* contra el virus de influenza A/WSN/33 (H1N1); los estudios de acoplamiento molecular indicaron que los triterpenoides se unen fuertemente a la HA, interrumpiendo la interacción de esta proteína con el receptor de ácido siálico y, por lo tanto, la unión del virus a la célula huésped (Yu *et al.*, 2014).

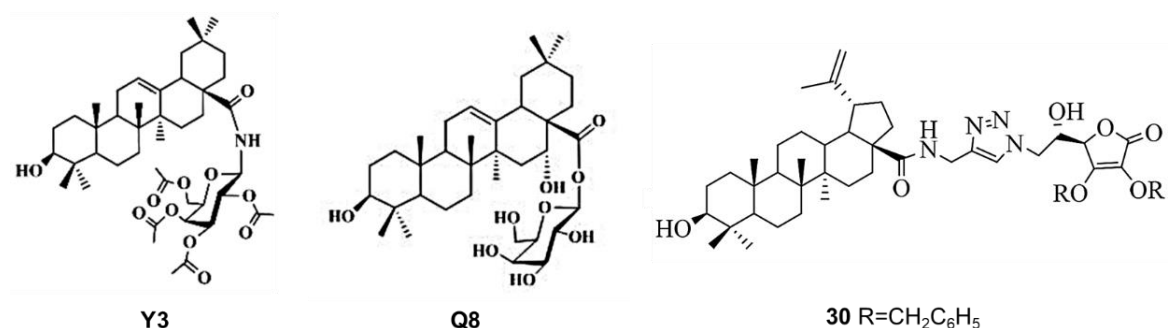


Figura 1.9 Estructuras de triterpenoides reportados con actividad antiviral (Wang *et al.*, 2016, Yu *et al.*, 2014).

En otro estudio realizado con triterpenos pentacíclicos conjugados con ácido ascórbico, los derivados obtenidos fueron evaluados contra el virus A/WSN/33 en células MDCK. El derivado de ácido betulínico (30, Figura 1.9) mostró la actividad antiviral más significativa; y de acuerdo con los resultados de los ensayos biológicos encontraron que el mecanismo de acción es sobre las etapas tempranas del ciclo de replicación viral.

Finalmente, con análisis de acoplamiento molecular, determinaron que inhibía la entrada viral, mediante el bloqueo de la HA (H. Wang *et al.*, 2016). Los triterpenoides y los esteroides en general son componentes naturales que entre sus propiedades biológicas incluyen actividad antiviral. Diversos estudios realizados informan su capacidad de unirse fuertemente a la HA, interrumpiendo la unión del virus a los receptores celulares (Kazakova *et al.*, 2010; Mehrbod *et al.*, 2021).

1.6 *Erythrostemon yucatanensis*

El género *Erythrostemon* pertenece al grupo *Caesalpinia*, un gran clado pantropical que comprende unas 205 especies de plantas de la subfamilia *Caesalpinioideae* (*Leguminosae*). La delimitación de sus géneros ha sufrido cambios considerables, y la actual clasificación del grupo *Caesalpinia* basada en la filogenia reconoce 26 géneros, incluido *Erythrostemon*, que comprende 31 especies, todas ellas ampliamente distribuidas en el sur de Estados Unidos, México y América Central (Gagnon *et al.*, 2016). Los géneros pertenecientes a este grupo son poco conocidos, no obstante, los árboles o arbustos de este grupo son ampliamente utilizados en la medicina tradicional por sus propiedades medicinales. Es así que en los últimos años se han realizado investigaciones en diferentes plantas pertenecientes a este grupo, donde se informa acerca de sus actividades biológicas.

En un estudio realizado por Rosado-Aguilar *et al.* (2017) informaron de la actividad acaricida de los extractos metanólicos de las hojas de *Cenostigma gaumeri* (Rosado-Aguilar *et al.*, 2017). Por otro lado, *Biancea sappan*; ha mostrado en diferentes estudios tanto actividad antiviral (A. Liu, Shu, Qin, Lee, & Du, 2009) como antioxidante (Meiyanto *et al.*, 2019). En otras plantas de este grupo se han identificado propiedades que incluyen, analgésicos y antihiper glucémicos (*Guilandina bonduc*) (Liu *et al.*, 2020), antidiabéticas y antituberculosas (*Moullava digyna*) (Kumar *et al.*, 2012), antiinflamatoria (*Caesalpinia pulcherrima*) (Rao *et al.*, 2005), y para el tratamiento de diferentes afecciones como la lepra (*Caesalpinia crista*) (Gaurav *et al.*, 2020), el resfriado común y asma (*Caesalpinia minax*) (Maurya *et al.*, 2012). Sin embargo, aún falta un gran camino por recorrer para que las plantas medicinales puedan ser reconocidas y aplicadas como tratamientos efectivos contra diversas enfermedades.

Erythrostemon yucatanensis (Greenm.) Gagnon & GP Lewis, *taa k'in che* (nombre maya), es un árbol que llega a medir hasta 10 metros de altura y se encuentra distribuido ampliamente en la selva mediana subperennifolia, en la selva baja caducifolia y en la vegetación secundaria de la Península de Yucatán (Solís-Rodríguez *et al.*, 2020), donde se utiliza ampliamente como leña y sus flores para la producción de miel (Quiroz-Carranza *et al.*, 2010). En la medicina tradicional maya la infusión de sus ramas se utiliza para el tratamiento de enfermedades de filiación cultural (mal aire) (Martha *et al.*, 2014).

Como parte de la búsqueda de metabolitos biológicamente activos con base en su uso en la medicina tradicional Maya, se realizó un cribado en la flora del sureste de México, y se encontró que el extracto metanólico de la corteza de tallo de *E. yucatanensis* (Greenm.) posee actividad antiviral contra el virus de Influenza A(H1N1) en etapas tempranas del ciclo de replicación viral (Cetina-Montejo, 2012). Posteriormente, se realizó el fraccionamiento del extracto de la corteza de tallo y se estudió su actividad antiviral contra cepas de influenza A (H1N1), concluyendo que las fracciones de baja polaridad del extracto presentan actividad antiviral a nivel de co-tratamiento en el ensayo de reducción de efecto citopático contra las cepas de virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) y A/México/INDRE797/10 (H1N1). Una de las fracciones, (B4), presentó hasta 90% de inhibición de unidades formadoras de placas. Estos resultados indican que los componentes bioactivos obtenidos a partir del extracto de tallo de *E. yucatanensis* podrían estar bloqueando la entrada del virus a la célula (May-May, 2013). En el presente trabajo se pretende determinar la potencial actividad antiviral del extracto de la corteza de tallo *E. yucatanensis*; en las etapas tempranas del ciclo de replicación viral

JUSTIFICACIÓN

El riesgo latente del surgimiento de una epidemia o pandemia a causa de un nuevo virus, es bastante alto. La pandemia causada por el SARS-CoV-2 demostró la carencia de estrategias para el control y prevención de enfermedades emergentes. Si bien las estrategias de mitigación no farmacéuticas (distanciamiento social, restricciones de viaje y movimiento, medidas de higiene) han reducido la circulación de la influenza, este tipo de estrategias se ven limitadas por su deficiente cumplimiento y por aplicarlas de manera tardía. Las enfermedades respiratorias como la influenza son un problema de salud global. Debido a la capacidad que tienen los virus de evolucionar constantemente les permite escapar de la respuesta inmune de los organismos hospederos, haciendo que las vacunas y los antivirales actualmente disponibles sean ineficaces. Por tal motivo, es de suma importancia la búsqueda de nuevos esquemas para el tratamiento de la influenza debido a la resistencia que desarrollan los virus a los tratamientos actuales. Las plantas medicinales representan una alternativa viable que han mostrado gran potencial para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos a través del conocimiento de la medicina tradicional.

HIPÓTESIS

Los componentes obtenidos de la corteza del tallo de *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis presentan actividad antiviral contra cepas del virus de Influenza A (H1N1) mediante la inhibición de la proteína viral hemaglutinina, y la modificación química de estos metabolitos podría provocar cambios en su actividad biológica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar los componentes de *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis con actividad anti-hemaglutinina y determinar el efecto de la modificación estructural en su actividad biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Fraccionar de manera biodirigida el extracto crudo de la corteza del tallo de *Erythrostemon yucatanensis*.
- ✓ Elucidar la estructura química de los componentes aislados de manera biodirigida.
- ✓ Evaluar la actividad anti-hemaglutinina de los componentes identificados.
- ✓ Determinar el efecto de la modificación estructural de los componentes con actividad anti-hemaglutina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El diagrama de la estrategia experimental se resume en cuatro fases (Figura 1.11):

1. Preparación de material vegetal para la extracción.
2. Fraccionamiento biodirigido del extracto hasta aislar los componentes bioactivos.
3. Identificación y modificación química de los componentes bioactivos aislados.
4. Evaluación biológica de los componentes identificados y sus derivados.

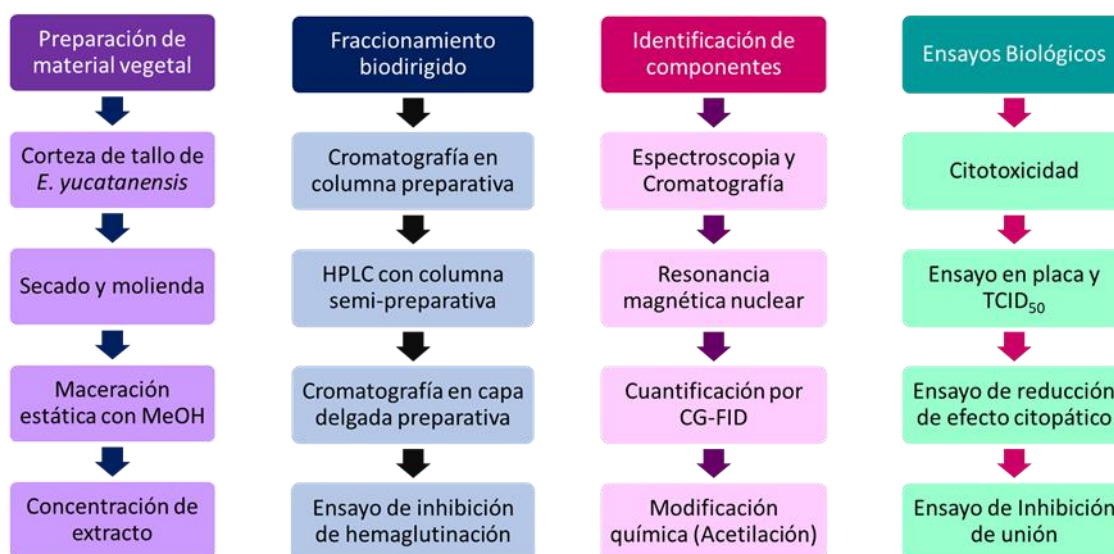


Figura 1.10 Diagrama de estrategia experimental a seguir para el aislamiento e identificación de los componentes con actividad anti-HA presentes en la corteza de tallo de *Erythrostemon yucatanensis*.

2 CAPÍTULO II

FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO DE CORTEZA DE TALLO DE *ERYTHROSTEMON YUCATANENSIS* (GRENM) GAGNON & GP LEWIS

2.1 INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad cuando el hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y remedios para mejorar su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió acerca de las plantas curativas y este conocimiento se transmitió a través de los siglos (Akram *et al.*, 2018). En los últimos años las formulaciones farmacológicas relacionadas con las plantas están siendo muy valoradas para tratar infecciones virales. Los componentes químicos identificados en diferentes plantas han mostrado actividad antiviral gracias a sus efectos biológicos, ya que a través de diversos análisis se encontró que estos componentes bioactivos logran bloquear el ciclo de replicación viral en diferentes etapas (Oliveira *et al.*, 2017). Algunos de estos componentes, se dirigen a la envoltura viral, otros a las proteínas de membrana viral, otros son capaces de inhibir la formación del genoma viral o detienen la unión de los viriones a la maquinaria celular del huésped y por consiguiente su reproducción. Otros más han logrado destruir enzimas necesarias para la codificación viral (Kapoor *et al.*, 2017).

El desarrollo de nuevos agentes con potencial terapéutico a partir de compuestos bioactivos de origen natural, representa uno de los objetivos principales de la investigación médica actual (Flerlage *et al.*, 2021). Por lo que, en la búsqueda de posibles candidatos con actividad antiviral, los extractos de plantas se someten a procesos de separación utilizando tanto técnicas cromatográficas y ensayos biológicos que sirven como guía para el aislamiento de los componentes de interés. En estudios anteriores se reportó que el extracto de corteza de tallo de *E. yucatanensis* reducía el efecto citopático a nivel de co-tratamiento de dos cepas de virus de influenza AH1N1(A/Yucatán/2370/09, A/México/INDRE797/10 resistente a oseltamivir) (Cetina-Montejo, 2012; May-May, 2013) de modo que los componentes en *E. yucatanensis* podrían estar bloqueando la unión del virus a la célula huésped mediante la inhibición de la HA viral.

En el caso del Virus de Influenza A, la proteína viral HA es la responsable de la unión del virus al receptor de la célula huésped (De Graaf *et al.*, 2014). Por lo tanto, en el presente capítulo se describe el fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de la corteza de tallo de *E. yucatanensis* empleando el ensayo de inhibición de hemaglutinación (IHA), para determinar si los componentes presentes en las fracciones del extracto bloquean la actividad de unión de la HA viral, y así aislar los componentes con actividad antiviral contra los Virus de influenza AH1N1 A/Yucatán/2370/09 y A/México/INDRE797/10.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colecta y procesamiento del material vegetal: Extracto metanólico (EY)

Las muestras de material vegetal de la corteza de tallo de *E. yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis se recolectaron en el municipio de Oxcutzcab, Yucatán. Con ayuda del M. C. Francisco Chí May, taxónomo de la unidad de Recursos Naturales del CIEY (Figura 2.1) se realizaron 3 colectas; la primera el 15 de noviembre de 2018, la segunda el 14 de mayo de 2019 y la tercera el 6 de junio de 2019. Una vez obtenidas las ramas se procedió a recuperar la corteza de los tallos y se colocó en una cámara de secado con luz artificial a una temperatura de 60°C durante 72 horas. Posteriormente, la corteza seca fue sometida a un proceso de molienda con un molino de cuchillas marca Pagani utilizando la malla #5, finalmente el material vegetal resultante fue pesado y almacenado en bolsas herméticas a -20°C para su posterior uso.



Figura 2.1 *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis (nombre maya: taa k'in che) fotos tomadas en el jardín botánico Roger Orellana del Centro de investigación científica de Yucatán, en enero del 2019.

La corteza de tallo seca y molida fue extraída mediante maceración estática con metanol (MeOH) grado industrial durante 24 horas a temperatura ambiente. Este proceso se repitió 3 veces. El extracto obtenido se filtró y concentró a presión reducida y temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 700 (Figura 2.2). El extracto crudo fue almacenado a 4°C en frascos de vidrio herméticos y protegidos de la luz natural, para posteriormente ser fraccionado de manera biodirigida mediante técnicas de cromatografía líquida con ayuda del ensayo de inhibición de hemaglutinación.



Figura 2.2 Maceración estática con metanol de la corteza del tallo de *E. yucatanensis*, filtración y concentración del extracto crudo metanólico en un rotavapor a presión reducida.

2.2.2 Ensayo de inhibición de hemaglutinación (IHA)

Los virus de la influenza tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos a través de la interacción de la HA, con receptores de ácido siálico en la superficie de los eritrocitos. Con suficientes partículas virales, la interacción entre ambos forma una red que evitarán que estos precipiten como un pequeño sedimento en el fondo de una placa de microtitulación (Figura 2.3). La inhibición de la reacción de aglutinación por antisueros específicos del subtipo HA es la base del ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA).

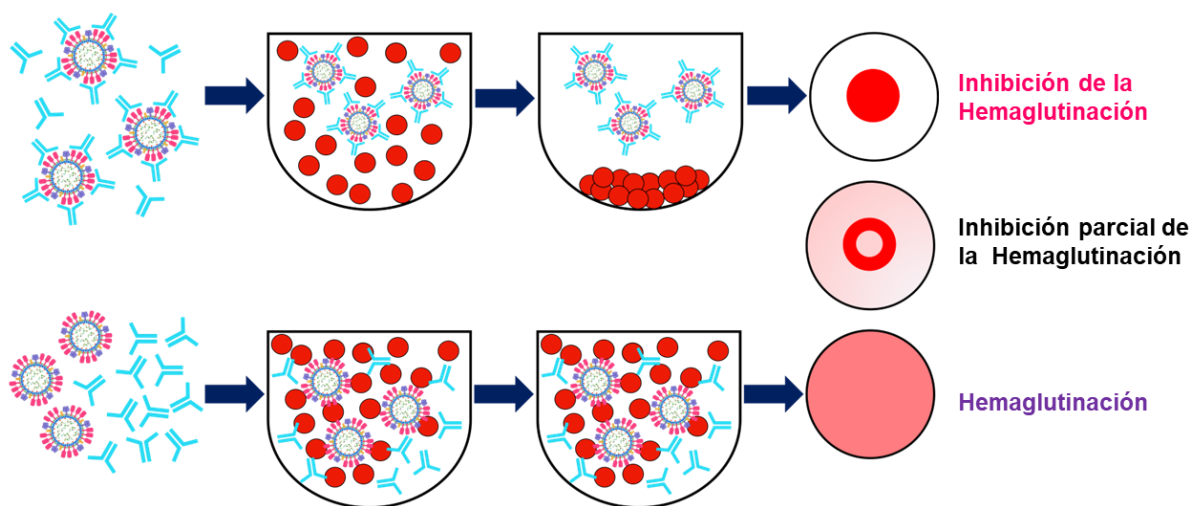


Figura 2.3 Interpretación de resultados obtenidos en placa para los ensayos de inhibición de hemaglutinación (Creada con Power point).

Se empleó el ensayo IHA para el fraccionamiento biodirigido de los componentes con actividad antiviral para lo cual las fracciones a evaluar se prepararon en viales ámbar a una concentración de 10 mg/mL en dimetil sulfóxido estéril (DMSO, Sigma-Aldrich). Para el ensayo IHA se utilizaron dos cepas de virus de influenza (H1N1): A/Yucatán/2370/09 y A/México/INDRE797/10. Cabe mencionar que estas dos cepas son virus pandémicos aislados durante la pandemia de 2009 en México. Se prepararon diluciones dobles seriadas en solución salina de fosfatos, PBS pH 7.2 (Invitrogen) de cada una las fracciones a evaluar (100, 50, 25, 12.5 µg/mL). El proceso consistió en mezclar 25 µL de virus a 4 UHA con 25 µL de las fracciones de extracto y se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 4°C en placas de 96 pozos con fondo "U". Después, se agregaron 50 µL de una solución al 1% de eritrocitos de pava recién colectados y se incubaron nuevamente durante 1 hora a 4°C.

Los pocillos que muestren hemaglutinación completa se registran como positivos para HA, mientras que los pocillos con una formación de botón se registran como negativos para HA, es decir, positivos para la inhibición de HA; los pocillos con formación parcial del botón (márgenes borrosos o aspecto de dona) se registran como hemaglutinación incompleta (Figura 2.2). Los controles utilizados para el ensayo incluyeron eritrocitos, virus más eritrocitos y fracciones de extracto más eritrocitos. La densidad óptica de las fracciones (y sus respectivos controles) se midieron a 700 nm en un lector de placas. La ecuación 1 estima el porcentaje de inhibición de hemaglutinación.

$$IHA\% = \frac{DO_F - DO_V}{DO_E - DO_V} * 100\%$$

DO_F= densidad óptica de las fracciones

DO_E= densidad óptica de los eritrocitos

DO_V= densidad óptica de virus

IHA%= porcentaje de inhibición de hemaglutinación

Ecuación 1 Porcentaje de inhibición de hemaglutinación (IHA)

2.2.3 Fraccionamiento biodirigido del extracto EY

El extracto EY fue sometido a procesos de fraccionamiento con el objetivo de identificar y cuantificar posibles candidatos con potencial terapéutico contra cepas de virus de Influenza A. La cromatografía comprende una serie de técnicas que han sido utilizadas ampliamente para separar los diferentes componentes presentes en extractos vegetales de interés. Su fundamento consiste en un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho fijo de gran desarrollo superficial (fase estacionaria) y la otra un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo del lecho fijo. Para fines del presente proyecto las dos fases se eligieron de tal forma que los componentes después de ser separados se lograron analizar de manera cualitativa y cuantitativa; además se utilizaron técnicas de cromatografía de adsorción sólido-líquido para finalmente establecer un método cromatográfico para la adecuada separación de los componentes con actividad anti-hemaglutinina. A continuación, se describen los diferentes métodos empleados.

2.2.3.1 Cromatografía en capa delgada (CCD y cromatografía en capa delgada preparativa CCD-P)

La CCD se basa en el principio clásico de la cromatografía de adsorción donde los componentes de una mezcla se separan por afinidades diferenciales. La fase estacionaria es normalmente gel de sílice que recubre una superficie de placa inerte (vidrio o aluminio). Se deposita una pequeña cantidad de la muestra en un extremo de la placa, que se coloca verticalmente en una cámara cerrada con un disolvente orgánico (fase móvil). La fase móvil se desplaza hacia arriba por capilaridad y los componentes de la muestra migran a distancias variables en función de su afinidad por las fases estacionaria y móvil. Cuando el disolvente llega a la parte superior de la placa, ésta se retira de la cámara de desarrollo y se deja secar en una campana de extracción de humos. Los componentes separados aparecen como puntos en la placa, y se evalúa el factor de retención (RF) de cada componente (ecuación 2).

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el componente}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Ecuación 2 El factor de retención (Rf).

En general, cuanto más fuerte se une un compuesto a la fase estacionaria adsorbente, más despacio se desplaza hacia arriba en la placa. Las fracciones de interés se analizaron mediante cromatografía en capa delgada (CCD) de fase normal para lo cual se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60F254 de 0.2mm de espesor y soporte de aluminio de la marca Merck. La visualización de los componentes se ejecutó en una cámara UV, 245 y 365 nm de longitud de onda (Chromato-Vue® C-75), como revelador se empleó una solución al 4% de ácido fosfomolibdico con sulfato cérico en ácido sulfúrico al 5%. Para la cromatografía en placa preparativa se usaron placas de TLC de vidrio Sílica gel 60 F₂₅₄ 25 (20×20 cm) con sistema de elución de fase normal. La placa es depositada en una cámara cromatográfica con el sistema de elución seleccionado para después ser transferida a una campana de extracción de humos. Una vez que los disolventes se evaporan de la placa, la placa es observada bajo luz UV (onda larga y corta), delineando las bandas de interés con un lápiz, para el caso que los compuestos de interés adsorban luz ultravioleta. En caso contrario, una sección de la placa es cortada con un cincel con punta de diamante, siendo esa sección revelada con la solución de ácido fosfomolibdico, para localizar las bandas de interés en la placa restante. Una vez localizadas las bandas de interés, el gel de sílice adherido a la placa es removido con mucho cuidado con ayuda de una espátula o bisturí y el polvo obtenido, transferido a un matraz erlemeyer. Para extraer los componentes, la gel de sílice (polvo) se disolvió en diclorometano (CH₂Cl₂) y se soncó durante 15 min; finalmente se filtró y concentró a presión reducida a una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 700. Las fracciones obtenidas se almacenaron en viales color ámbar previamente tarados a 4°C y protegidas de la luz.

2.2.3.2 Cromatografía de partición

La cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido se fundamenta en el fenómeno de distribución de una mezcla de solutos (fracciones o muestras que se desean separar) entre dos fases inmiscibles. El reparto o distribución del soluto tiene lugar atendiendo a la solubilidad preferencial de los componentes entre la fase estacionaria y la fase móvil, lo cual depende de su polaridad. La cromatografía de partición líquido-líquido se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Borges-Argáez y colaboradores en el año 2002. Este proceso consistió en una extracción sucesiva de tres repeticiones con disolventes grado industrial, utilizando un embudo de separación y un sistema de elución

de fase normal con Hexano, Metanol y Acetonitrilo (Hx/MeOH/ACN) a una proporción 3:1:1 v/v/v, obteniéndose 2 fracciones de diferentes densidades que fueron concentradas a presión reducida a una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 700. Los respectivos extractos orgánicos obtenidos se depositaron en frascos de vidrio herméticos previamente tarados y se almacenaron a 4°C para posteriormente ser utilizadas.

2.2.3.3 Cromatografía líquida de vacío (CLV)

La CLV se recomienda mayormente para el fraccionamiento de extractos crudos, sin embargo, en algunas ocasiones se ha utilizado para aislar compuestos puros. Debido a que es una técnica de menor complejidad comparada con otras técnicas cromatográficas es ampliamente utilizada para la separación de metabolitos secundarios de plantas. En la CLV la fase móvil fluye a través de la fase estacionaria asistida por vacío, para este proceso se utilizó Gel de sílice 60 de un tamaño de malla de 200-400 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) como fase estacionaria y disolventes de grado industrial Metanol (MeOH), Acetato de etilo (AcOEt) y Hexano (Hx) como fase móvil. En un embudo Buchner, el gel de sílice previamente disuelto en Hx, se empacó bajo vacío para obtener la máxima compresión de partículas. Los extractos crudos y fracciones se aplicaron en seco y fueron procesadas con sistemas de elución de polaridad ascendente con disolventes de grado industrial siguiendo una elución escalonada, es decir, se va aumentando escalonadamente la proporción del disolvente polar a medida que los productos menos polares vayan eluyendo de la columna. Las subfracciones resultantes se concentraron a presión reducida a una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 70, luego fueron almacenadas en viales color ámbar previamente tarados a 4°C y protegidas de luz.

2.2.3.4 Cromatografía en columna flash (CCF)

El fundamento de la CCF consiste en hacer pasar la fase móvil o eluyente con la presión que ejerce un gas comprimido en la parte superior de la columna, es considerada una versión acelerada de la cromatografía convencional, esta técnica se popularizó siendo esta una alternativa a la cromatografía alimentada por gravedad. Para este estudio se empleó un equipo Isolera one Biotage con una columna de fase normal: 10g SNAP ULTRA Biotage HP-Sphere de 25 µm de tamaño de partícula, un volumen de columna de 17 mL. Las fracciones a separar se aplicaron disueltas en diclorometano (DCM), el

sistema de elución fue de polaridad creciente utilizando *n*-hexano y acetato de etilo (Hx/AcOEt) de grado industrial con un caudal de 36 mL/min. Las subfracciones resultantes se concentraron a presión reducida a una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 70, luego fueron almacenadas en viales color ámbar previamente tarados a 4°C y protegidas de luz.

2.2.3.5 Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC UV-DAD)

La cromatografía UHPLC al igual que en otros métodos cromatográficos participa la fase móvil y la fase estacionaria con la muestra de interés, sin embargo, es considerada una evolución de la cromatografía en columna clásica. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad, estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes. Este método de fraccionamiento se realizó con un equipo UHPLC-UV-DAD (Detector con Arreglo de diodos) Ultimate 3000 (Thermo Scientific) acoplado con una columna preparativa de C18 de la marca Thermo Scientific de 250 mm por 20 mm de ancho con un tamaño de partícula de 5 µm. Para la elución de los componentes se utilizó un sistema isocrático con un caudal de 8.5 mL/min con ACN:MeOH:H₂O (85:10:5 v/v/v) con un volumen de inyección de 500 µL y un tiempo total de análisis de 80 min. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 208 nm y se colectaron manualmente las fracciones de interés y se concentraron a presión reducida a una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 70, luego fueron almacenadas en viales color ámbar previamente tarados a 4°C y protegidas de luz.

2.2.3.6 Cromatografía de permeación en gel (CPG)

También conocida como cromatografía de exclusión molecular, esta cromatografía, a diferencia de otras técnicas de cromatografía en columna utiliza moléculas de polímero (por ejemplo, Sephadex) como fase estacionaria. Las moléculas pequeñas entran en los poros de las partículas del polímero y descienden lentamente lo que indica un mayor tiempo de retención y migración a lo largo de la columna, mientras que las moléculas grandes no pueden entrar en los poros de menor tamaño y descienden más rápido. En

esta técnica la separación de componentes químicos se basa en la separación por tamaño de las moléculas a través del polímero, por lo tanto, no hay interacción química entre las moléculas de polímero y los componentes químicos. El rango de separación debe elegirse cuidadosamente ya que se requieren columnas muy largas. Como fase estacionaria se empleó Lipophilic Sephadex con un tamaño de partícula de 20-100 μm , la fase móvil fue MeOH en sistema de elución isocrático, las muestras se aplicaron disueltas en el sistema de elución a utilizar. Una vez reunidas las fracciones resultantes fueron concentradas a presión reducida con una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 70, luego fueron almacenadas en viales color ámbar previamente tarados a 4°C y protegidas de luz.

2.2.3.7 Cromatografía de adsorción por gravedad (CCA)

La CCA fue uno de los primeros trabajos realizados, como una de las primeras técnicas empleadas en la separación; ésta se realiza en virtud de las diferencias de comportamiento de las sustancias que desean separarse, atendiendo a su adsorción preferencial por la superficie de la fase estacionaria mientras se mueven por la acción de la fase móvil. Es importante señalar que la adsorción es un fenómeno superficial, que no involucra interacciones químicas entre los componentes a separar y la fase estacionaria. La adecuada elección de la fase móvil y estacionaria es fundamental para el éxito de la CCA. Usualmente se utilizan disolventes orgánicos para controlar la fuerza de elución la cual está relacionada con su polaridad, es decir, a mayor polaridad, mayor fuerza de elución. La sílica gel o gel de sílice es la fase estacionaria más utilizada para la cromatografía de adsorción. En este caso se empleó como fase estacionaria gel de sílice de la marca Sigma Aldrich, 60 Å de tamaño de poro, 70-230 mesh, y como fase móvil se utilizó un sistema de elución de polaridad creciente, con Hx/AcOEt/MeOH de grado industrial. Las fracciones a separar se aplicaron en seco y las subfracciones resultantes se concentraron a presión reducida a una temperatura de 40°C, en un evaporador rotatorio de la marca Büchi 011 acoplado a un recirculador de agua fría y vacío PVK 70, luego fueron almacenadas en viales color ámbar previamente tarados a 4°C y protegidas de luz.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Extracto de corteza de tallo de *Erythrostemon yucatanensis*

Después de ser sometida al proceso de secado la corteza de tallo fresca (42 Kg) perdió 45% de peso. A partir de las 3 colectas realizadas en los meses de noviembre de 2018, y mayo-junio de 2019, después de la molienda se obtuvo un total de 23 kg a partir de material seco. Mediante maceración estática utilizando metanol se extrajo la corteza de tallo. La reducción del tamaño de las partículas aumenta la superficie de contacto entre el disolvente y el material vegetal, lo que permite mejor extracción. El extracto metanólico obtenido tenía una coloración verde oscuro y textura oleosa. Los rendimientos variaron de acuerdo con la fecha en que fueron colectadas. En la primera colecta, en época de lluvias, el rendimiento de extracto metanólico fue del 2% aproximadamente, mientras que en la segunda y tercera colectas que corresponden a la época de secas, el rendimiento aumentó al 4.5% (Tabla 2.1)

Tabla 2.1 Rendimiento de extractos de corteza de *Erythrostemon yucatanensis* y de las fracciones obtenidas de la partición líquido-líquido.

Colecta	Corteza fresca (Kg)	Corteza seca (Kg)	Rendimiento Extracto MeOH (%)	Extracto MeOH (g)	Parte Hx (g)	Rendimiento Parte Hx (%)
6 noviembre 2018	8.2	4.49	2.2	99.2	122.05	11.95
14 mayo 2019	9.5	5.5	4.5	252.0		
06 junio 2019	24.4	13.06	4.4	574.6		

2.3.2 Fraccionamiento del extracto MeOH (EY)

La cromatografía de partición líquido-líquido del extracto EY, consistió en una extracción sucesiva de tres repeticiones con disolventes grado industrial. El extracto MeOH total se dividió en varios lotes para su partición, cada lote fue disuelto en 200 mL de MeOH, luego se agregaron 200 mL de ACN agitando hasta homogenizar la mezcla, se agregaron 600 mL de Hx para lavar y se procedió a sonicar la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla fue depositada en un embudo de separación. Se obtuvieron 2 fases de diferentes densidades (Figura 2.4); la fracción más densa corresponde a una mezcla de ACN/MeOH (EY1), y la fracción menos densa esta disuelta en Hx (EY2). El proceso de lavado a la parte ACN/MeOH con Hx se repitió 2 veces más. Las partes EY1 y EY2 fueron concentradas a presión reducida a una temperatura de 40°C, y las fracciones se almacenaron en frascos de vidrio herméticos previamente tarados (Figura 2.5A). El rendimiento de la fracción hexánica a partir del extracto metanólico fue de 11.95%, es decir, un total de 122.5 g. Los datos de rendimientos generales se encuentran en la Tabla 2.1.



Figura 2.4 Extracto metanólico de la corteza del tallo de *Erythrostemon yucatanensis* (izquierda), partición líquido-líquido del extracto utilizando una mezcla de disolventes MeOH/ACN/Hx (1:1:3), utilizando un embudo de separación (derecha).

En la Figura 2.5B se presentan resultados en placas de cromatografía en capa delgada (CCD) para el extracto metanólico y la parte hexánica obtenidos de la corteza de tallo de *E. yucatanensis*. En ambos se observan bandas representativas a la longitud de onda de 360 nm, de clorofila (fluorescencia en rojo), y también bandas en colores azul y verde, de igual forma, a la longitud de onda de 254 nm se observan diferentes bandas. De acuerdo con el perfil cromatográfico observado de la partición líquido-líquido, se trata de fracciones complejas con un gran número de componentes. Utilizando un sistema de mediana alta polaridad no lograron separarse adecuadamente, en cambio con el sistema de baja a mediana polaridad se lograron distinguir perfectamente las diferentes bandas de los compuestos. Por lo tanto, se determinó que la parte hexánica se debía separar mediante cromatografía líquida de vacío utilizando un gradiente de disolventes de Hx y AcOEt para separar por polaridad los diferentes componentes.

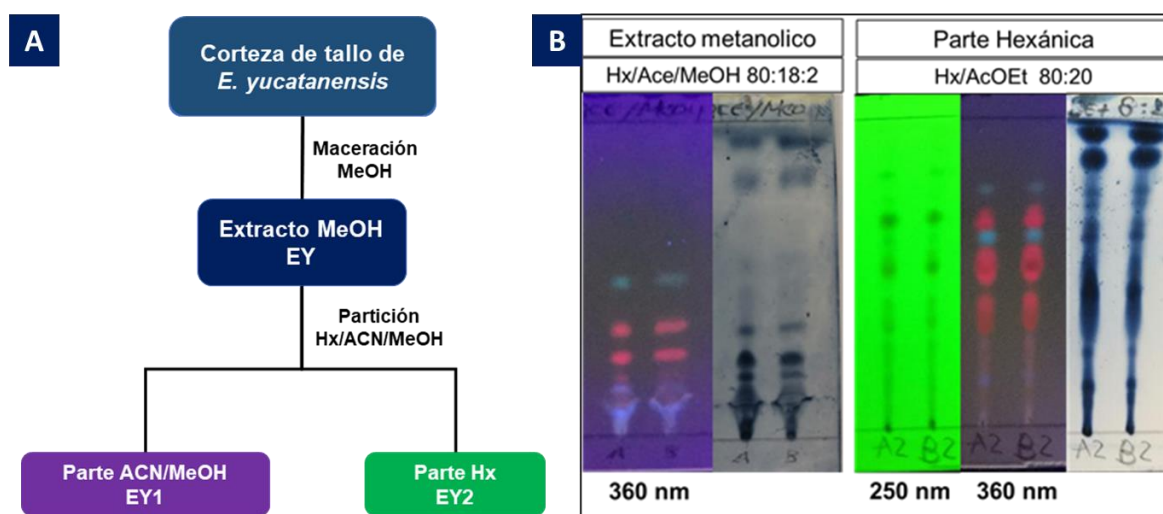


Figura 2.5 Fraccionamiento del extracto de corteza de tallo de *Erythrostemon yucatanensis*. (A) Diagrama de proceso de extracción. (B) Cromatografía en capa delgada del extracto metanólico crudo y de la parte hexánica.

2.3.3 Fraccionamiento de la parte hexánica (EY2) por CLV

La parte Hx (EY2) fue fraccionada mediante CLV, siguiendo el proceso de May *et al.* en 2013 para lo cual se utilizó un percolador de 13 cm de diámetro, la altura de la sílica fue 5 cm, y se realizaron 3 diferentes columnas con 40 g de muestra. En la Tabla 2.2 se muestra el sistema de elución de polaridad creciente (Hx/AcOEt), así como el volumen empleado. Se obtuvieron un total de 22 fracciones, y de acuerdo con sus perfiles en CCD (Figura 2.6A) se reunieron en 14 fracciones (Tabla 2.2). El rendimiento de cada fracción fue diferente entre sí; EY23 fue la de mayor masa y EY21 la de menor masa.

Tabla 2.2 Rendimiento de fracciones obtenidas por cromatografía líquida de vacío de la parte hexánica (EY2).

Fracción	Sistema (%) Hx/AcOEt	Volumen (mL)	Nomenclatura	Peso (g)
1	100:00	500:00	EY21	1.64
2	99:01	495:05		
3	98:02	490:10	EY22	2.71
4	97:03	485:15	EY23	35.66
5	96:04	480:20		
6	94:06	470:30		
7	92:08	460:40	EY24	10.28
8	90:10	450:50	EY25	7.92
9	88:12	440:60	EY26	7.72
10	86:14	430:70	EY27	8.59
11	84:16	420:80	EY28	4.89
12	82:18	410:90	EY29	6.92
13	80:20	400:100		
14	78:22	390:110	EY210	5.58
15	70:30	350:150		
16	60:40	300:200	EY211	4.80
17	50:50	250:250		
18	30:70	200:300		
19	20:80	150:350	EY212	7.15
20	10:90	100:400		
21	00:100	1000	EY213	5.19
22	100 MeOH	1000	EY214	11.55

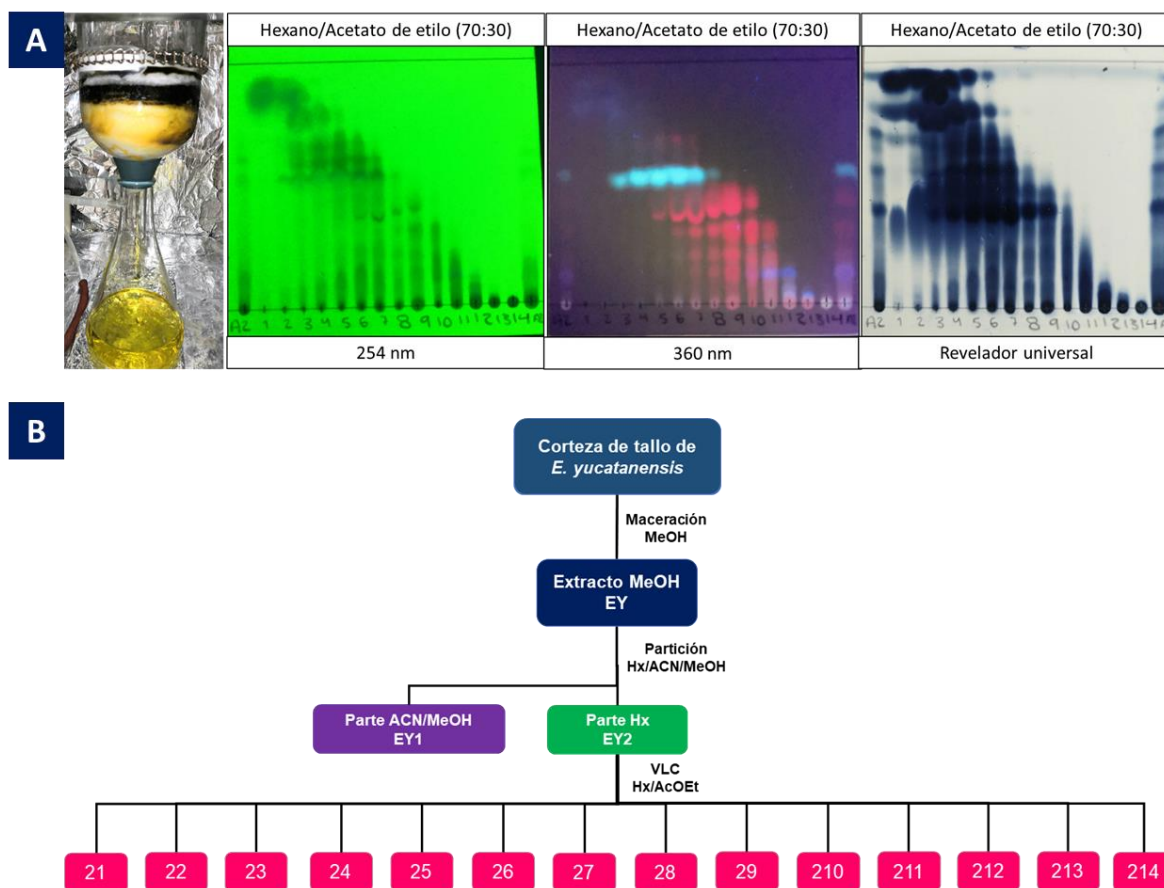


Figura 2.6 Fraccionamiento de EY2 (Parte Hx). (A) Cromatografía líquida de vacío (CLV). (B) CCD de las 14 fracciones obtenidas.

En la Figura 2.7 se presentan los resultados del ensayo IHA de las 14 fracciones obtenidas de la parte hexánica; en este primer monitoreo la mayoría de las fracciones mostraron actividad IHA con excepción de EY21, EY22 y EY27. Las fracciones que mostraron la mayor actividad inhibitoria en el ensayo IHA fueron EY24, EY25, EY26, EY211 y EY212. En el caso de EY212, a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ presentó inhibición parcial. Para el control viral se utilizaron 3 UHA; la baja concentración de virus usada inicialmente no provocó la hemaglutinación de los eritrocitos. Por lo tanto, fue necesario repetir el ensayo para confirmar la actividad de estas fracciones. Adicionalmente, se redujo la concentración inicial de las fracciones a 50 $\mu\text{g/mL}$, y se omitieron las fracciones EY21, EY22 y EY27 que no presentaron actividad IHA en el primer monitoreo.

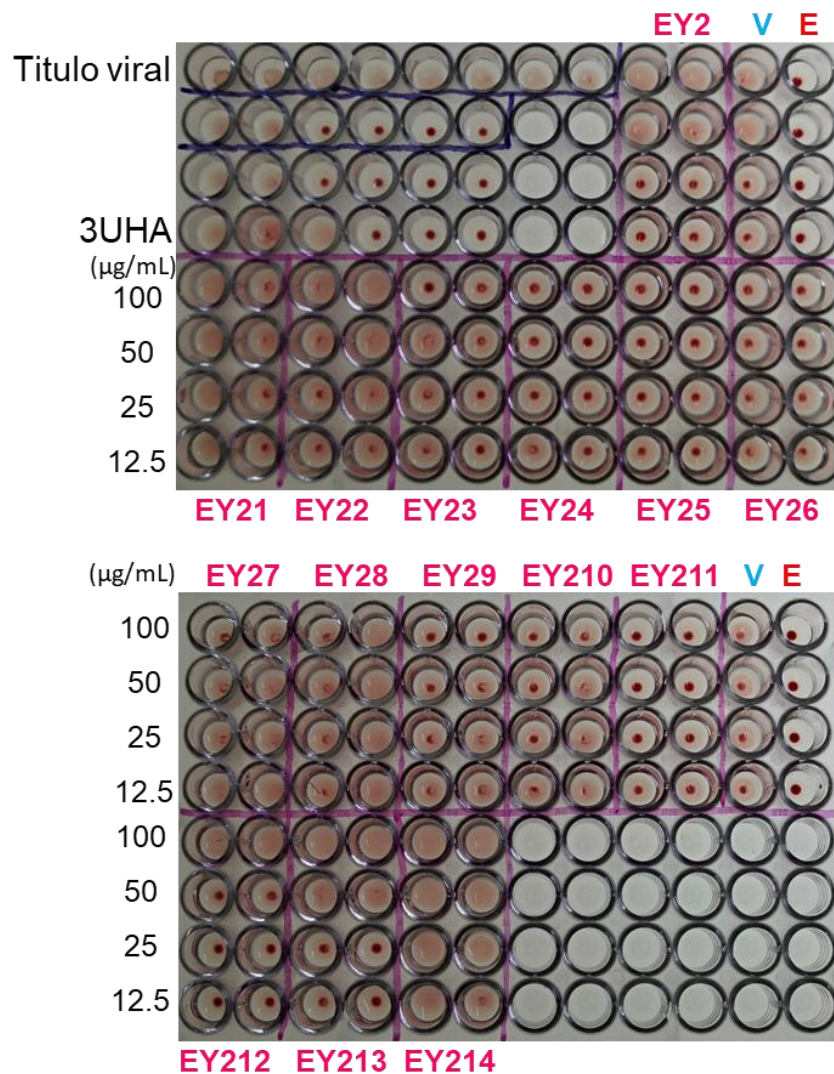


Figura 2.7 Resultados de actividad IHA de las fracciones, del primer monitoreo de las 14 fracciones obtenidas de la parte hexánica mediante CLV. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).

En la Figura 2.8A se pueden observar los nuevos resultados, las únicas fracciones que presentan inhibición parcial a 6.25 µg/mL son EY211 y EY212. Mientras que las fracciones EY24, EY25, EY26 y EY29 presentan inhibición completa a 50 y 25 µg/mL, solo la fracción EY26 mostró inhibición total a 12.5 µg/mL. Los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de hemaglutinación para las fracciones de EY2 (parte hexánica) se muestran en la Figura 2.8B. Las fracciones que presentan menor inhibición son EY23, EY213 y EY210, en el caso de EY210 esta presenta un 78% de inhibición a concentración de 50 µg/mL, sin embargo, se consideran mejores candidatas las fracciones que

presentan inhibición en bajas concentraciones, como son EY24, EY25, EY26, EY211 y EY212 ya que tienen porcentaje de inhibición alrededor del 90%. Las fracciones EY26 y EY11, obtuvieron porcentaje de inhibición cerca de 95% a concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ por lo que estas dos fracciones son candidatas para continuar con el aislamiento e identificación de los componentes que inhiben a la proteína viral hemaglutinina.

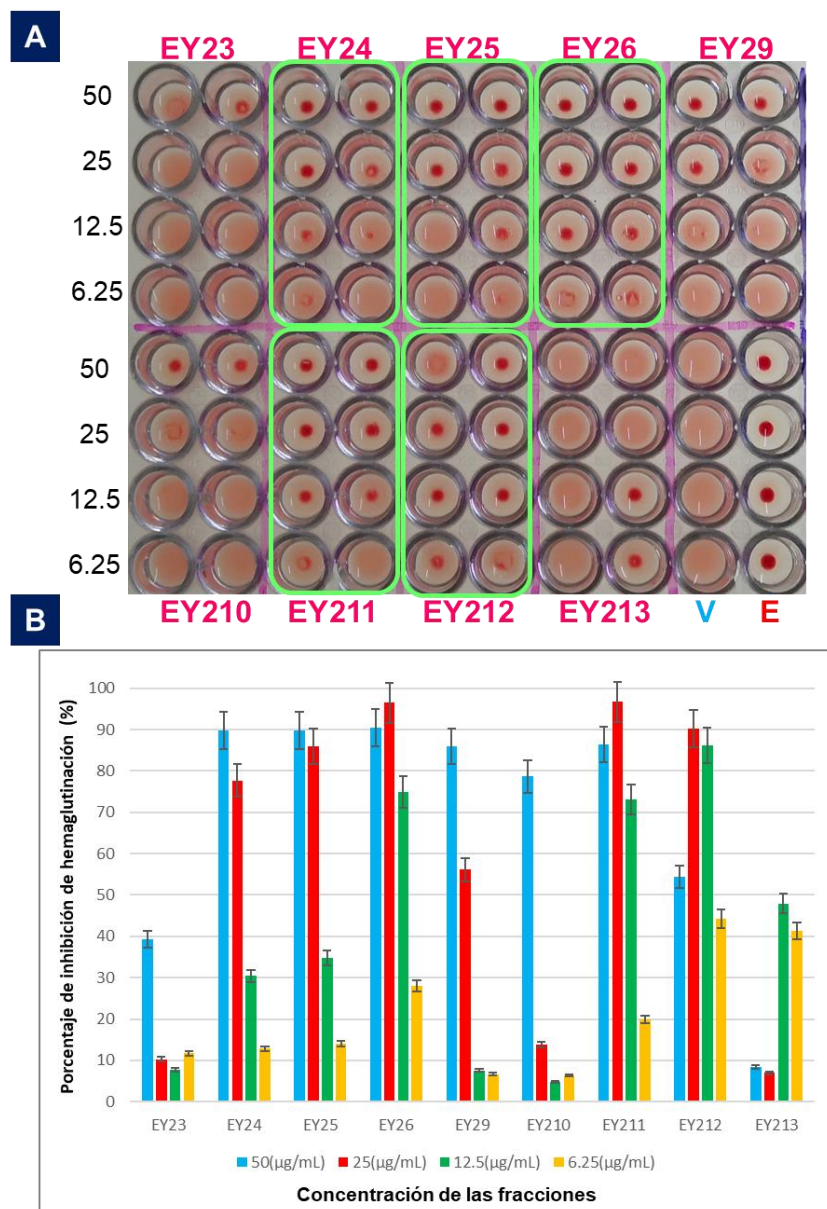


Figura 2.8 Ensayo IHA. (A) Resultados de IHA de las fracciones de EY2. (B) Porcentaje de IHA de las fracciones de la parte hexánica (EY2). (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos)

2.3.4 Fraccionamiento de EY26 por CLV

La fracción EY26 se sometió a un proceso de separación mediante CLV. Las características de la columna fueron las siguientes: altura de la columna fue de 5.5 cm y el diámetro de 2.5 cm, el peso de la muestra fue de 1.0124 g. Con este proceso se pretendió separar los compuestos en 3 grupos: polares, medianamente polares y apolares. Como sistema de elución se utilizó Hx/AcOEt de manera escalonada. En Tabla 2.3 se presentan los parámetros del sistema y el volumen empleado, dando como resultado 7 fracciones (Figura 2.9B). La fracción con mayor rendimiento fue EY2612, la fracción con menor rendimiento fue EY2617. Posteriormente todas las fracciones se analizaron por CCD, utilizando un sistema de Hx/AcOEt (70:30).

Tabla 2.3 Rendimiento de fracciones obtenidas por cromatografía líquida de vacío de la fracción EY26

Fracción	Sistema (%)	Volumen (mL)	Nomenclatura	Rendimiento (mg)
1	100:00	50:00	EY2611	13.0
2	100:00	50:00		
3	90:10	45:05	EY2612	355.8
4	90:10	45:05	EY2613	262.0
5	75:25	32.5:12.5	EY2614	201.1
6	75:25	32.5:12.5	EY2615	20.4
7	50:50	25:25	EY2616	21.2
8	50:50	25:25		
9	00:100	00:50		
10	00:100	00:50		
11	100 MeOH	50	EY2617	11.2

En la Figura 2.9A se observan los perfiles cromatográficos de las fracciones de EY26, donde la fracción EY2615 presenta un perfil cromatográfico menos complejo. También se puede observar que las primeras fracciones tienen la misma banda que se ve en EY2615, lo que indica que el método de separación debe modificarse. Por lo tanto, los resultados del porcentaje de inhibición de hemaglutinación ayudaron a determinar cuáles fracciones podrían ser utilizadas para continuar con el proceso de aislamiento. Es importante resaltar que la CLV es un proceso de separación no tan fino como otras cromatografías.

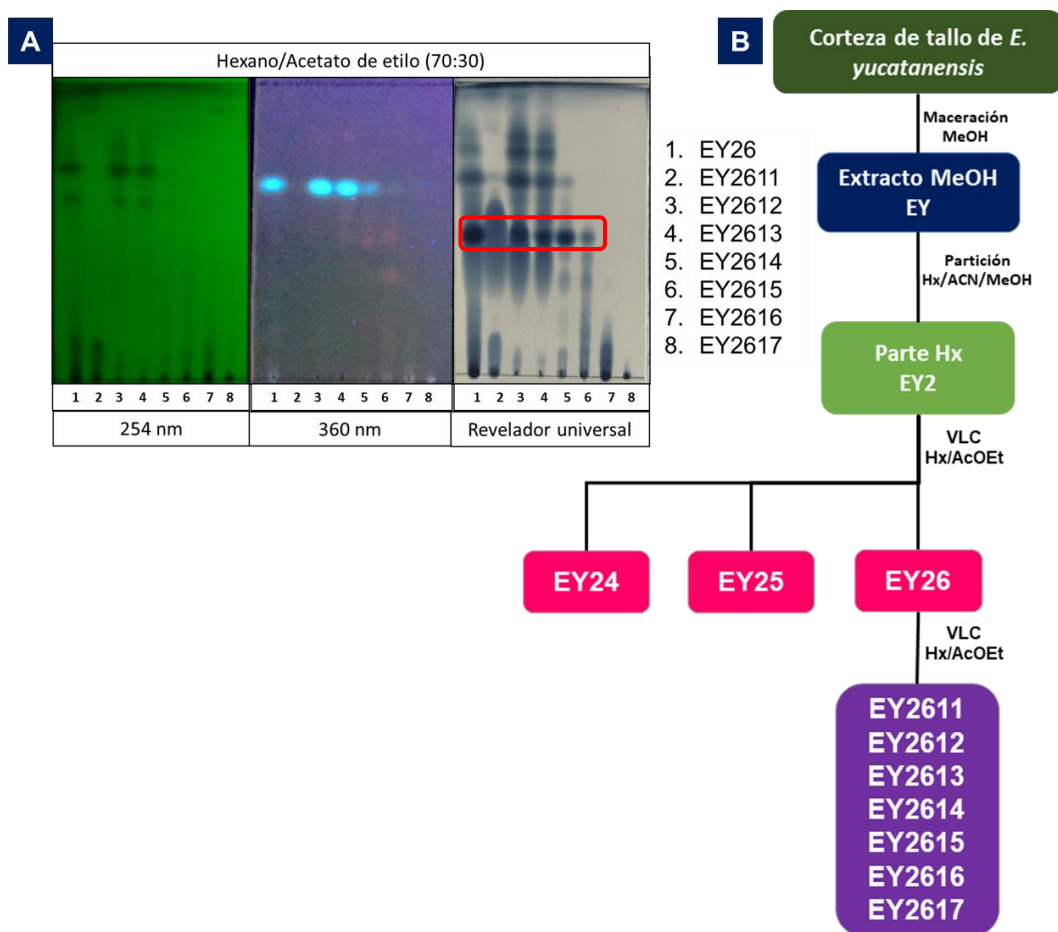


Figura 2.9 Fracciones de EY26 obtenidas mediante CLV. (A) Cromatografía en capa delgada de las fracciones obtenidas de EY26. (B) Diagrama de fraccionamiento.

En la Figura 2.10A se muestran los resultados de IHA; se observa que todas las fracciones tienen actividad. Las fracciones EY2612, EY2613 y EY2614 muestran la mayor inhibición. Las fracciones EY2615 y EY2617 fueron las que obtuvieron mayor porcentaje de inhibición en comparación con las demás fracciones, sin embargo, el rendimiento de estas fue muy bajo; en el caso de las fracciones EY2612 y EY2613 también tuvieron inhibición cerca del 90% y un mayor rendimiento. Las fracciones que mostraron mayor inhibición tienen en común la banda que se encuentra a $R_f=0.48$ (recuadro rojo). Como se puede ver en las placas de CCD de la Figura 2.9A. Debido a que se tenía poca cantidad de esta fracción fue necesario modificar el método de separación. Para aumentar la cantidad de esta fracción se realizarán fraccionamientos por Cflash a la fracción EY2612.

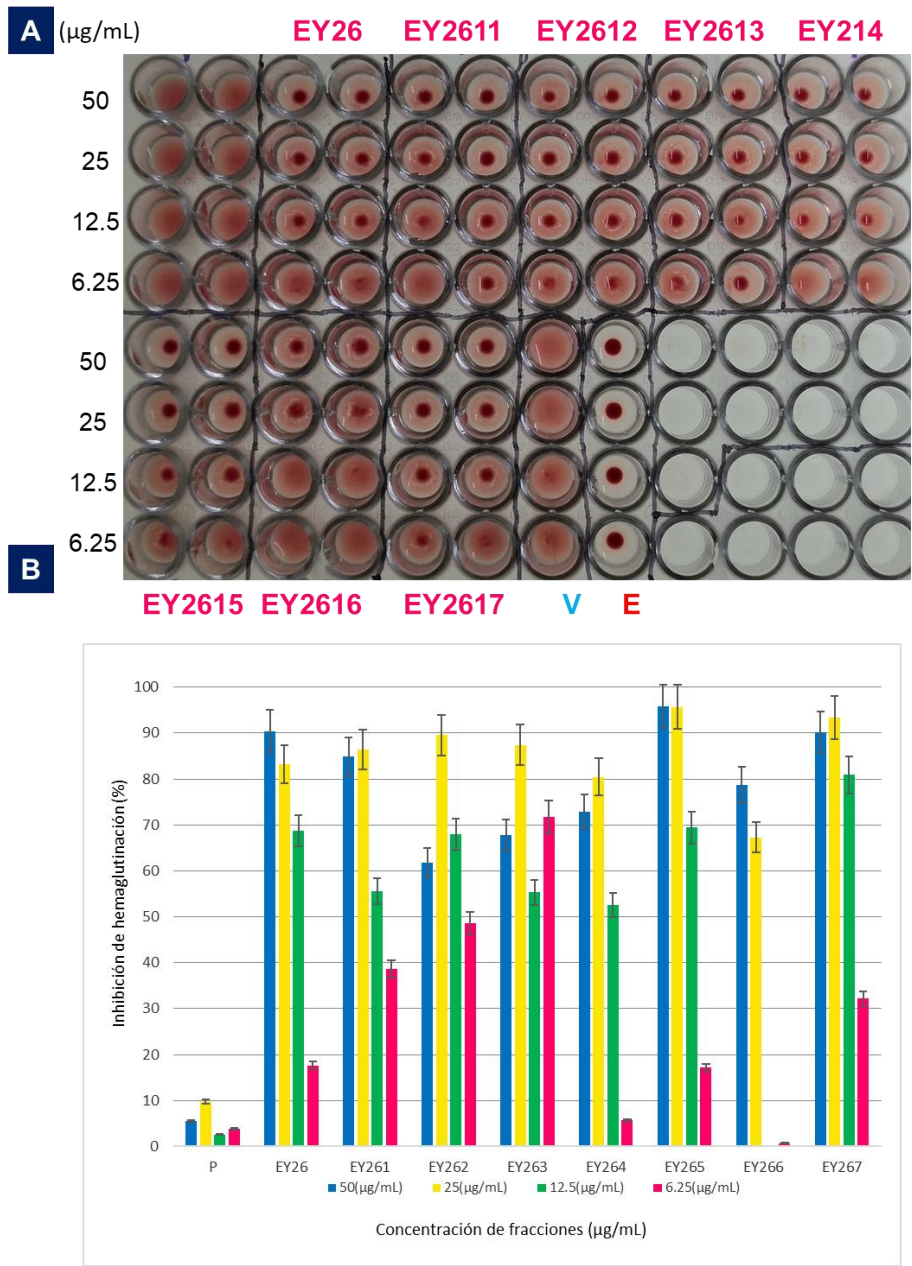


Figura 2.10 Placa de IHA y porcentaje de inhibición de hemaglutinación de las fracciones de EYA2B6 obtenidas mediante CLV. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).

2.3.5 Fraccionamiento de EY2612 por CCF

EY2612 fue la fracción más abundante y mostró actividad biológica prometedora, por lo que 100 mg de esta se fraccionaron mediante cromatografía en CCF utilizando el equipo Isolera one Biotage. El proceso de fraccionamiento se llevó a cabo mediante elución con polaridad creciente con Hx/AcOEt; en la Tabla 2.4 se presenta sistema empleado para el fraccionamiento de los componentes. Se obtuvieron en total 14 tubos, los cuales se analizaron mediante CCD (Hx/AcOEt, 90:10) y se reunieron las fracciones con perfiles similares para ser evaluadas con el ensayo IHA (Figura 2.11).

Tabla 2.4 Rendimiento de fracciones obtenidas en la cromatografía flash (EY262)

Fracción	Sistema (%)		Volumen columna	Tubos reunidos	Nomenclatura	Rendimiento (mg)
	Hx/AcOEt		(VC)			
	Inicio Hx	Fin Hx	(mL)			
EQ	100	100	5			
1	100	100	2	1,2	EY2612A1	6.4
2	100	95	2	3,4,5,6,7,8	EY2612A2	7.7
3	95	90	2	9,10	EY2612A3	53.6
4	90	80	2	11,12,13,14	EY2612A4	0.012
5	80	50	2			
6	50	0	1			

Adicionalmente, EY2612 (275 mg) se fraccionó mediante cromatografía en columna flash utilizando el equipo Isolera one Biotage. Sin embargo, a diferencia del anterior fraccionamiento, en este caso se obtuvo el gradiente de disolventes de manera automática introduciendo el valor del R_f de las bandas de interés obtenidas en CCD (EY262); el sistema de elución fue Hx/AcOEt. En la Tabla 2.5 se presenta el gradiente del sistema empleado para el fraccionamiento de los componentes. Se obtuvieron en total 21 tubos los cuales se analizaron mediante CCD (Hx/AcOEt, 90:10) y se reunieron las fracciones con perfiles similares para también ser evaluadas con el ensayo IHA (Figura 2.11A). Comparando ambos métodos, no hubo gran diferencia en cuanto a la complejidad de los perfiles cromatográfico, ya que las fracciones EY2512A3 y EY2512B3, tienen las mismas bandas y a su vez las de mayor rendimiento. Las fracciones con perfil de menor complejidad son EY2512A2 y EY2512B2. Sin embargo, la mayoría de las fracciones presentan compuestos similares, solo diferenciándose en intensidad de las bandas entre cada fracción (Figura 2.11B).

Tabla 2.5 Rendimiento de fracciones obtenidas en la CCF (EY2612)

Fracción	Sistema (%)		Volumen columna	Tubos reunidos	Nomenclatura	Rendimiento (mg)
	Hx/AcOEt		(VC)			
	Inicio Hx	Fin Hx				
EQ	98	98	3	1-3	EY2612B1	6.7
1	98	98	1	4-7	EY2612B2	11.1
2	98	80	10	8-11	EY2612B3	124.4
3	80	80	2	12-14	EY2612B4	27.2
4	80	80	3.2	15-21	EY2612B5	6
				22	EY2612B6	0.3

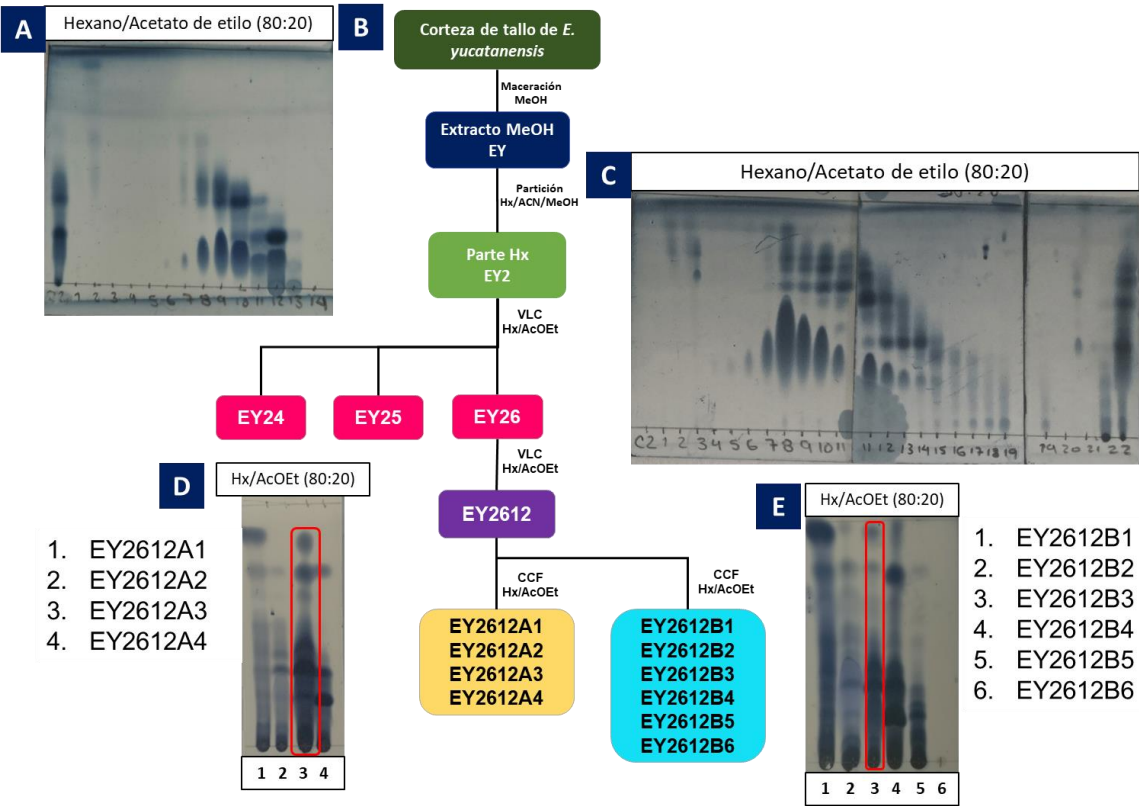


Figura 2.11 Fraccionamiento de EY2612. (A) CCD de los tubos colectados por CCF1 utilizando un sistema de polaridad creciente. (B) Diagrama de fraccionamiento. (C) CCD de los tubos colectados por CCF2 utilizando como referencia Rf=0.46. (D) Fracciones obtenidas mediante CCF1. (E) Fracciones obtenidas mediante CCF2.

Las fracciones de EY2612 separadas mediante CCF con 2 procesos distintos fueron evaluadas con el ensayo IHA. La Figura 2.12 muestra los resultados obtenidos para cada una de las fracciones, donde todas las fracciones presentan actividad IHA. Las fracciones EY2612A2 y EY2612B4 fueron las que mostraron mayor inhibición hasta la concentración más alta empleada (50 $\mu\text{g/mL}$). Las fracciones presentan la misma cantidad de compuestos, solo diferenciándose en la cantidad de cada uno. En la figura 2.11 se puede observar la diferencia de intensidad de las bandas entre cada fracción. Los componentes presentes en estas fracciones son los que podrían estar inhibiendo a la proteína viral hemaglutinina.



Figura 2.12 Resultados de IHA de las fracciones de EY2612 mediante CCF. Los resultados encerrados en el recuadro corresponden a las fracciones de mayor rendimiento. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos)

2.3.6 Fraccionamiento de EY26: UHPLC UV-DAD (ACN/MeOH/H₂O)

Adicionalmente, como proceso de prueba para el aislamiento y purificación de posibles componentes con actividad anti-HA en EY26, se empleó un sistema de UHPLC-UV-DAD utilizando una columna preparativa. Para la elución de los analitos se utilizó un sistema isocrático con ACN:MeOH:Agua (85:10:5, v/v/v) (Figura 2.13B). Para este proceso se utilizaron 3 g de la fracción EY26, y se colectaron los componentes de interés de la

siguiente manera: EY2631=7-15 min, EY2632=16-17 min, EY2633=17-18 min, EY2634=21-24 min, EY2635=30-34 min. Las muestras colectadas fueron secadas a presión reducida utilizando un rotavapor de ultra alto vacío y posteriormente se calculó su rendimiento (Tabla 2.6). En la Figura 2.13A se pueden observar los perfiles cromatográficos de las 5 fracciones obtenidas, donde la única que presenta un perfil diferente es EY2633, y las otras fracciones presentan perfiles similares entre sí.

Tabla 2.6 Rendimiento fracciones de EY26 obtenidas mediante UHPLC-UV-DAD.

Fracción	Tiempos de Retención	Nomenclatura	Peso
	min		(mg)
1	7-15	EY2631	98.4
2	16-17	EY2632	120.3
3	17-18	EY2633	187.3
4	21-24	EY2634	105.8
5	30-34	EY2635	11.2

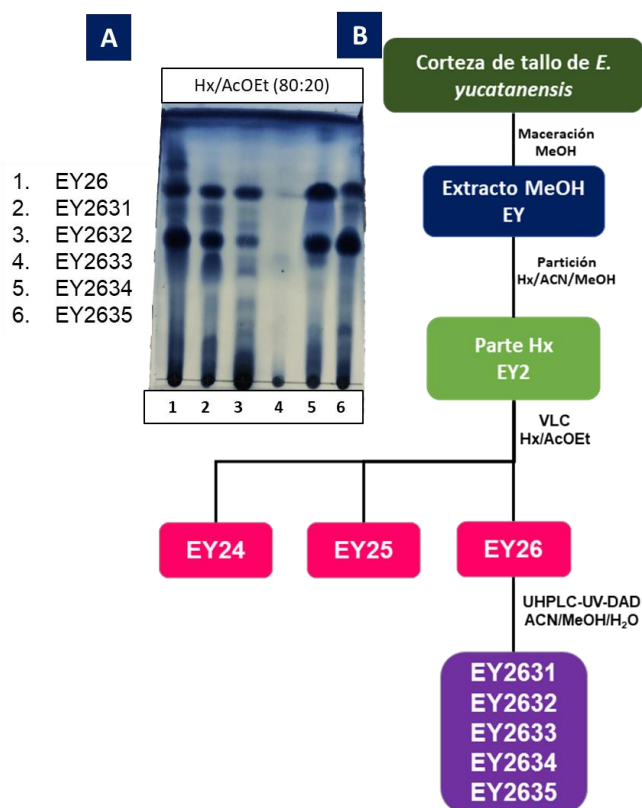


Figura 2.13 Fraccionamiento de EY26. (A) CCD de las fracciones obtenidas mediante UHPLC. (B) Diagrama de fraccionamiento.

Las fracciones EY2634, EY2633 y EY2632 fueron evaluadas con el ensayo IHA; en la Figura 2.14 se presentan los resultados obtenidos para cada una de ellas. Solo EY2634 presentó actividad IHA; las fracciones EY2633 y EY2632 no presentaron inhibición a ninguna de las concentraciones empleadas. La fracción EY2634 al tener actividad IHA puede ser un control para el aislamiento de compuestos de las otras fracciones ya que, a pesar de no ser un compuesto puro, fue la fracción más cristalina que se ha obtenido hasta ahora, ya que es un polvo blanco (consistencia oleosa).

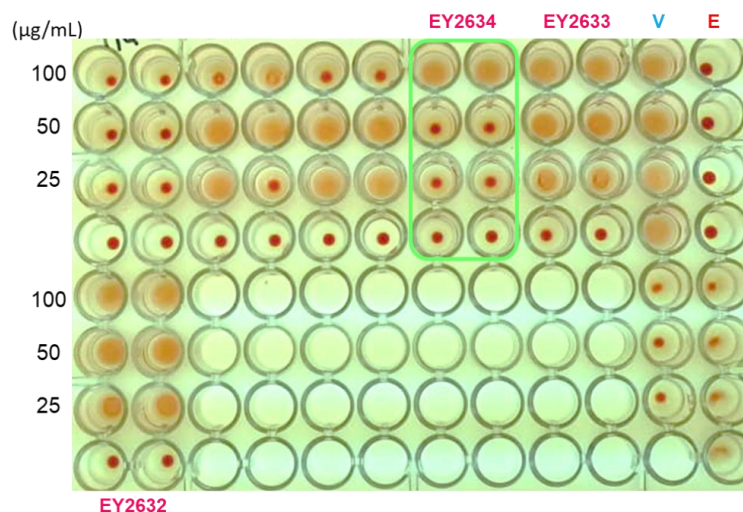


Figura 2.14 Ensayo IHA de las fracciones de EY26 mediante UHPLC. La fracción EY2634 fue la única que mostró actividad IHA. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).

2.3.7 Fraccionamiento de EY2634 mediante Cromatografía en placa preparativa

La fracción EY2634 fue la única muestra de las obtenidas con el UHPLC que mostró actividad IHA, por lo que se procedió a su fraccionamiento (Figura 2.15A). Su perfil cromatográfico en CCD mostró dos bandas mayoritarias. Por tanto, para la separación de estas dos bandas se realizó CCD en placa preparativa; 17 mg de EY2634 se fraccionaron utilizando como sistema de elución Hx/CH₂Cl₂/An a concentración de 80:10:10 v/v/v. Las dos bandas mayoritarias; TO1 y TO2 (Figura 2.15B), fueron recuperadas en varios pasos. Primeramente, la sílica raspada fue sumergida en diclorometano (con algunas gotas de MeOH) y sonicada durante 15 min. Posteriormente se filtró y concentró a presión reducida y se calculó su rendimiento (Tabla 2.7). Finalmente, fueron etiquetadas y almacenadas para posteriormente ser evaluadas mediante el ensayo de IHA.

Tabla 2.7 Rendimiento de fracciones obtenidas en CCD-P (EY2634).

Fracción	Rf	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	0.46	TO1	2.72 mg
2	0.31	TO2	6.4 mg

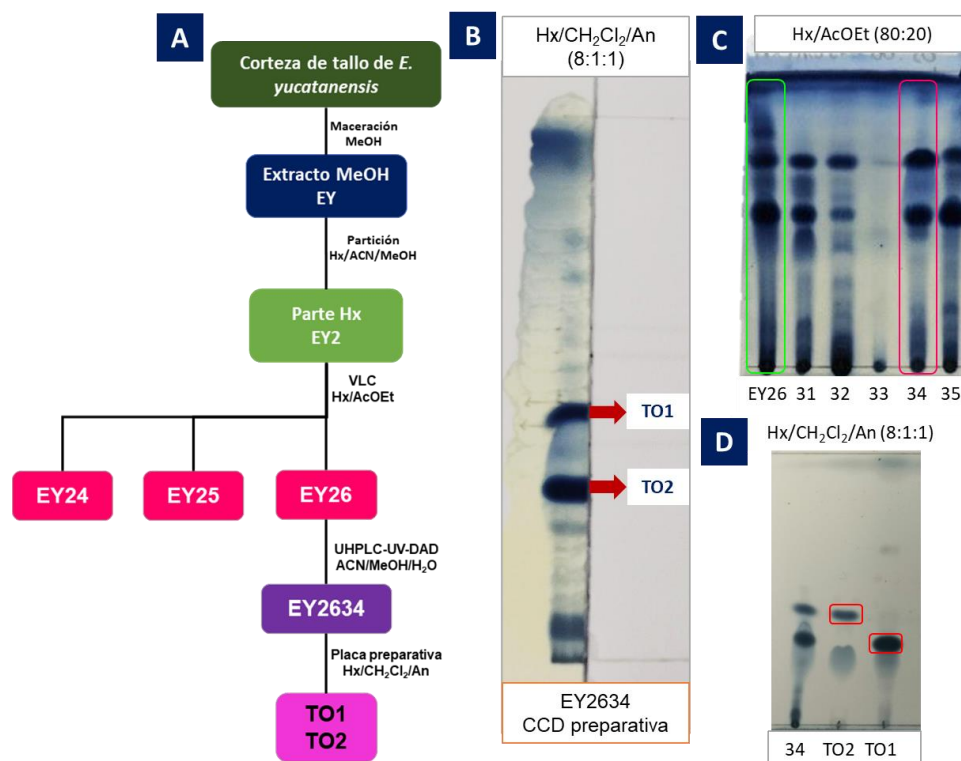


Figura 2.15 Fraccionamiento de EY2634 mediante CCD-P. (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD-P de EY2634, TO1 Rf=0.46 y TO2 Rf=0.31. (C) CCD de fracciones de EY26. (D) CCD de EY2634, TO1 y TO2.

2.3.8 Fraccionamiento de EY26: Cromatografía en columna de adsorción

Para separar TO1 y TO2 las dos bandas de interés, fue necesario fraccionar nuevamente EY26. Cabe mencionar que estas dos bandas fueron identificadas en las fracciones con mayor actividad IHA (Figura 2.16). Una muestra de 1.3 g de EY26 se fraccionó mediante cromatografía en columna de adsorción, utilizando como fase estacionaria gel de sílice. Las medidas de la columna fueron 3.5 cm de diámetro y la altura de 27 cm; el sistema de elución empleado fue de polaridad creciente con Hx/AcOEt. Se colectaron 261 tubos, los cuales fueron monitoreados por CCD utilizando Hx/CH₂Cl₂/An, teniendo como volumen muerto los primeros 40 tubos. Las fracciones obtenidas fueron 9 (Tabla 2.8).

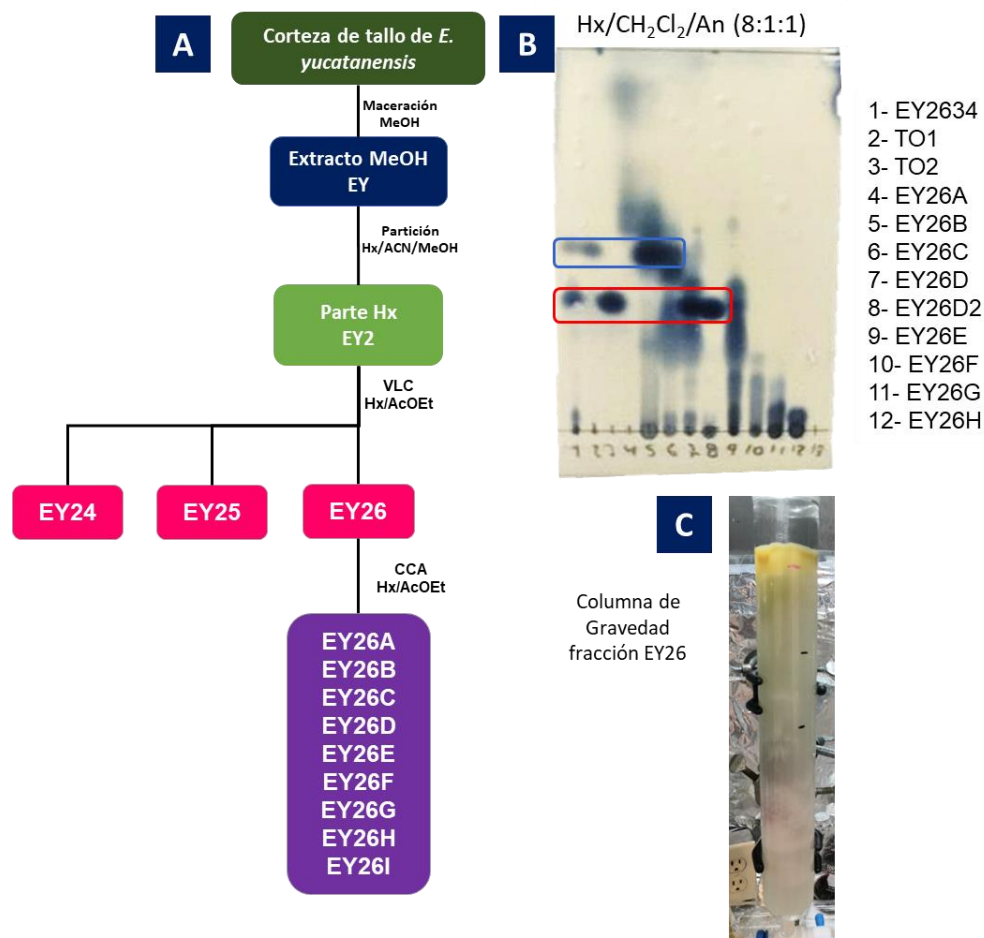


Figura 2.16 Fraccionamiento de EY26 mediante cromatografía en columna de gravedad. (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD de las fracciones obtenidas. (C) Columna de gravedad empleada.

Tabla 2.8 Rendimiento de componentes aislados de en la cromatografía en columna de adsorción (EY26).

Fracción	Tubos reunidos	Sistema (%) Hx/AcOEt	Nomenclatura	Rendimiento (%)
0	1-42	100:00	Vol. muerto	-
1	43-52	80:20	EY26A	108.0
2	53-79	80:20	EY26B	124.9
3	80-105	80:20	EY26C	142.8
4	106-186	80:20, 70:30; 50:50	EY26D	247.5
5	187-196	25:75	EY26E	250.6
6	197-204	25:75	EY26F	226.0
7	205-218	00:100	EY26G	65.8
8	219-231	00:100	EY26H	45.6
9	232-261	MeOH	EY26I	N/D

Se planteó establecer un método para obtener la mayor cantidad posible de TO1 y TO2 a partir de las fracciones que presentan estas dos bandas (EY24, EY25 y EY26). En la Figura 2.16B se muestran las fracciones reunidas donde se pudo identificar que en EY26B y EY26C se encontraba TO1, mientras que en EY26C, EY26D y EY26D2 se encontraba TO2. La fracción EY26D2 es un precipitado que se obtuvo de la fracción EY26D, el cual fue colectado manualmente con una espátula y se lavó con MeOH y Hx quedando finalmente un polvo cristalino con textura oleosa con rendimiento de 65 mg. Las fracciones fueron etiquetadas y almacenadas para posteriormente ser evaluadas con el ensayo IHA.

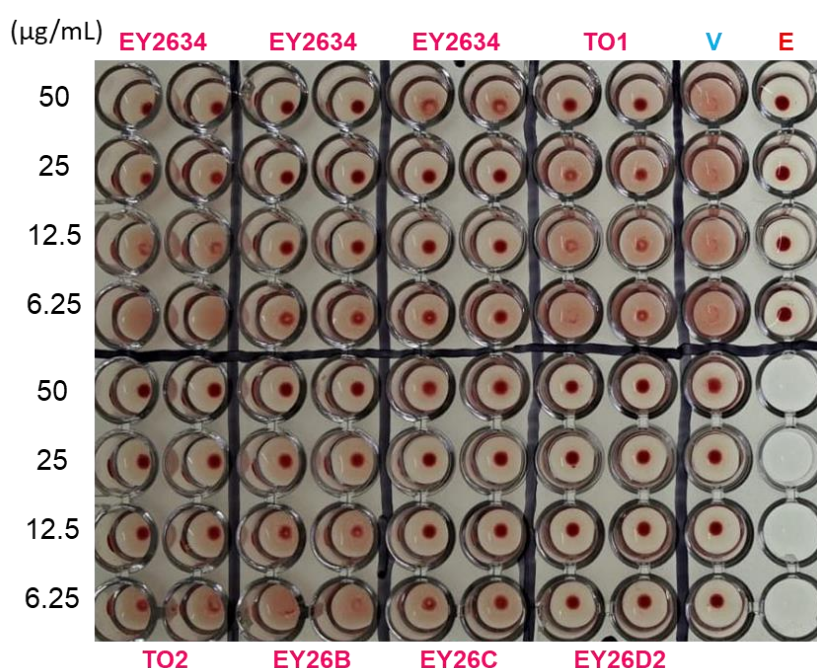


Figura 2.17 Ensayo IHA de TO1, TO2 y fracciones de EY26 obtenidas por CCG que en CCD mostraron bandas que corresponden a TO1 y TO2.
(V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).

Las fracciones EY2634, TO1, TO2, EY26B, EY26C y EY26D2 fueron evaluadas con el ensayo IHA. En la Figura 2.17 se presentan los resultados obtenidos para cada una de ellas. Donde EY2634 presentó actividad IHA en concentraciones de 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$, al igual que TO1 y EY26B. Por el contrario, TO2 mostró actividad IHA a las 4 concentraciones empleadas, al igual EY26C y EY26D2. De acuerdo con los resultados observados TO2 es la fracción que posee actividad IHA prometedora, ya que todas las fracciones que presentan la banda de TO2 poseen actividad IHA (Figura 2.17).

2.3.9 Fraccionamiento de EY24: Cromatografía líquida de vacío

Después de probar varios métodos de separación se determinó que la fracción EY24 se debía fraccionar, mediante CLV basándose en los parámetros de la columna de gravedad anteriormente realizada para aislar la fracción de interés TO2. Una vez que se verificó el perfil cromatográfico de EY24, se procedió con el fraccionamiento mediante cromatografía líquida de vacío (CLV) utilizando un percolador de 5 cm de diámetro, con gel de sílice a una altura de 7.5 cm. Se utilizó un sistema de elución de polaridad creciente empleando Hx/AcOEt (Tabla 2.9). Cada una de las fracciones obtenidas se analizó por CCD y se reunieron las fracciones con perfil similar donde se identificó TO2 en las fracciones EY242 y EY243 (Figura 2.18A). Al igual que en el proceso anterior se obtuvo un precipitado que corresponde a TO2 (Figura 2.18B). Se colectó con una espátula, se lavó con metanol y hexano.

Tabla 2.9 Rendimiento de componentes aislados en la cromatografía líquida de vacío de EY24

Fracción	Sistema (%)	Volumen (mL)	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	100:00	250:00	EY241	7.878 g
2	90:10	225:25		
3	90:10	225:25		
4	80:20	200:50	EY242	611 mg
5	80:20	200:50	EY243	412.4 mg
6	75:25	187.5:62.5		
7	75:25	187.5:62.5	EY244	303.9 mg
8	50:50	125:125	EY245	62.6 mg
9	50:50	125:125		
10	100 (MeOH)	250	EY246	129.5 mg

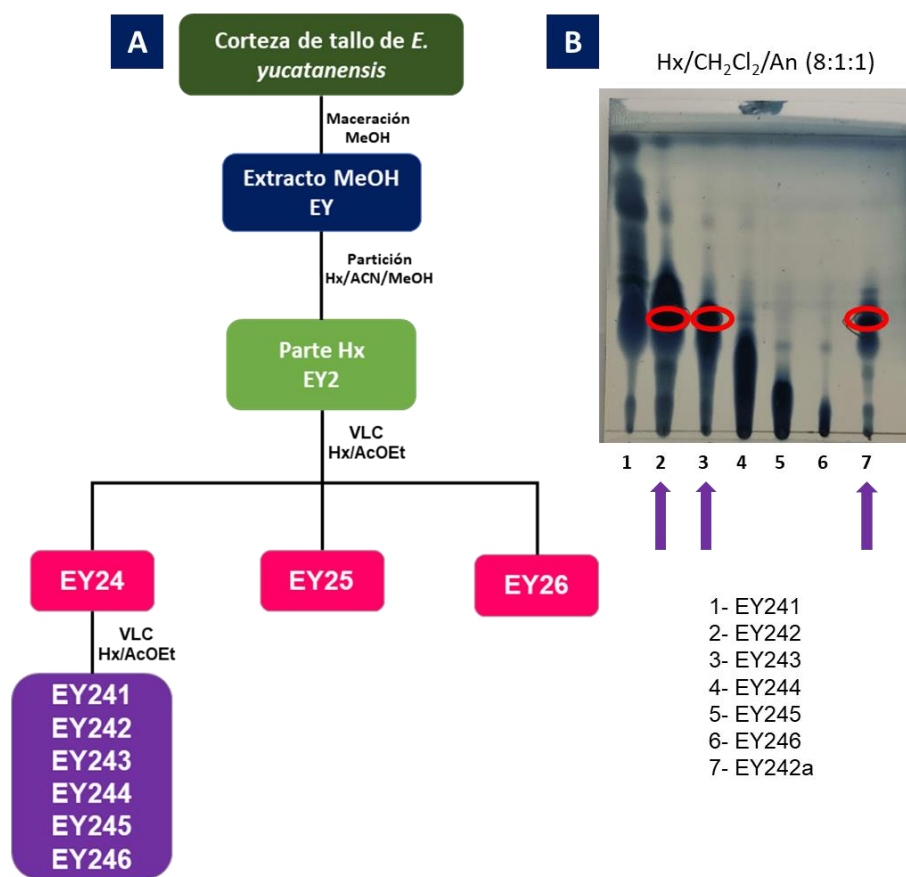


Figura 2.18 Fraccionamiento de EY24 mediante cromatografía líquida de vacío (CLV). (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD de fracciones obtenidas, la banda señalada en círculo rojo corresponde a TO2.

2.3.10 Fraccionamiento de EY25: Cromatografía líquida de vacío

Al igual que con EY24, se procedió con el fraccionamiento de EY25 mediante cromatografía líquida de vacío (CLV) utilizando un percolador de 5 cm de diámetro y 7.5 cm de altura. Se utilizó un sistema de polaridad creciente empleando Hx/AcOEt (Tabla 2.10). Se identificó TO2 en EY252 y EY253 (Figura 2.19B). Finalmente, al igual que con las fracciones de EY24, TO2 se obtuvo mediante lavados con MeOH y Hx.

Tabla 2.10 Rendimiento de componentes aislados en la CLV de EY25.

Fracción	Sistema (%) Hx/AcOEt	Volumen (mL)	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	100:00	250:00	EY251	4.0102 g
2	90:10	225:25		
3	90:10	225:25		
4	80:20	200:50	EY252	1.643 g
5	80:20	200:50	EY253	1.204 g
6	75:25	187.5:62.5		
7	75:25	187.5:62.5	EY254	300 mg
8	50:50	125:125	EY255	384.9 mg
9	50:50	125:125		
10	00:100	250		
11	100 (MeOH)	250	EY256	233.6 mg

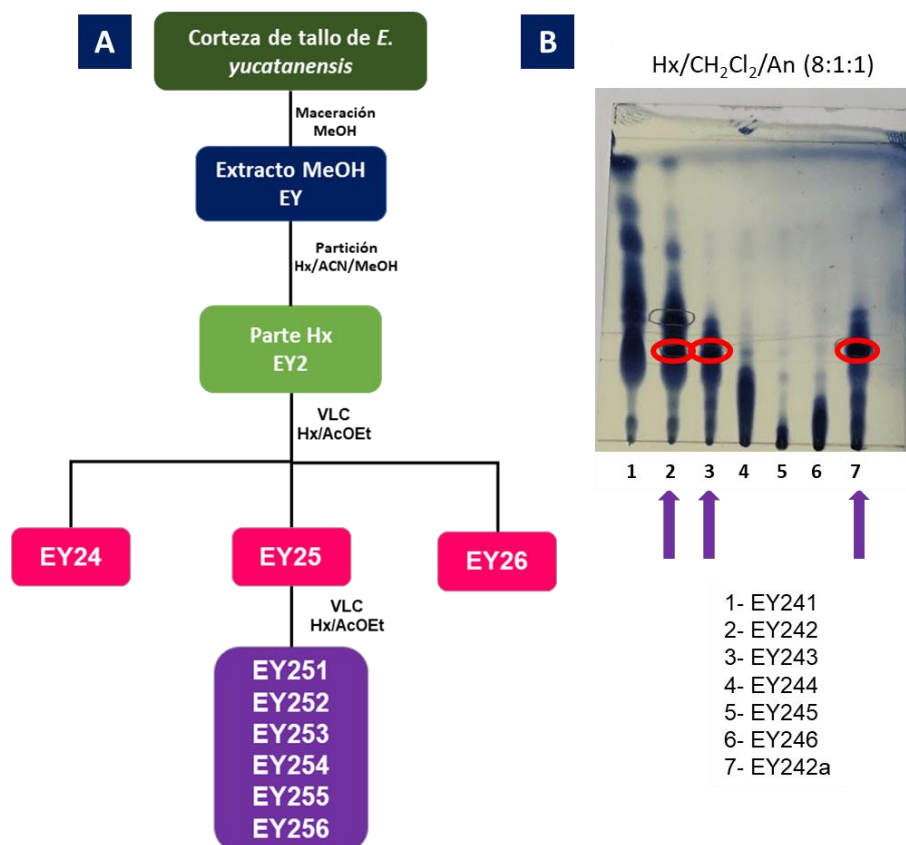


Figura 2.19 Fraccionamiento de EY25 mediante cromatografía líquida de vacío (CLV). (A) Diagrama de fraccionamiento. (B) CCD de fracciones obtenidas, la banda señalada en círculo rojo corresponde a TO2.

2.3.11 Fraccionamiento de EY212: Cromatografía de permeación en gel

La fracción EY212 mostró inhibición de la hemaglutinación. Una muestra de 500 mg de EY212 fue fraccionada mediante cromatografía de permeación en gel (CPG) con la finalidad de separar los compuestos con actividad biológica y determinar qué proceso de separación es el más adecuado. Para la columna cromatográfica se utilizó como fase estacionaria Sephadex, las medidas de la columna fueron 2 cm de diámetro y la altura fue de 33 cm. La fase móvil fue MeOH en sistema de elución isocrático (Tabla 2.11). Se colectaron 46 tubos con volumen de 3 mL y se analizaron mediante CCD (Hx/CH₂Cl₂/An), 60:20:20) y se reunieron las fracciones con perfiles similares (Figura 2.20).

Tabla 2.11 Fracciones obtenidas de la CPG de EY212.

Fracción	Tubos reunidos	Sistema (%) MeOH	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	1-6	100	EY2634A	26.8
2	7-9	100	EY2634B	90.1
3	10-12	100	EY2634C	98.2
4	13-16	100	EY2634D	110.6
5	17-20	100	EY2634E	49.2
6	21-23	100	EY2634F	5.8
7	24-33	100	EY2634G	1.9
8	34-46	100	EY2634H	9.4
9	final	100	EY2634I	9.5

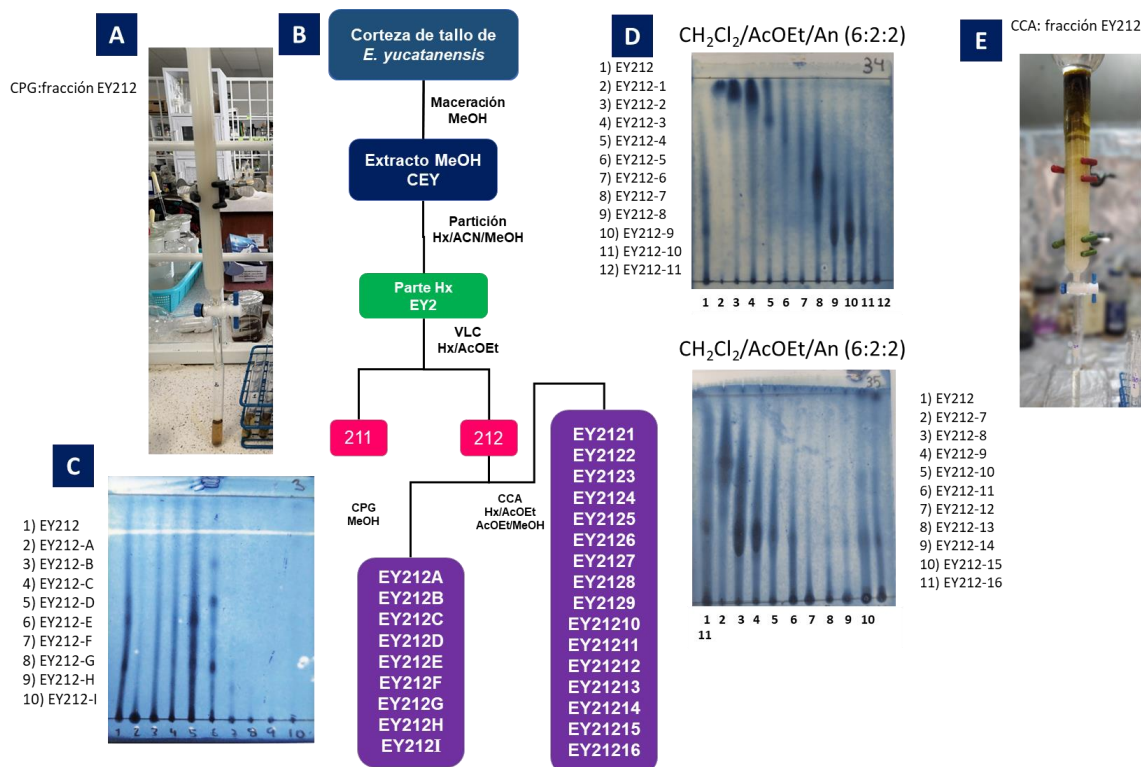


Figura 2.20 Fraccionamiento de EY212. (A) CPG de EY212. (B) Diagrama de fraccionamiento. (C) CCD de fracciones obtenidas de CPG. (D) CCD de fracciones obtenidas por CCA. (E) CCA de EY212 obtenidas mediante CCA y CPG.

2.3.12 Fraccionamiento de EY212: Cromatografía en columna de adsorción

Una muestra de 3 g de EY212 se fraccionó mediante cromatografía en columna de adsorción (CCA), utilizando como fase estacionaria gel de sílice, las medidas de la columna fueron 3.5 cm de diámetro y la altura final de la fase estacionaria fue de 30 cm. Como fase móvil se utilizó un sistema de elución de polaridad creciente con Hx/AcOEt y AcOEt/MeOH, se colectaron las fracciones de 9 mL en tubos de 20 mL. En la Tabla 2.12 se muestra el gradiente de disolventes empleado. Cada una de las fracciones se analizó mediante CCD (Hx/CH₂Cl₂/An), 60:20:20) y se reunieron las fracciones con perfiles similares (Figura 2.21). Las fracciones EY212-8 y EY212-9 obtenidas de EY212 mediante columna de gravedad fueron evaluadas con el ensayo IHA. En CCD estas dos fracciones mostraron perfiles no tan complejos en comparación con las otras fracciones obtenidas, y debido a ello se decidió continuar analizándolas. En la Figura 2.22 se observa que de ambas fracciones tienen actividad IHA incluso a 6.25 µg/mL.

Tabla 2.12 Fracciones obtenidas en la CCA (EY212).

Fracción	Sistema (%) Hx/AcOEt/MeOH	Volumen (mL)	Tubos reunidos	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	70:30	200	1-18	EY212-1	6.8
2	60:40	200	19-24	EY212-2	11.2
3	50:50	200	25-30	EY212-3	12.4
4	35:65	200	31-57	EY212-4	107.5
5	25:75	200	58-72	EY212-5	179.5
6	10:90	200	73-84	EY212-6	396.4
7	00:100	200	85-99	EY212-7	720
8	75:25	200	100-117	EY212-8	485.7
9	50:50	200	118-126	EY212-9	129.9
10	25:75	200	127-147	EY212-10	115.4
11	00:100	200	148-153	EY212-11	421.2
12	00100		154-169	EY212-12	78
13			170-191	EY212-13	18.6
14			192-201	EY212-14	8.7
15			202	EY212-15	16.9
16			203	EY212-16	13.5

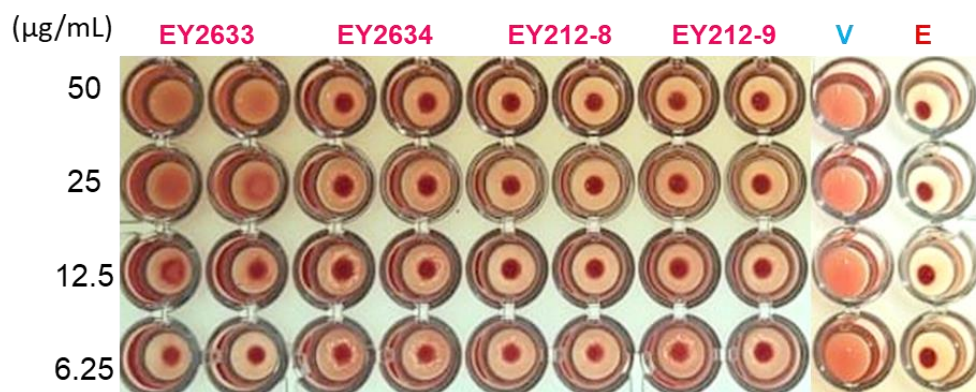


Figura 2.21 Ensayo IHA de fracciones de EY112 que mostraron perfiles cromatográficos más simples (EY212-8 y EY212-9), comparadas con fracciones que anteriormente mostraron actividad IHA. (V=virus+eritrocitos; E=eritrocitos).

2.3.13 Fraccionamiento de EY212-8: Cromatografía de permeación en gel

La fracción EY212-8 (153 mg) mostró inhibición de la hemaglutinación, fue fraccionada mediante cromatografía en columna de exclusión molecular (Figura 2.22). Para la columna cromatográfica se utilizó como fase estacionaria Sephadex; las medidas de la columna fueron 1 cm de diámetro y la altura de 45 cm. La fase móvil fue MeOH en sistema de elución isocrático. Se colectaron 90 tubos con volumen de 1 mL, se les realizó CCD (Hx/CH₂Cl₂/An), 60:20:20) y se reunieron las fracciones con perfiles similares (Tabla 2.13).

Tabla 2.13 Rendimiento de Fracciones de la CPG de EY212-8.

Fracción	Tubos reunidos	Sistema (%) MeOH	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	1-28	100	Vol. muerto	
2	29-53	100	EY212-8A	262.6 mg
3	54-79	100	EY212-8B	41.4 mg
4	80-90	100	EY212-8C	12.5 mg

2.3.14 Fraccionamiento de EY212-9: Cromatografía de permeación en gel

La fracción EY212-9 (90 mg) mostró inhibición de la hemaglutinación, fue fraccionada mediante cromatografía en columna de exclusión molecular (Figura 2.22). Para la columna cromatográfica se utilizó como fase estacionaria Sephadex; las medidas de la columna fueron 1.5 cm de diámetro y la altura final de la sílica fue de 45 cm. La fase móvil fue MeOH en sistema de elución isocrático. Se colectaron 90 tubos con volumen de 1 mL, CCD (Hx/CH₂Cl₂/An), 60:20:20) y se reunieron las fracciones con perfiles similares (Tabla 2.14).

Tabla 2.14 Rendimiento de Fracciones de la CPG de EY212-9.

Fracción	Tubos reunidos	Sistema (%) MeOH	Nomenclatura	Rendimiento (peso)
1	1-28	100	Vol. muerto	
2	29-53	100	EY212-9A	50.4 mg
3	54-62	100	EY212-9B	5 mg
4	63-69	100	EY212-9C	1.8 mg
5	70-83	100	EY212-9D	4.71 mg
6	84-90	100	EY212-9E	13.7 mg

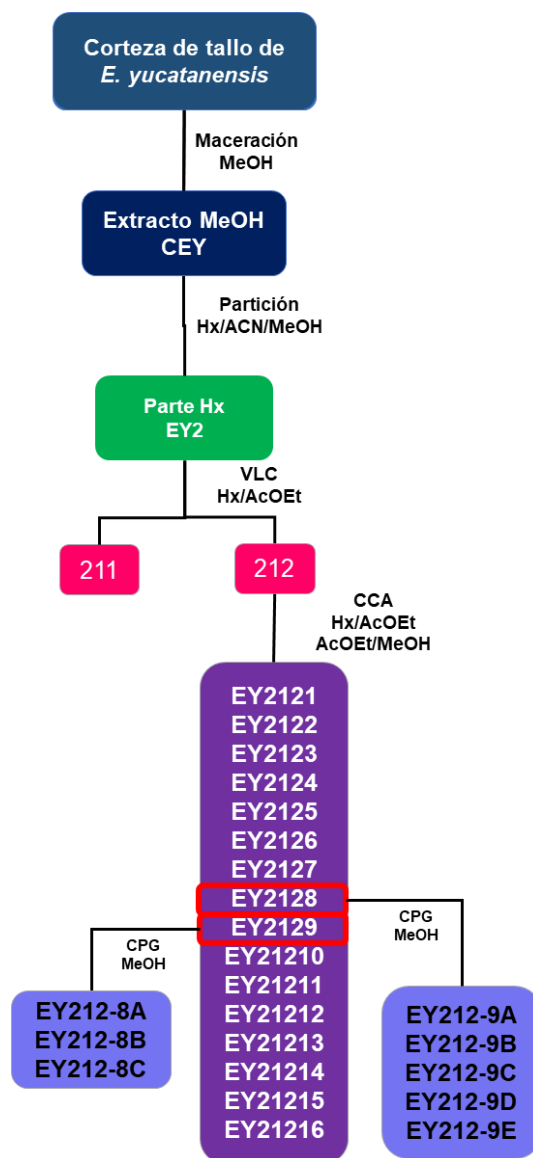


Figura 2.22 Fraccionamiento de EY212-8 y EY212-9 mediante CPG.

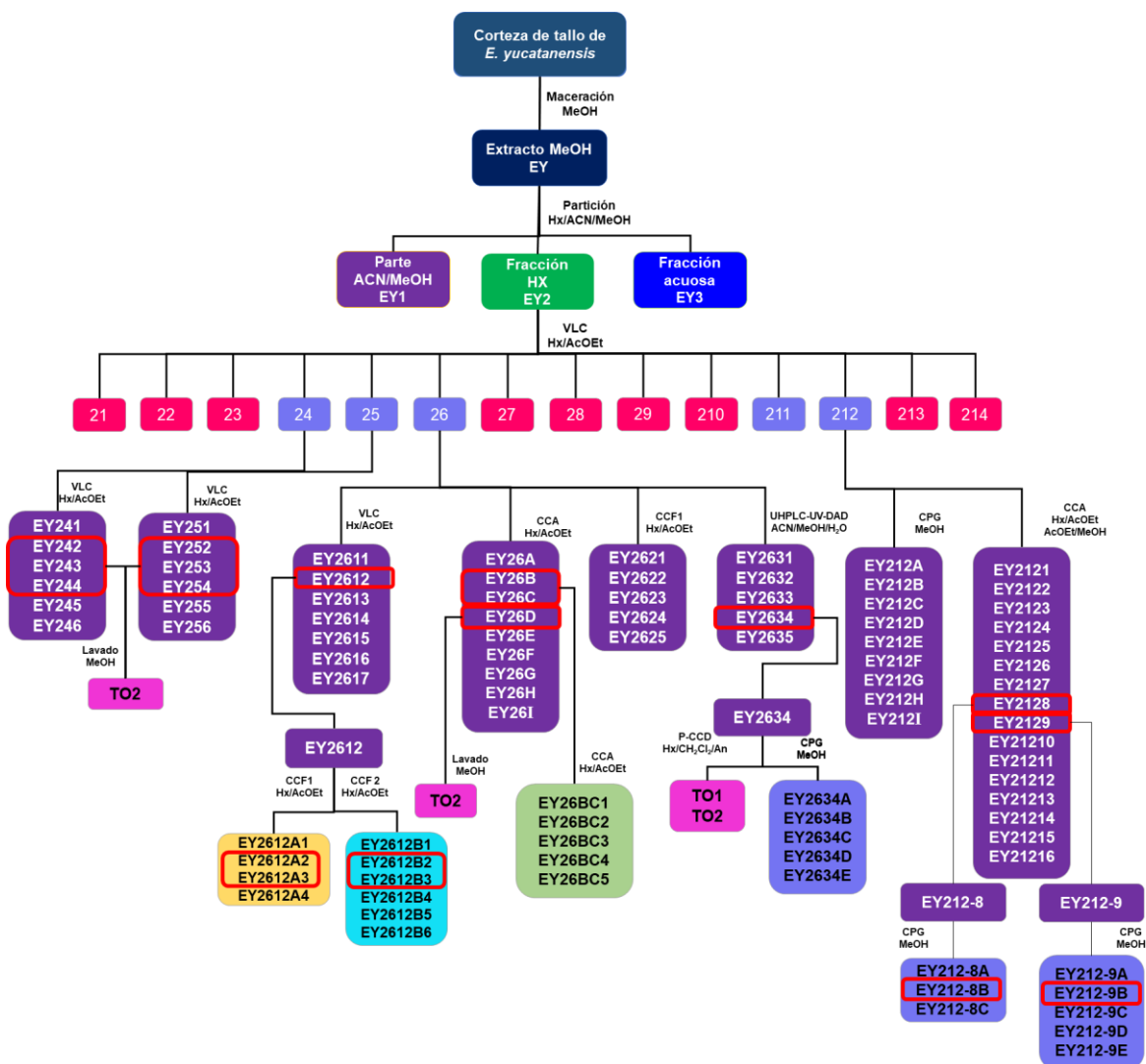


Figura 2.23 Diagrama general de fraccionamiento biodirigido con el ensayo IHA de los componentes bioactivos en el extracto de corteza de tallo de *E. yucatanensis*.

2.4 DISCUSIÓN

El fraccionamiento biodirigido del extracto de corteza de *E. yucatanensis* al ser un proceso complejo fue necesario recurrir a ensayos biológicos que facilitaran la búsqueda de los componentes bioactivos. Este proceso se realizó durante los primeros semestres; donde a partir de las tres colectas realizadas se obtuvo un rendimiento de 4.4%. Para esta planta se reportaron rendimientos de 4.4% y 6.27% durante la época de secas (Cetina-Montejo, 2012; May-May, 2013). Por lo tanto, se sugiere que la mejor época para colectar esta planta y así obtener un mayor rendimiento es la época de secas.

Adicionalmente, se reportó actividad inhibitoria del virus de influenza AH1N1 en el ensayo de Reducción del efecto citopático a nivel de cotratamiento; Esta actividad está localizada en distintas fracciones que muestran un elemento común (TO2); El rango de concentraciones activas va de 50 a 6.25 g/mL. Sin embargo, existen otras fracciones distintas a TO2 (EY24, EY25, EY26, EY211 y EY212) que demuestran actividad inhibitoria de HA, lo que sugiere que esta especie es rica en compuestos antivirales. Así también se evidenció la presencia de actividad IHA en distintas fracciones que inclusive eran mas activas que TO2 (25 µg/mL). El análisis por CCD mostró un perfil similar entre las subfracciones más activas comparadas con TO2, lo que sugiere que distintas proporciones de los componentes presentes en TO2 podrían tener un efecto en su actividad IHA.

Diversas estrategias de fraccionamiento fueron utilizadas para llegar a la mezcla de fitoesteroles TO2; entre estas la partición Hx inicial, seguida de una CLV y una CCG, son las estrategias más recomendables para la obtención de estos componentes bioactivos. Esto pone en evidencia que los extractos de corteza de *E. yucatanensis*, son matrices complejas de compuestos. En un trabajo previo de actividad antiviral de esta especie, se encontró la presencia de diversos terpenos y esteroides, lo que complica el fraccionamiento y purificación de esta especie. Para futuros trabajos con esta especie, se recomienda realizar una extracción directa con hexano ya que de esta manera se obtienen matrices menos complejas y fáciles de purificar. Así mismo, evaluar el efecto de distintas concentraciones de los componentes activos que se logren identificar en TO2 con la HA.

3 CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES CON ACTIVIDAD ANTI-HA Y EFECTO DE LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE SU ESTRUCTURA

3.1 INTRODUCCIÓN

Los componentes bioactivos presentes en los extractos vegetales, también conocidos como metabolitos secundarios, son moléculas químicas que las plantas producen en pequeñas cantidades. De las cuales algunas tienen funciones específicas que intervienen en el mecanismo de defensa de las plantas y que al mismo tiempo tienen un importante valor medicinal (Newman *et al.*, 2016). Como ejemplos de estos metabolitos se encuentran los compuestos fenólicos, cumarinas, saponinas, esteroides, alcaloides entre otros (Oliveira *et al.*, 2017).

Las técnicas analíticas como la espectroscopía y la cromatografía constituyen una poderosa herramienta que permite la obtención rápida de información sobre pequeñas cantidades de muestra (Karpagasundari *et al.*, 2014). Por lo tanto, el empleo de técnicas analíticas que permitan elucidar la estructura de estos componentes, es fundamental para determinar sus posibles aplicaciones a futuro.

En el descubrimiento de potenciales fármacos existen diversas estrategias, hasta la identificación de una o varias moléculas líder, que posteriormente son sometidas a modificaciones químicas, con el objetivo de mejorar sus propiedades de solubilidad, potencia, absorción, distribución, metabolismo, o incluso para la disminución de sus efectos secundarios (Gao *et al.*, 2011). Asimismo, algunos fármacos han sido descubiertos al azar a partir de modificaciones químicas que mejoran su potencia y efectividad. En otras palabras, los derivados obtenidos a partir de un componente bioactivo permiten el análisis de la relación estructura-actividad, así como el entendimiento de los grupos funcionales de interés que interactúan con el sitio activo (Xiao *et al.*, 2018).

Referente a la identificación de los componentes presentes en las fracciones con actividad IHA, la determinación de las estructuras químicas se llevó a cabo empleando diferentes técnicas analíticas, tales como Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC),

Espectroscopia infrarroja (FTIR), Cromatografía de gases (CG-MS) y Resonancia magnética nuclear (RMN). Además, se realizó la cuantificación de componentes mediante cromatografía de gases (GC-FID) utilizando un estándar interno. Finalmente, se determinó un posible grupo funcional responsable del bloqueo de la proteína viral HA; para ello, se realizó una modificación química a los componentes activos en TO2, los derivados obtenidos fueron caracterizados con técnicas analíticas para evaluar el efecto de la modificación química realizada.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Técnicas cromatográficas

3.2.1.1 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-UV-Vis)

Las fracciones con actividad IHA se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés), para lo cual se utilizó un cromatógrafo de la marca Perkin Elmer modelo Flexar Fx-20, equipado con un detector UV-Vis y PDA, con una columna Luna 5u C18 (2), con un tamaño de 250×4.6 mm y un tamaño de poro de 100 Å, el sistema de disolventes manejado fue de acetonitrilo (ACN) y agua (H₂O), con un gradiente de concentración, para poder analizar la complejidad de la muestra, los tiempos de análisis se establecieron en dos diferentes lapsos uno de 22 min y otro de 60 min; a una longitud de onda de 220 nm, a un flujo de 0.7 mL/min, y temperatura constante de 48°C.

3.2.1.2 Cromatografía de ultra alto rendimiento (UHPLC-UV-DAD)

Se utilizó un sistema de UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific) acoplado con una columna analítica de C18 de la marca Zorbax Eclipse Plus (Agilent Technologies) de 150 mm por 4.6 mm de ancho con un tamaño de partícula de 3.5 µm. Para la elución de los analitos se utilizó un sistema isocrático a 1.0 mL/min con Metanol:Acetonitrilo:Agua (50:25:25, v/v/v), volumen de inyección de 10 µL y un tiempo total de análisis de 40 min. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 210 nm.

3.2.1.3 Cromatografía de ultra alto rendimiento UHPLC-MS/MS-QqQ

Se utilizó un sistema UHPLC Agilent Technologies 1290 infinity con una columna analítica de C18 de la marca Zorbax Eclipse Plus (Agilent Technologies) de 150 mm por 4.6 mm de ancho con un tamaño de partícula de 3.5 µm. Se utilizó un sistema isocrático a 1.0 mL/min con Metanol:Acetonitrilo:Agua (50:25:25, v/v/v), volumen de inyección de 10 µL y un tiempo total de análisis de 40 min. El sistema UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6470 (Agilent Technologies) con fuente de ionización ESI en modo negativo con un intervalo de m/z de 100 a 3,000. Para la fuente de ionización se utilizó como gas de ionización, Nitrógeno de ultra alta pureza; a un caudal de 13 L/min a 350°C y una temperatura de revestimiento de la fuente de 400°C con un voltaje de 4000 V. La lectura de los iones se realizó en monitoreo total de iones.

3.2.1.4 Cromatografía de gases acoplada un espectrómetro de masas GC-MS

Las fracciones TO1 y TO2 se analizaron con cromatografía de gases, con un cromatógrafo de la marca Agilent Technologies 740A acoplado a un detector de masas Agilent Technologies 597C, con una columna Agilent Technologies 190915-433HP-5MS 5% Fenil- 95% metilpolisiloxano (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 μm de espesor de película. Se utilizó como gas acarreador Helio, los parámetros en el equipo fueron una temperatura inicial de 120°C por 2 min, incremento de 15°C/min a 200°C en 2 min, y 10°C/min a 300°C en 15 min, y así permaneció por 15 minutos más.

3.2.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Las fracciones de interés se analizaron mediante Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El equipo empleado fue un espectroscopio marca BRUKER modelo Tensor II con un detector ATR de punta de diamante, los datos se colectaron usando un intervalo de medición de 500-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 scans en el intervalo de longitud de onda antes especificado. Para el tratamiento de datos: se realizó una compensación por CO_2 atmosférico para cada espectro y también se realizó una corrección del ángulo del ATR de diamante empleado (estas correcciones las realiza el equipo).

3.2.3 Resonancia magnética nuclear (RMN- ^1H)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es comúnmente usada para la caracterización estructural de la materia en estado líquido y sólido, por medio de la interacción de ondas de radio y los diferentes estados de espín que tienen los núcleos atómicos cuando se encuentran dentro de un campo magnético. Para este análisis se utilizó un equipo de la marca VARIAN/AGILENT modelo Premium-COMPACT de 600 MHz con un campo magnético de 14.1 T, que tiene la capacidad para realizar estudios de RMN multinuclear y como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Se obtuvo el espectro 1D de ^1H .

3.2.4 Cuantificación de componentes mediante cromatografía de gases (GC-FID)

La cromatografía de gases es una técnica de separación de analitos que permite identificar y cuantificar un gran número de compuestos. El método de estándar interno consiste en la normalización de áreas obtenidas en los cromatogramas de los analitos de interés. Después de analizar TO2 mediante GC-MS se encontraron tres triterpenos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol. Estos triterpenos fueron cuantificados mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo de la marca VARIAN modelo 430-GC, equipado con un detector de Ionización de Llama (FID), y una columna marca Agilent HP-5ms de baja polaridad con las siguientes características: 30 m de longitud, diámetro de 0.320 mm, espesor de película de 0.5 μ m, temperatura desde -60°C hasta 325°C. A continuación, se describe el proceso para la cuantificación de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2 por el método estándar interno.

Inicialmente se prepararon una serie de diluciones con concentraciones crecientes, a partir de soluciones patrón con CH_2Cl_2 a una concentración de 0.02 mg/ μ L de cada estándar correspondiente (Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol). Para cada dilución se agregaron diferentes cantidades de volumen de las soluciones patrón de los estándares, de acuerdo con los intervalos de concentración en la muestra TO2, y también se añadió la misma cantidad de volumen (20 μ L) de estándar interno a una concentración 0.02 mg/ μ L. Posteriormente se agregó la cantidad necesaria de CH_2Cl_2 para que el volumen final de cada dilución fuera de 500 μ L. Para este proceso se utilizó como estándar interno Vainillina. La muestra TO2 se preparó de manera similar a las diluciones de los estándares, sin embargo, en este caso de la solución patrón de TO2 a una concentración: 0.02 mg/ μ L se tomaron 250 μ L, también se añadieron 20 μ L de estándar interno y 230 μ L de CH_2Cl_2 para obtener un volumen final de 500 μ L.

Las diluciones de los estándares de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol y la muestra TO2 se inyectaron por triplicado (3 μ L de cada dilución y de TO2). Con los cromatogramas obtenidos se calcularon las áreas de los estándares y del estándar interno. La curva de calibración se construyó con las concentraciones calculadas con la ecuación 2 de las diferentes diluciones, contra las áreas calculadas con la ecuación 3. Finalmente, para calcular la concentración de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2 se utilizó la ecuación cuatro obtenida de la curva de calibración, donde Y es el área y la concentración en X. El valor de X obtenido se multiplica por la concentración del estándar interno para obtener la concentración de cada componente (Figura 3.1).

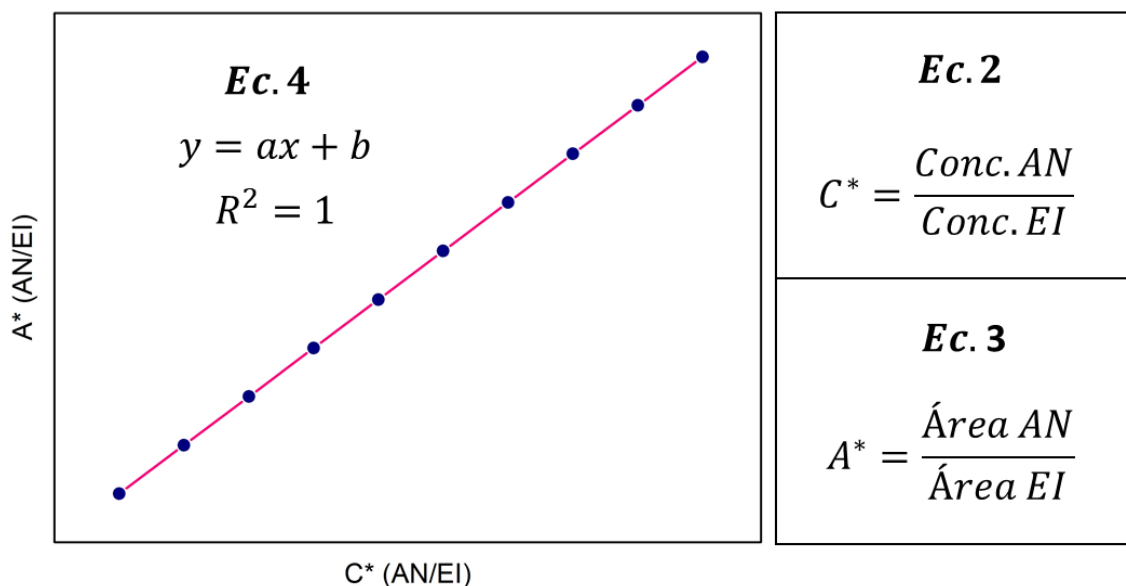


Figura 3.1 Ecuaciones para obtener los valores de Área* y de Concentración*, curva de calibración para calcular la relación de concentración de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2.

3.2.5 Derivatización de componentes con actividad IHA

La transformación química de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol, en derivados de estructura similar, podría modificar sus propiedades químicas como mezcla. Por lo que, se planteó modificar químicamente las estructuras de estos compuestos reemplazando los grupos hidroxilos (-OH) presentes mediante reacciones de derivatización tales como acetilación; esta reacción consiste en introducir un grupo acetilo en una estructura química. Los reactivos utilizados para este procedimiento fueron Piridina JT BAKER, Anhídrido acético ((CH₃CO)₂) ALDRICH, Ácido clorhídrico (HCl) CTR SCIENTIFIC, Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) TÉCNICA QUÍMICA, Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) JT BAKER. CH₂Cl₂ grado analítico y agua destilada.

3.2.5.1 Metodología de reacción de acetilación:

Para la reacción de acetilación (Figura 3.2), se preparó una mezcla de 10.1 mg de TO2 (mezcla de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol), 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina, la cual se dejó en agitación mecánica dentro de una campana de extracción a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se recuperó con 50 mL de agua destilada y la suspensión resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (3x, 1:1, v/v). Posteriormente la fase orgánica se lavó con HCl al 5% (2x, 1:1, v/v), y NaHCO_3 al 5% (2x, 1:1, v/v). Finalmente, se saturó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y la solución resultante fue concentrada a presión reducida. Los derivados obtenidos fueron almacenados en diferentes viales etiquetados, para calcular el rendimiento y su caracterización.

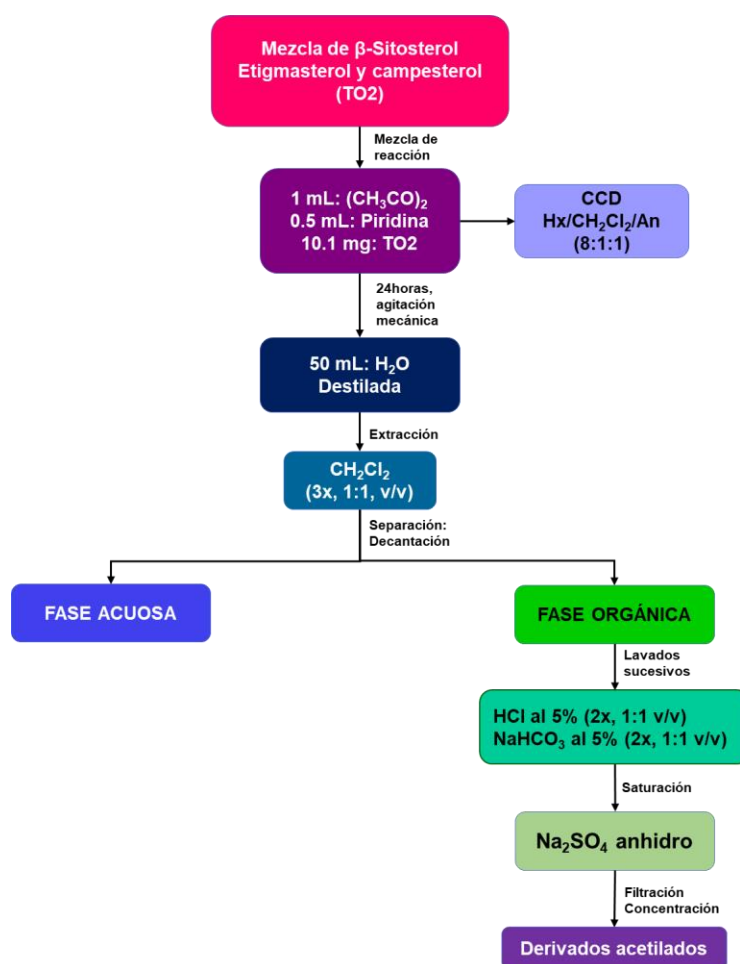


Figura 3.2 Diagrama de proceso empleado para la acetilación de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 UHPLC-UV-DAD

La identificación de los componentes con actividad IHA en el extracto de corteza de tallo de *E. yucatanensis* se realizó mediante diferentes técnicas analíticas. Los análisis preliminares mediante UHPLC mostraron que las fracciones con actividad IHA presentaban picos característicos como es el caso de las fracciones EY24, EY25, EY26, EY211 y EY212 (Figura 3.3); los picos observados en los primeros minutos corresponden a los componentes más polares de las fracciones analizadas, y se observan en todas las fracciones, pero con abundancia diferente entre cada una, es decir, la concentración de estos varía entre cada fracción. El pico observado en el minuto 12 está presente desde el extracto metanólico y aumenta conforme se va realizando el fraccionando biodirigido. También se observa la misma tendencia para el pico en el minuto 19, sin embargo, este solo se encuentra en gran abundancia en las fracciones EY24, EY25 y EY26, las cuales presentan un perfil muy similar entre sí.

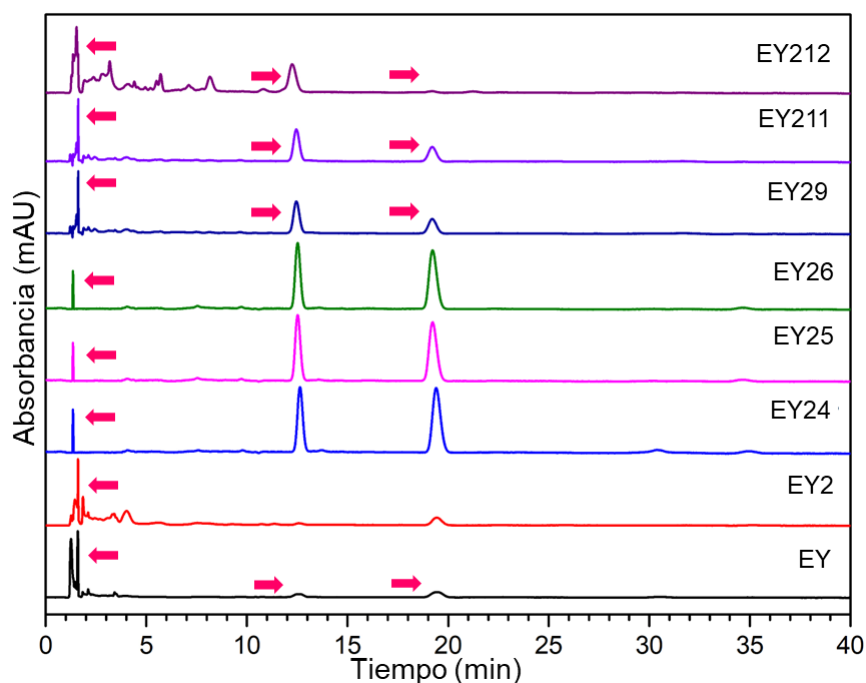


Figura 3.3 Perfil cromatográfico de las fracciones de EY2 obtenidas mediante CLV y que tienen actividad anti-hemaglutinina (A-H)

Por otro lado, las subfracciones de EY26 obtenidas por CLV que presentaron actividad IHA, fueron EY2612, EY2614, EY2615 y EY2617. Se observa que en el TR=2 min hay una serie de picos con mayor intensidad en las subfracciones EY2615 y EY217, mientras que en las subfracciones EY2612 y EY2614, se observan los mismos picos en TR=12-13 min y TR=19-20 min. La subfracción EY2615 tiene el perfil cromatográfico más complejo, y a su vez fue la fracción que tuvo mayor porcentaje de inhibición de la proteína viral HA. Los componentes que corresponden a estos picos en EY2615 podrían en conjunto o por separado ser los que inhiben a la HA. Por lo tanto, mediante UHPLC-MS se decidió realizar un cálculo aproximado del peso molecular de los componentes de estos dos picos (Figura 3.4).

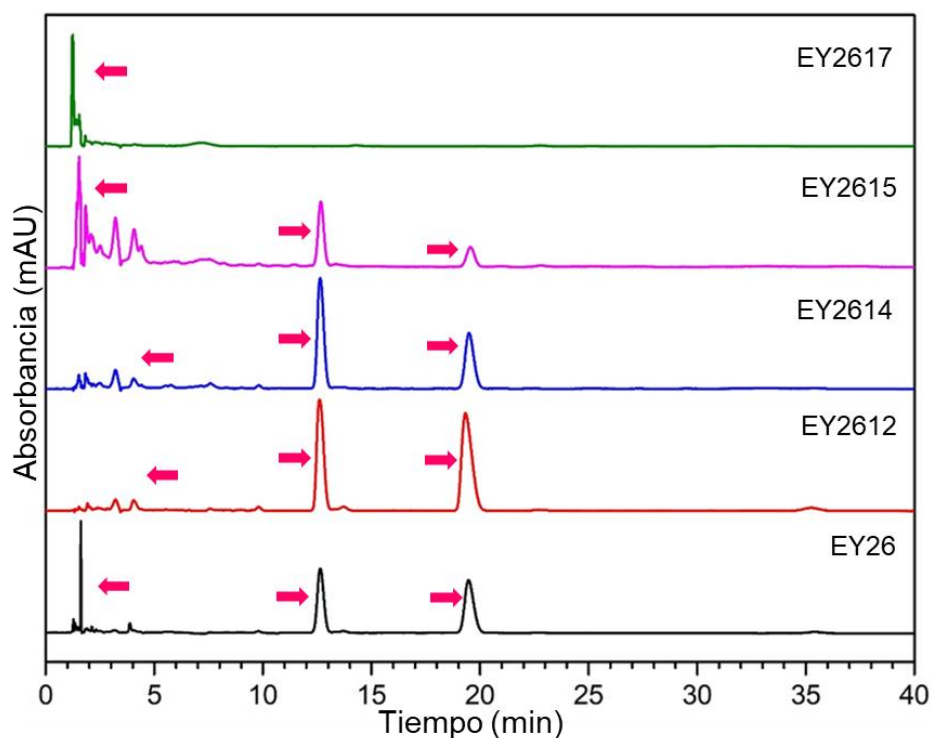


Figura 3.4 Perfil cromatográfico de las fracciones de EY26 obtenidas mediante CLV y que tienen actividad anti-hemaglutinina (anti-HA)

3.3.2 HPLC-MS/MS-QqQ

Con cromatografía líquida de ultra alta resolución se realizó una aproximación del peso molecular de los picos obtenidos mediante UHPLC. En el perfil cromatográfico de EY26 se observaron 3 picos principales, los dos primeros observados en los minutos 12 y 19 y el tercer pico apenas perceptible en el minuto 35, por lo que podría tratarse de un componente con muy pocos dobles enlaces en su estructura, sin embargo, se requiere continuar analizando estos componentes. En la Figura 3.5 se presenta el perfil de masas de cada uno de estos picos, los cuales presentan un patrón de fragmentación similar y el ion molecular de cada uno tiene una diferencia de 4 unidades. Con base en esta observación, los componentes en EY26 podrían ser una mezcla de componentes de la misma naturaleza química.

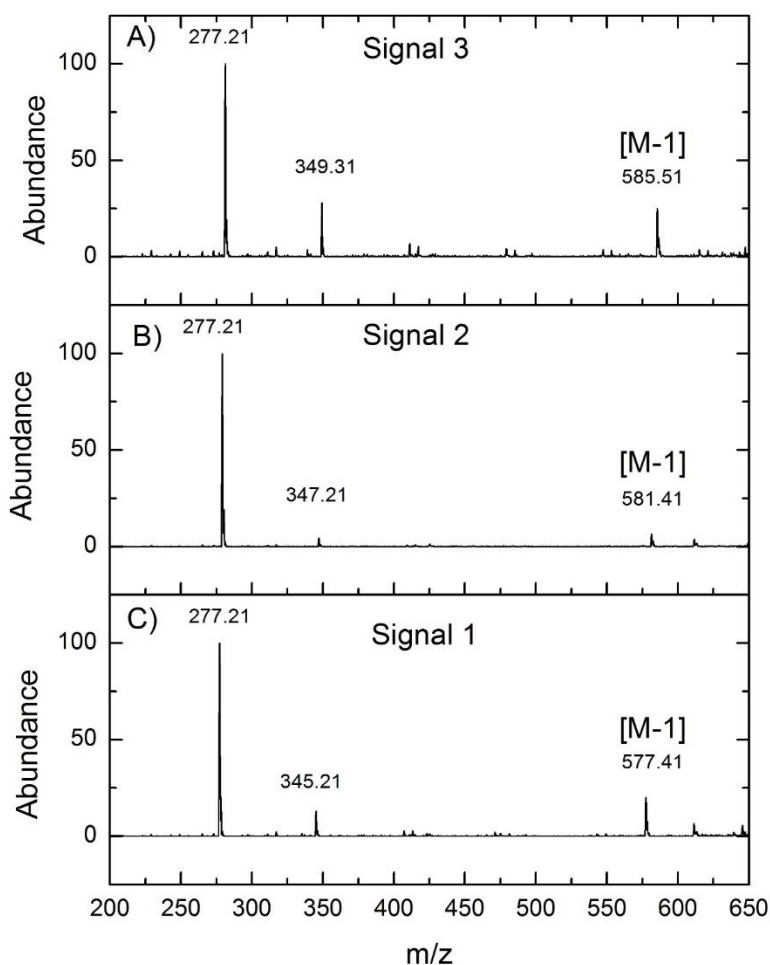


Figura 3.5 Perfil de UHPLC-MS de EY26 esta fracción tiene tres componentes con pesos de 576.4 para el pico 1, 580.4 para el pico 2, y 584.5 para el pico 3.

3.3.3 HPLC (UV-Vis, PDA)

La fracción TO2 (subfracción de EY26) que presentó los mejores resultados de actividad IHA se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), después de hacer varias pruebas modificando los parámetros de análisis, se estableció utilizar un sistema de acetonitrilo (ACN) y agua (H₂O), con un sistema de elución de polaridad ascendente. En la Figura 3.6 se puede observar el cromatograma de la fracción TO2 donde en el minuto 2.5 se observa la presencia de un solo pico; este resultado sugiere dos situaciones, la primera se trata de un compuesto puro y la segunda que se tiene una mezcla de componentes con estructuras tan similares que tienen el mismo tiempo de retención. Sin embargo, la base del pico es muy amplia, lo que apoya que fuesen varios picos traslapados, es decir, una mezcla de compuestos. Por lo tanto, fue necesario analizar TO2 mediante otras técnicas analíticas.

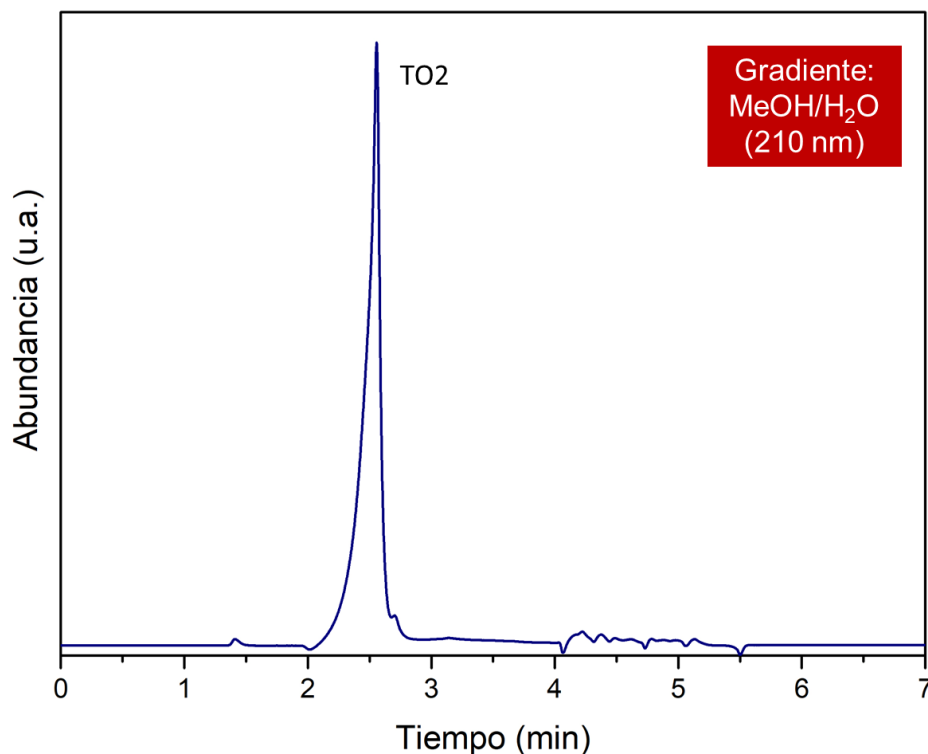


Figura 3.6 Perfil cromatográfico de TO2 mediante HPLC-UV-Vis a una longitud de onda de 210 nm

3.3.4 FTIR-ATR

La fracción TO2 se analizó mediante Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). En el espectro obtenido en la Figura 3.7 podemos observar la banda de vibración de estiramiento de grupos hidroxilos (-OH) en 3400 cm^{-1} , la vibración de flexión de los enlaces carbono-hidrogeno (C-H) sp^3 alrededor de 2900 cm^{-1} ; las bandas que se encuentran en la región de huella dactilar podrían estar relacionadas con grupos metilos y metilenos unidos a la estructura principal. En cuanto al doble enlace de carbono-carbono (C=C) cerca de $1050\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ está relacionado con un grupo vinilo. De acuerdo con los resultados obtenidos, los componentes en TO2 podrían ser alcanos ya sea de cadenas cerradas o abiertas con grupos metilos, metilenos y vinilos unidos a la estructura principal.

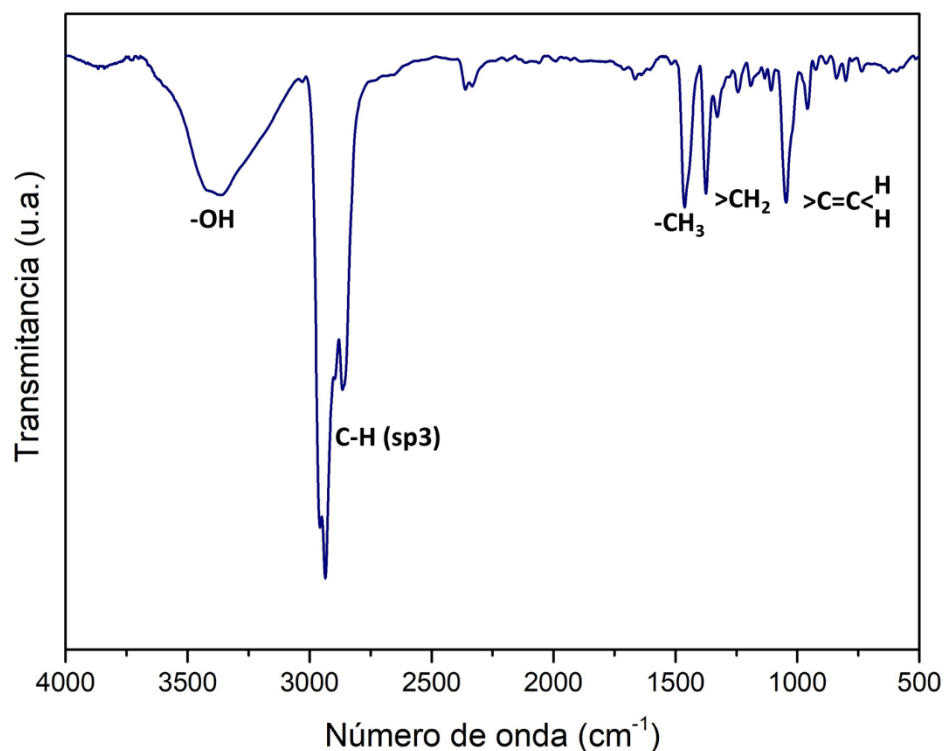


Figura 3.7 Espectro de FTIR de TO2.

3.3.5 GC-MS

La fracción TO2 se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para identificar los compuestos que se encuentran en esta fracción y poder determinar su peso molecular. En la Figura 3.8 se puede observar el cromatograma obtenido el cual consta de 3 picos que salen entre el minuto 20 y 21, y de acuerdo con la base de datos del equipo empleado, estos picos corresponden a tres triterpenos comúnmente encontrados en plantas y que debido a su estructura se obtienen en forma de mezcla, estos triterpenos son Campesterol (pico 1), Estigmasterol (pico 2) y β -Sitosterol (pico 3). Lo que explica porque en las anteriores cromatografías se presentaba TO2 como si se tratara de un componente único.

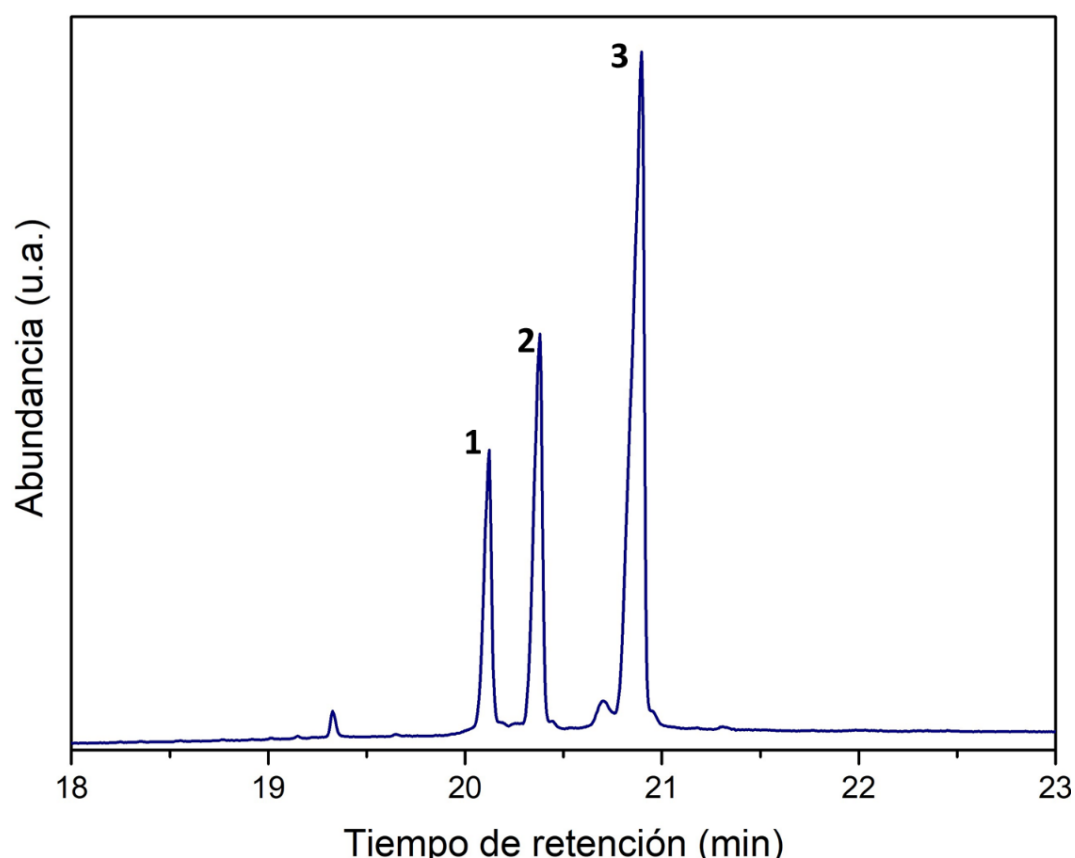


Figura 3.8 Perfil cromatográfico de TO2 obtenido mediante GC-MS, pico 1 campesterol (TR=20.1 min), pico 2 estigmasterol (TR=20.4 min), pico 3 β -sitosterol (TR=20.9 min).

El cromatograma que mostró tres picos principales; RT=20.1 min que corresponde a campesterol ($m/z=400$), 20.4 min a estigmasterol ($m/z=412$) y 20.9 min a β -sitosterol ($m/z=414$). Estos fitoesteroles presentan un patrón de fragmentación similar. Donde los fragmentos m/z 396, corresponden a una pérdida de 18 unidades debido a una molécula de agua (del grupo OH en posición 3 del esterano), este sufre una nueva pérdida dando lugar al fragmento de $m/z=255$, que se forma por la fragmentación de la cadena lateral unida al esterano; por otro lado, se observan claramente los fragmentos obtenidos de la pérdida de la cadena lateral por el esterano original (273 m/z) y la posterior pérdida de 18 unidades debido a la molécula de agua (grupo OH de la posición 3 del esterano) respectivamente (Chang *et al.* 2020) Figura 3.9.

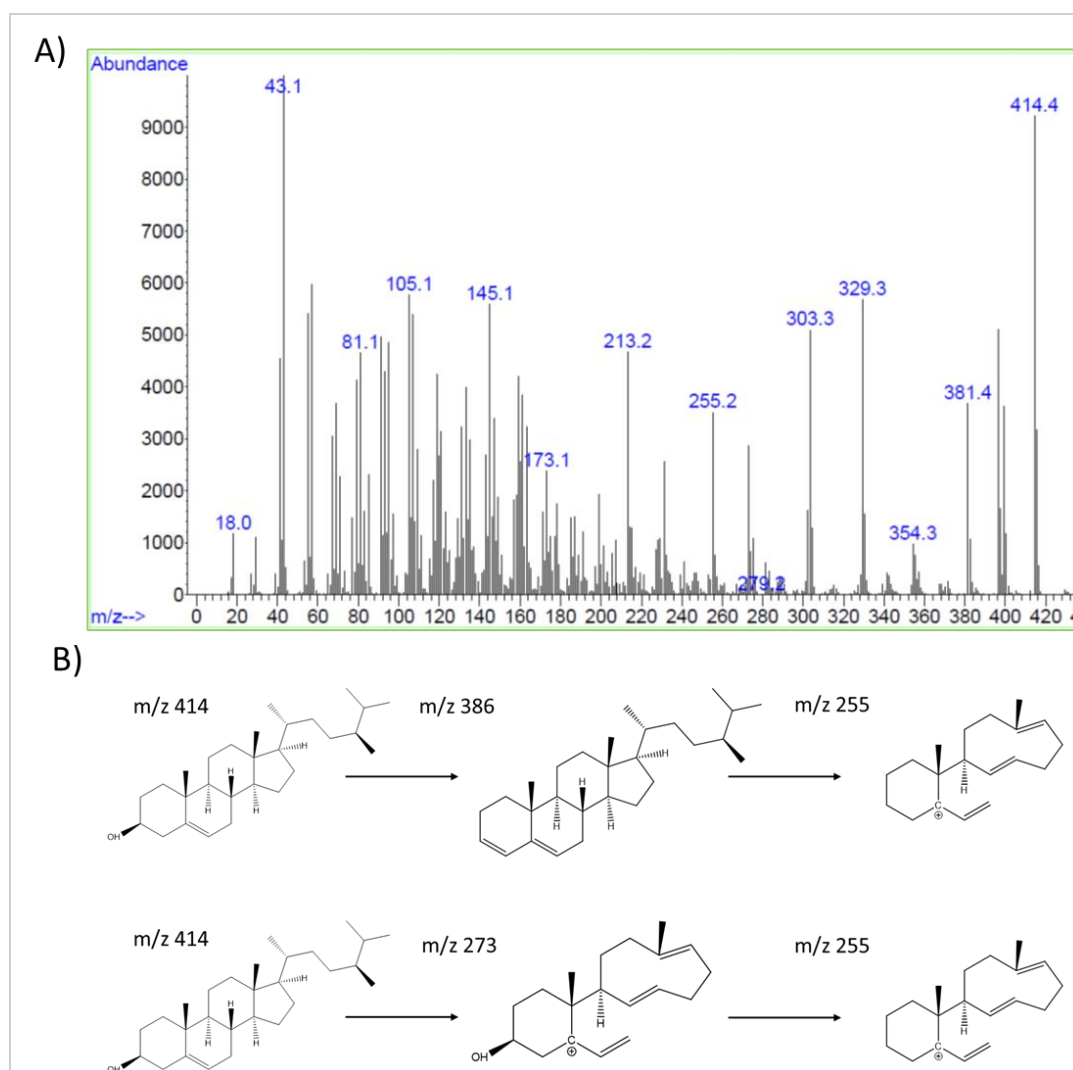


Figura 3.9 Perfil de fragmentación masico (GC-MS) de fitoesteroles, picos principales con RT de 20.10 min, 20.40 min y 20.90 min.

Finalmente, para confirmar la información proporcionada por la base de datos se realizó una co-cromatografía, enriqueciendo a TO2 con estándares analíticos de los triterpenos encontrados. La Figura 3.10 muestra el aumento en la intensidad de cada pico correspondiente a los estándares agregados a la fracción TO2.

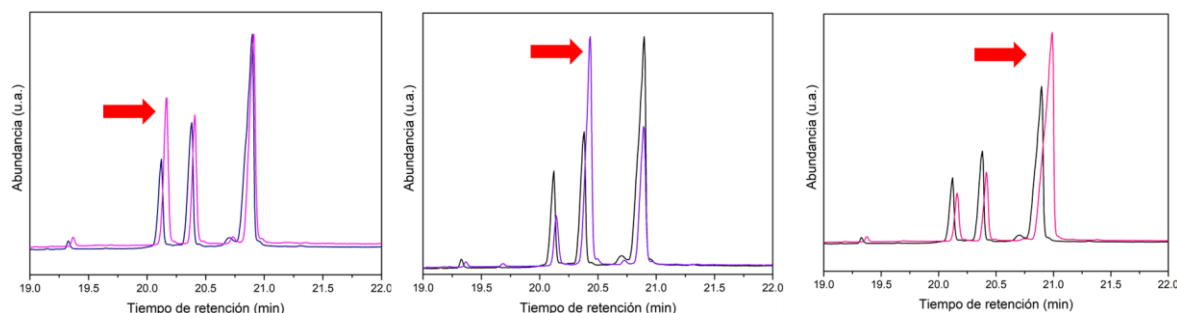


Figura 3.10 Co-cromatografía mediante CG-MS, pico 1 campesterol, pico 2 estigmasterol, pico 3 β -sitosterol.

La fracción EY212 que anteriormente presentó actividad IHA (Figura 2.8, página 52) fue fraccionada por cromatografía en columna hasta llegar a las fracciones EY212-8 y EY212-9, que al ser evaluadas con el ensayo de IHA mostraron actividad inhibitoria, estas fueron nuevamente fraccionadas y analizadas por CG-MS, donde se identificaron mezclas de diversos triterpenos de tipo esteroidal (Figuras 3.11 y 3.12). Cabe resaltar que en estas muestras se volvió a identificar la misma mezcla de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol (tiempos de retención 20.20 min, 20.45 min y 20.97 min). Analizando los tamaños de áreas bajo la curva de los picos se encontró que esta mezcla se encuentra aproximadamente a la misma relación de concentración anteriormente observada en TO2. Motivo por el cual, en este punto se finalizó la parte del fraccionamiento biodirigido de las fracciones EY211 y EY212.

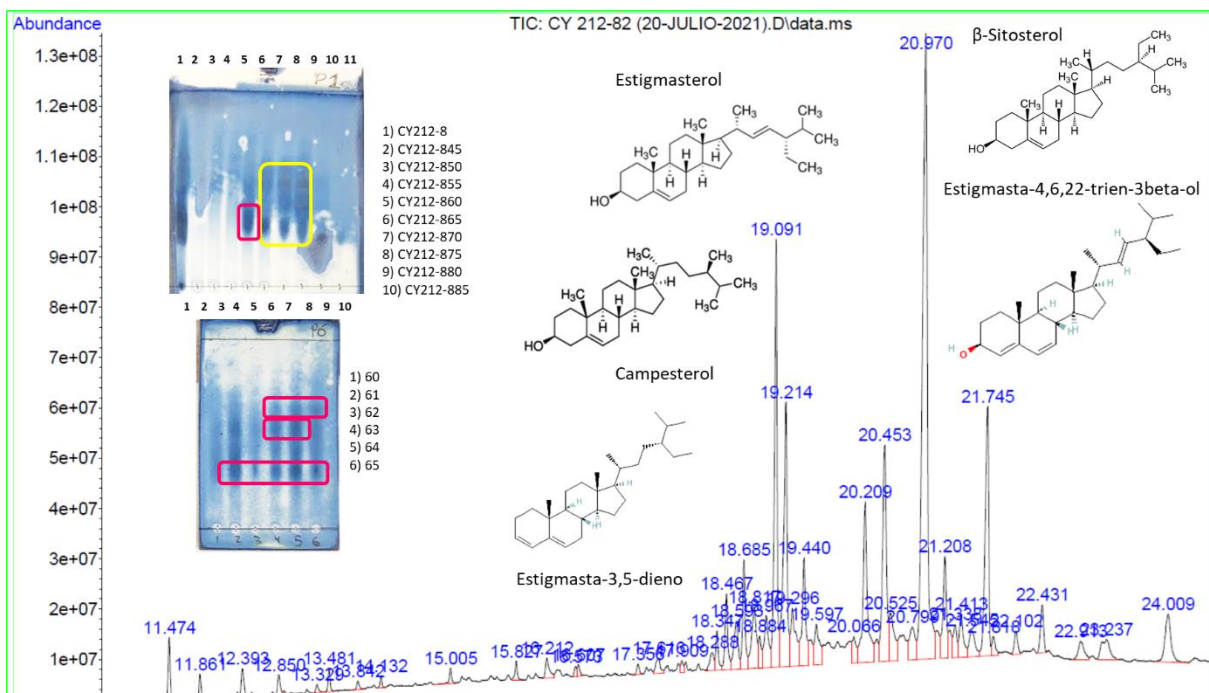


Figura 3.11 Perfil cromatográfico de EY212-82 obtenido mediante GC-MS

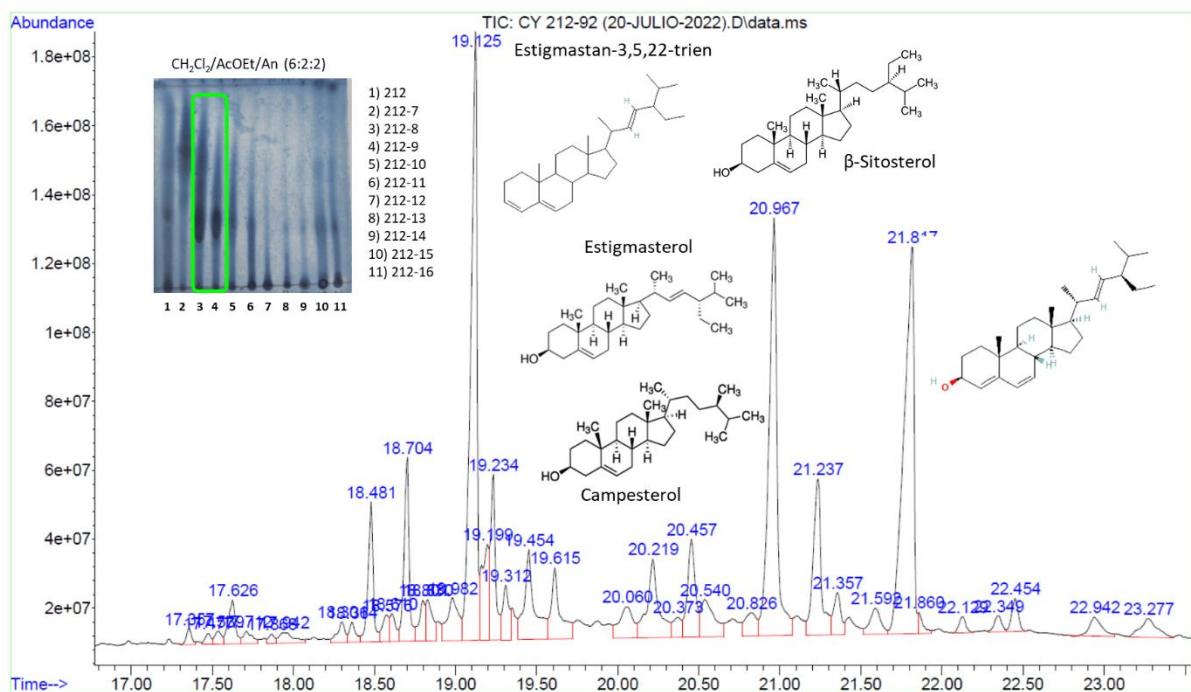


Figura 3.12 Perfil cromatográfico de EY212-92 obtenido mediante GC-MS

3.3.6 Resonancia magnética nuclear (RMN- ^1H)

El análisis de ^1H -NMR de TO2 mostró el perfil característico de los compuestos esteroideos. La serie de señales intensas en campo alto en el espectro (Figura 3.13) están asociadas a los protones de metilos: δ 1,01 (s, 3H, H-19), δ 0,92 (d, 3H, $J=6.2$ Hz, H-21), δ 0,84 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-27), δ 0,82 (d, 3H, $J=6.2$ Hz, H-26), δ 0,81 (s, 3H, H-29) y δ 0,68 (s, H3, H-18). El protón que resuena a δ 3,51 (ddd, 1H $J=15.4$, 10.6, 4.8 Hz, H-3) corresponde al protón de un carbono unido a un grupo hidroxilo; se trata de una señal característica para el hidrógeno situado en la posición 3 del esterano, que según las constantes de acoplamiento permite localizar el grupo hidroxilo en posición β . El resto de señales presentadas entre 2.32 y 1.41 ppm corresponden a los protones de los ciclos y los fragmentos de cadena. Las señales de δ 5,02 (dd, 1H, $J=15.1$, 8,6 Hz, H-22) y δ 5,15 (dd, $J=15.1$, 8.7 Hz, H-23) son características para los protones vinílicos de los carbonos C-22 y C-23 del estigmasterol. Otra señal característica de los esteroides es la observada en el espectro a δ 5,35 (d, 1H, $J=4.9$ Hz, H-6) correspondiente al protón vinilo en la posición 6 del esterano. Con esta información se deduce que los componentes mayoritarios en TO2 son esteroides, tales como, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol que anteriormente fueron identificados por GC-MS y FTIR.

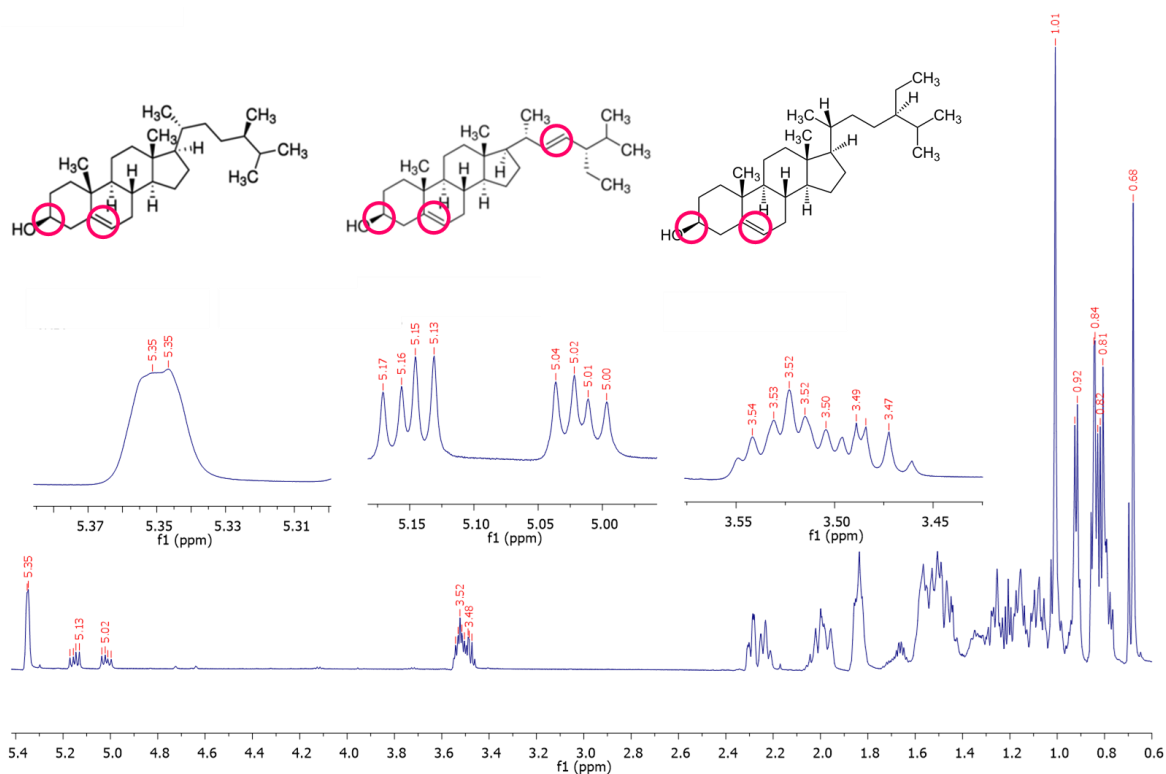


Figura 3.13 Espectro ^1H -NMR de TO2.

3.3.7 Cuantificación de los componentes en TO2 mediante Cromatografía de gases (GC-FID) por el método de Estándar Interno.

Los triterpenos campesterol, estigmasterol y β -sitosterol encontrados en TO2 fueron cuantificados con CG-FID por el método de estándar interno. Por lo tanto, se realizaron curvas de calibración utilizando para cada compuesto Vainillina como estándar interno. En la Tabla 3.1 se muestran los datos utilizados para la preparación de las diluciones de los estándares y de la muestra TO2, así como las concentraciones calculadas ($C^*[AN/EI]$) dividiendo la concentración del analito entre la concentración del estándar interno para obtener los parámetros de la curva de calibración.

Tabla 3.1 Concentraciones calculadas de las diluciones de los estándares y la muestra TO2 (V1=Volumen inicial; AN=Analito; V2=Volumen final; C1=Concentración inicial; EI=Estándar interno; C2=Concentración final).

Componentes	Dil.	V1 AN	V1 EI	V CH ₂ Cl ₂	V2	C1 AN	C1 EI	C2 AN	C2 EI	C (AN/EI)
		μ l	μ L	μ l	μ L	mg/ μ L	mg/ μ L	mg/ μ L	mg/ μ L	mg/ μ L
Campesterol 1mg-500mL (sol patrón)	1	10	20	470	500	0.002	0.002	0.00004	0.00008	0.50
	2	20	20	460	500	0.002	0.002	0.00008	0.00008	1.00
	3	30	20	450	500	0.002	0.002	0.00012	0.00008	1.50
	4	40	20	440	500	0.002	0.002	0.00016	0.00008	2.00
Estigmaterol 1mg-500mL (sol patrón)	1-2*	20	20	460	500	0.002	0.002	0.00008	0.00008	1.00
	2	50	20	430	500	0.002	0.002	0.00020	0.00008	2.50
	4	70	20	410	500	0.002	0.002	0.00028	0.00008	3.50
	5	80	20	400	500	0.002	0.002	0.00032	0.00008	4.00
β -sitosterol 1mg-500mL (sol patrón)	2	60	20	420	500	0.002	0.002	0.00024	0.00008	3.00
	3	80	20	400	500	0.002	0.002	0.00032	0.00008	4.00
	4	100	20	380	500	0.002	0.002	0.00040	0.00008	5.00
	5	120	20	360	500	0.002	0.002	0.00048	0.00008	6.00
TO2 1mg-500mL (sol patrón)	1	250	20	230	500	0.002	0.002	0.001	0.00008	12.5

Se inyectaron por triplicado 3 μ L de las diluciones de los estándares de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol y la muestra TO2, a partir de los cromatogramas se obtuvo el valor de las áreas de los estándares y del estándar interno. Posteriormente se calculó el promedio de los triplicados, para después calcular el promedio de las áreas. Una vez obtenidos los datos se dividieron las áreas de los estándares (AN) entre las áreas del estándar interno (EI), los resultados del $A*[AN/EI]$ se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Datos de las áreas obtenidas a partir de los cromatogramas de las diluciones de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol con estándar interno (Vainillina).

Dil.	Vainillina			Prom áreas	Dil.	Campesterol			Prom áreas	A (AN/EI)
	a	b	c			a	b	c		
1	36.495	38.150	38.783	37.809	1	63.505	61.850	61.217	61.534	1.627
2	20.240	24.339	27.012	23.864	2	79.760	75.661	72.988	76.136	3.190
3	13.848	20.821	21.467	18.712	3	86.152	79.179	78.533	81.288	4.344
4	13.848	14.741	14.716	14.435	4	86.152	85.259	85.284	85.565	5.928
Dil.	Vainillina			Prom áreas	Dil.	Estigmasterol			Prom áreas	A (AN/EI)
	a	b	c			a	b	c		
1	30.629	32.124	16.400	26.38	1	69.371	67.876	83.600	73.62	2.790
2	17.065	19.175	17.373	17.87	2	82.935	80.825	82.627	82.13	4.596
3	12.423	11.126	11.126	11.56	3	87.577	88.874	89.066	88.51	7.657
4	11.337	12.798	12.642	12.26	4	88.663	87.202	87.358	87.74	7.157
Dil.	Vainillina			Prom áreas	Dil.	β -Sitosterol			Prom áreas	A (AN/EI)
	a	b	c			a	b	c		
1	13.496	19.306	19.580	16.40	1	86.504	80.694	80.420	83.60	5.10
2	15.476	13.773	15.426	14.89	2	84.524	86.227	84.574	85.11	5.72
3	11.488	11.645	11.071	11.40	3	88.512	88.355	88.929	88.60	7.77
4	10.169	8.698	7.253	8.71	4	89.831	91.302	92.747	91.29	10.49

Las curvas de calibración de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol se construyeron graficando los datos de las concentraciones calculadas ($C*[AN/EI]$) contra las áreas calculadas ($A*[AN/EI]$) de las diferentes diluciones de los estándares como se muestra en las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16. A partir de la regresión lineal de los datos graficados se obtuvieron las ecuaciones donde Y es el Área ($A*[AN/EI]$) y X es la concentración ($C*[AN/EI]$).

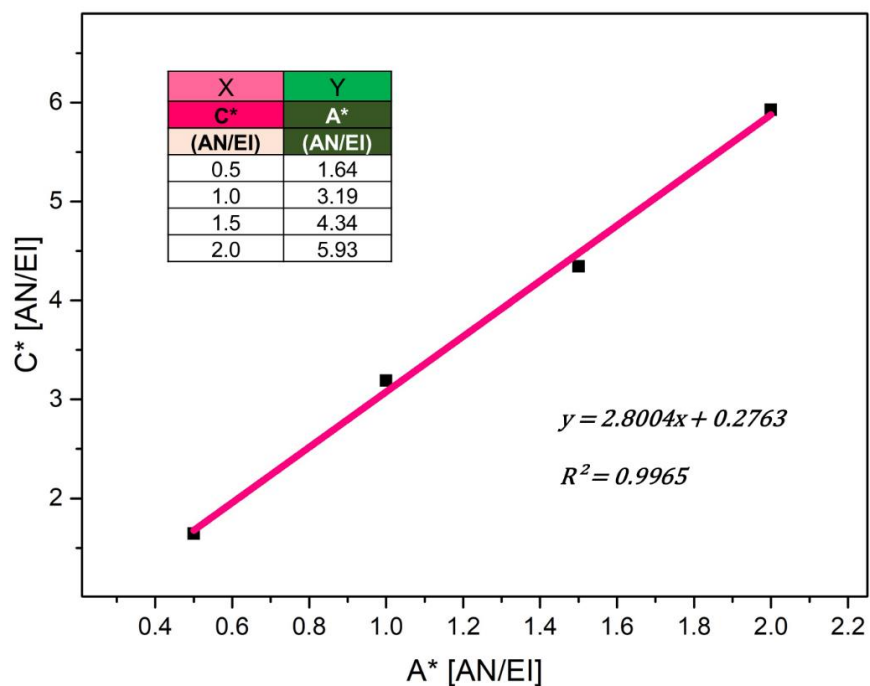


Figura 3.14 Curva de calibración de Campesterol y ecuación para su cuantificación.

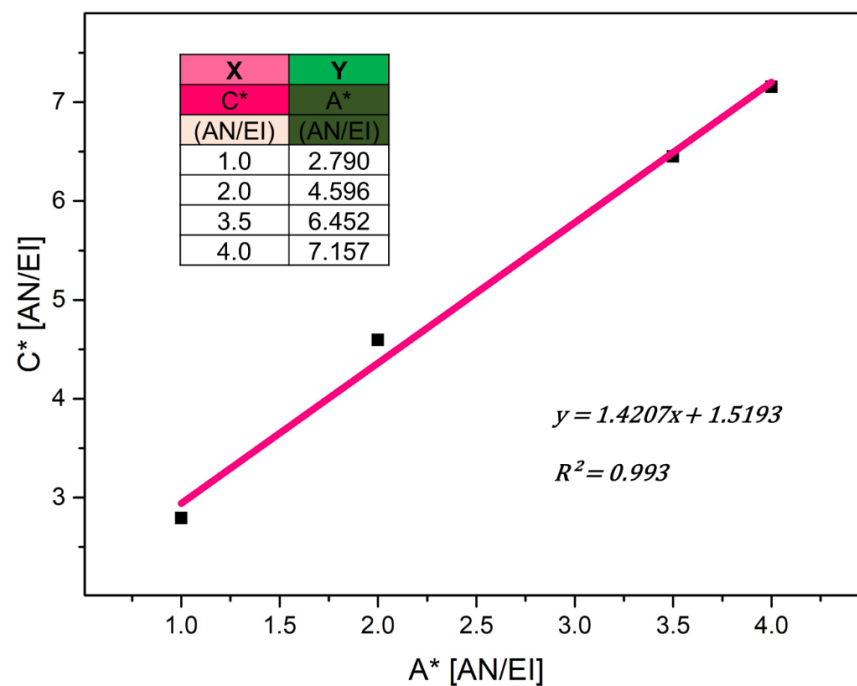


Figura 3.15 Curva de calibración de Stigmasterol y ecuación para su cuantificación.

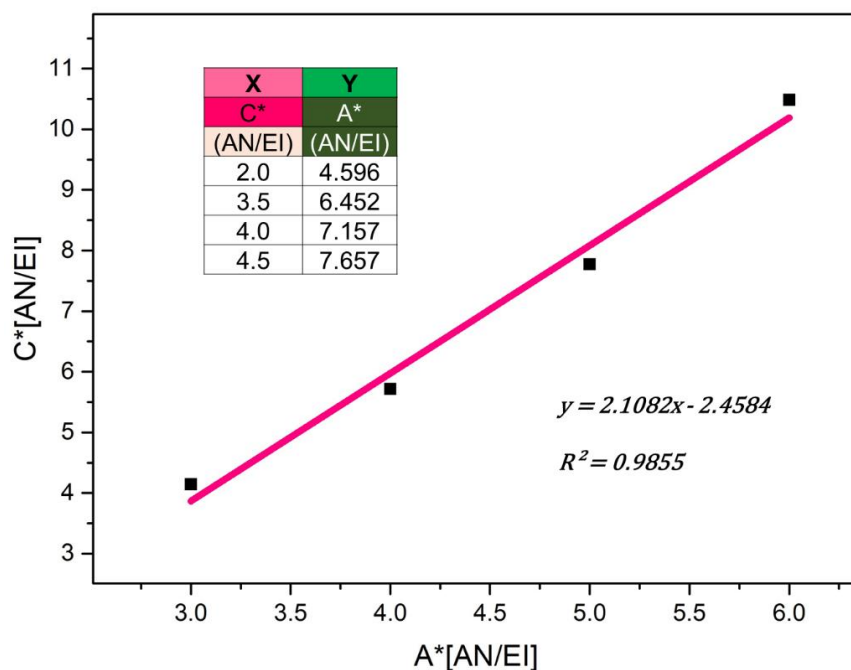


Figura 3.16 Curva de calibración de β -Sitosterol y ecuación para su cuantificación

Para calcular la concentración de los compuestos en TO2 se utilizaron las ecuaciones obtenidas con la regresión lineal, primero despejando X, después se sustituyó en la ecuación los valores de la pendiente y la intersección de cada ecuación, así como el valor de Y correspondiente a las áreas calculadas ($A^*[AN/EI]$) de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2 (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Datos de las áreas de los compuestos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol a partir de los cromatogramas de TO2 con estándar interno (Vainillina).

Dil.	Componente	Áreas			Promedio áreas	A (AN/EI)
		a	b	c		
1	Vainillina	9.179	8.619	7.698	8.50	1.00000
2	Campesterol	16.772	16.929	17.118	16.94	1.99321
3	Estigmasterol	24.406	24.631	24.904	24.65	2.90010
4	β -Sitosterol	49.821	49.644	50.279	49.91	5.87324

El valor obtenido de X (concentración calculada $C^*[AN/EI]$ se multiplicó por la concentración del estándar interno en TO2 (0.002 mg/ μ L), obteniendo la concentración de cada componente en el volumen inyectado (3 μ L) de la solución de TO2. Con este valor se calculó la concentración en miligramos y el porcentaje de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol como se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Cuantificación de los compuestos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol en TO2

Componente	a	b	Y (Área) (AN/EI)	X (Conc) (AN/EI)	Conc AN mg/ μ L	Conc AN mg	Conc AN (%)
Campesterol	2.80040	0.2763	1.9932	0.61310	0.0000490	0.0001471	11.07266177
Estigmasterol	1.42070	1.5193	2.9001	0.97192	0.0000778	0.0002333	17.55304327
β -sitosterol	2.10820	2.4584	5.8732	3.95201	0.0003162	0.0009485	71.37429496
total						0.001329	100

3.3.8 Modificación química de la mezcla TO2: β -sitosterol, estigmasterol y campesterol con actividad IHA

Se planteó modificar químicamente las estructuras de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol, reemplazando los grupos hidroxilos (-OH) en la posición 3 del esterano por un grupo acetilo mediante una reacción de acetilación. Se calculó el rendimiento de los derivados acetilados de TO2, teniendo 13.8 mg de producto final, En la Figura 3.17 se muestran estos resultados junto con el diagrama de procedimiento empleado.

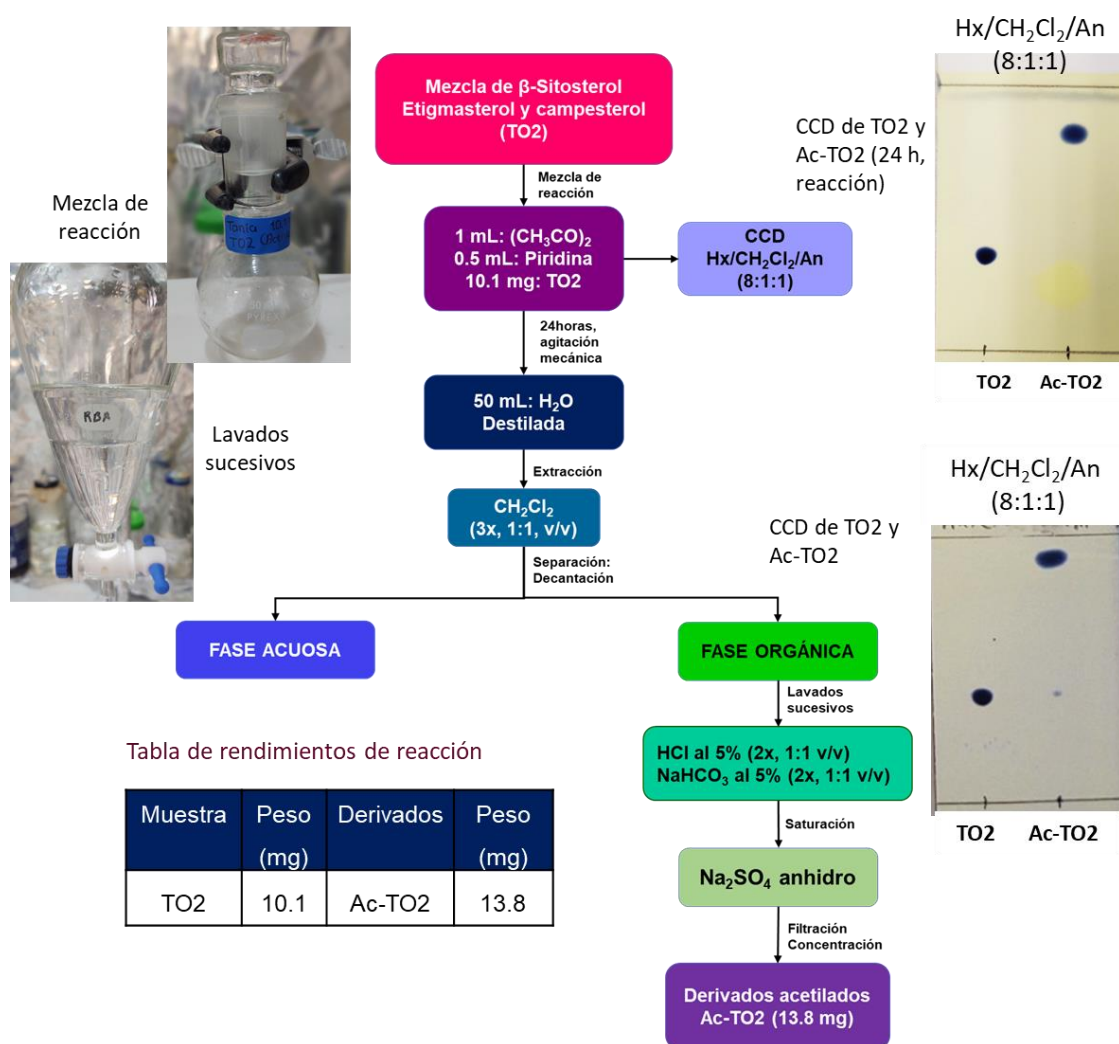


Figura 3.17 Diagrama de proceso de acetilación y Tabla de rendimiento de los derivados acetilados de β -sitosterol, Estigmasterol y Campesterol

La muestra Ac-TO2 que corresponde a la mezcla de los derivados acetilados de los triterpenos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol, también fue caracterizada por técnicas de espectroscopia y cromatografía. Primeramente, las placas de cromatografía en capa delgada (Figura 3.18) muestran el cambio de R_f el cual aumentó de 0.30 a 0.86, debido a que se reemplazó el grupo hidroxilo por un grupo acetilo lo que cambio la polaridad de las moléculas. Con GC-MS se identificaron los derivados acetilados a los tiempos de retención 21.24 min para el acetato de campesterol ($m/z=442$), 21.55 min para acetato de Estigmasta-5,22-dien-3beta-ol ($m/z=454$), y 22.207 min para el acetato de β -Sitosterol ($m/z=456$). Los resultados confirman la modificación química realizada a la mezcla de triterpenos en TO2.

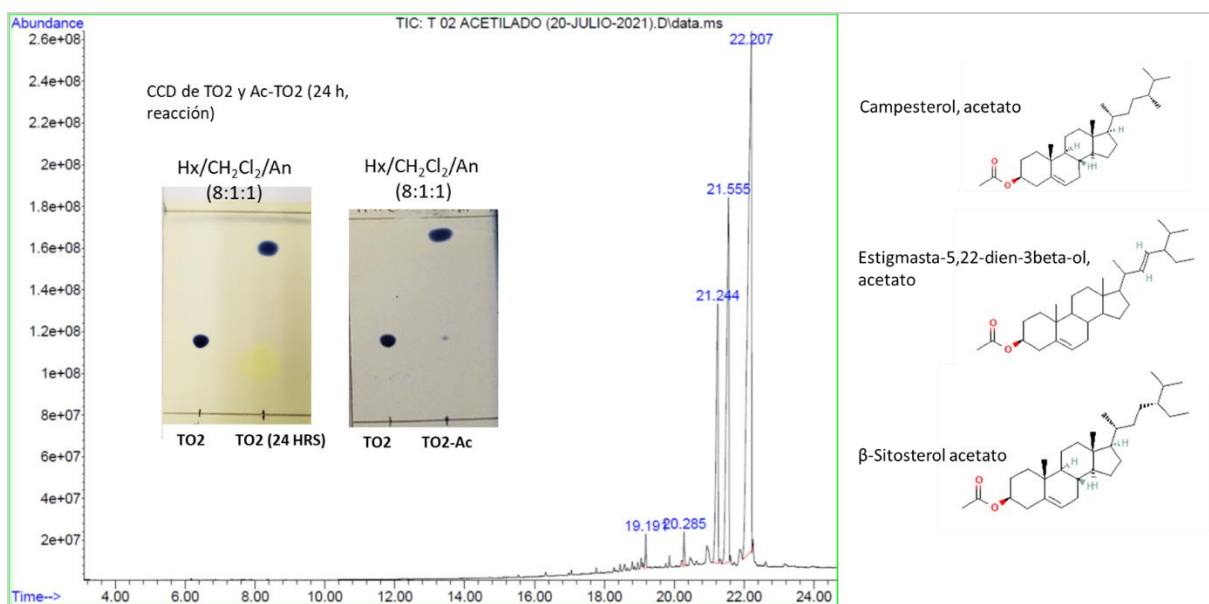


Figura 3.18 Perfil cromatográfico de Ac-TO2 obtenido mediante GC-MS

La muestra Ac-TO2 de los derivados acetilados de los triterpenos Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol fue analizada mediante FTIR-ATR. Esta caracterización que permitió confirmar el cambio estructural de la mezcla original (Figura 3.19) ya que en el espectro de infrarrojo se observa el estiramiento de la banda del carbonilo del grupo acetilo alrededor de 1730 cm^{-1} , y la vibración de tensión del enlace $-CO$ alrededor de 1250 cm^{-1} asociado de igual manera al grupo acetilo, y finalmente la ausencia de la banda del grupo hidroxilo alrededor de 3400 cm^{-1} .

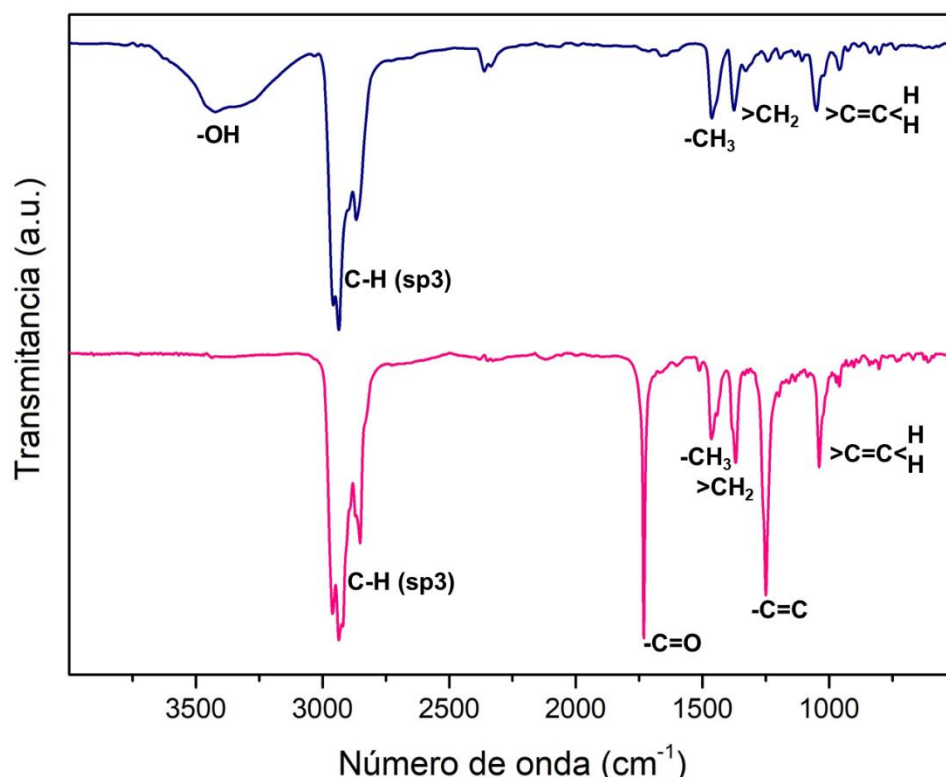


Figura 3.19 Espectro de FTIR de Ac-TO2: Derivados acetilados de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol.

La fracción TO2 fue acetilada con la intención de reemplazar el grupo -OH en la posición 3 del esterano (Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol), y de esta manera conocer el efecto de este grupo funcional sobre la proteína viral HA. En la Figura 3.20 podemos encontrar los resultados obtenidos para TO2 y los derivados acetilados Ac-TO2, dónde claramente se observa que al reemplazar el grupo -OH de la estructura original de los componentes pierden su actividad IHA. Posiblemente el grupo hidroxilo (-OH) estaría interaccionando con la proteína viral HA. Adicionalmente, se evaluaron estándares analíticos de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol, los cuáles de manera individual no mostraron inhibición de la proteína viral HA a diferencia de la mezcla de estos en TO2.

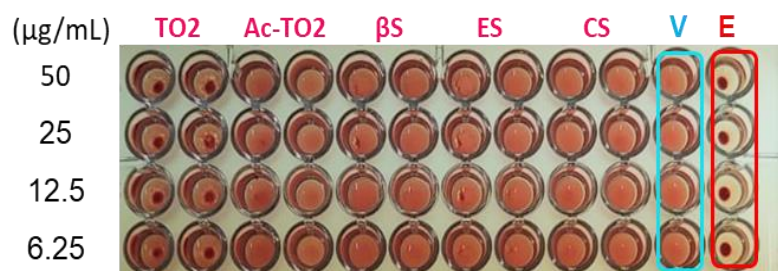


Figura 3.20 Resultados de IHA de las fracciones TO2, estándares de Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol, así como los derivados acetilados de TO2 (Ac-TO2). (V=virus+eritrocitos; E=Eritrocitos)

3.4 DISCUSIÓN

La identificación de componentes con actividad IHA en el extracto de la corteza de tallo de *E. yucatanensis* se realizó mediante diferentes técnicas analíticas. Los análisis preliminares mostraron que algunas fracciones con actividad IHA presentaban perfiles cromatográficos similares como es el caso de EY24, EY25 y EY26. Se realizaron una serie de procesos cromatográficos para su fraccionamiento hasta llegar a TO2, un polvo cristalino que a temperatura ambiente presentaba textura oleosa, al principio se planteó que podría tratarse de un compuesto puro, ya que TO2 en CCD (80:10:10 Hx/CH₂Cl₂/An) presentó una banda única con un R_f= 0.31, igualmente en HPLC-UV-Vis el cromatograma mostro un solo pico en TR=2.5 min. Sin embargo, después de analizar la muestra mediante FTIR-ATR y CG-MS se encontró que TO2 estaba compuesta por una mezcla de β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Figura 3.21). Componentes químicos del tipo fitoesteros. Es común aislarlos en forma de mezcla ya que debido a la similitud de sus estructuras no se pueden separar mediante las técnicas convencionales (Wang *et al.*, 2016).

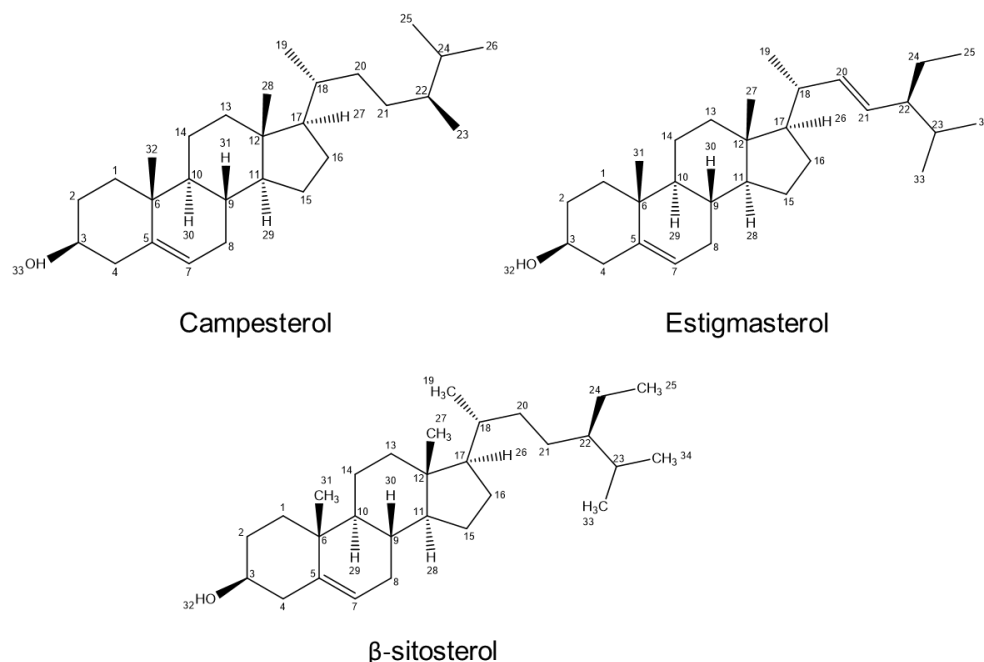


Figura 3.21 Estructura química de los componentes identificados en TO2.

En caso de las fracciones EY212 y EY211 que mostraron actividad IHA fueron fraccionadas por métodos cromatográficos, como resultado de esto en las fracciones EY212-8 y EY212-9 se identificaron mezclas de diversos esteroides (Figura 3.22) cabe destacar que en estas fracciones se volvió a identificar campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Esto indica que las fracciones con actividad IHA prometedora tienen en común la presencia de la mezcla de esteroides identificada en TO2. Por lo que se calculó la relación de concentración (%) de estos compuestos mediante cromatografía de gases con el método de estándar interno, dando como resultado un 71.37% de β -sitosterol, 17.55% de estigmasterol y 11.07% de campesterol, esta concentración podría estar directamente relacionada con la actividad IHA de los esteroides. En definitiva, en el extracto de corteza de tallo de *E. yucatanensis* los componentes mayoritarios son esteroides, a pesar de ello, la combinación de β -sitosterol, estigmasterol y campesterol podría ser la responsable de su actividad IHA.

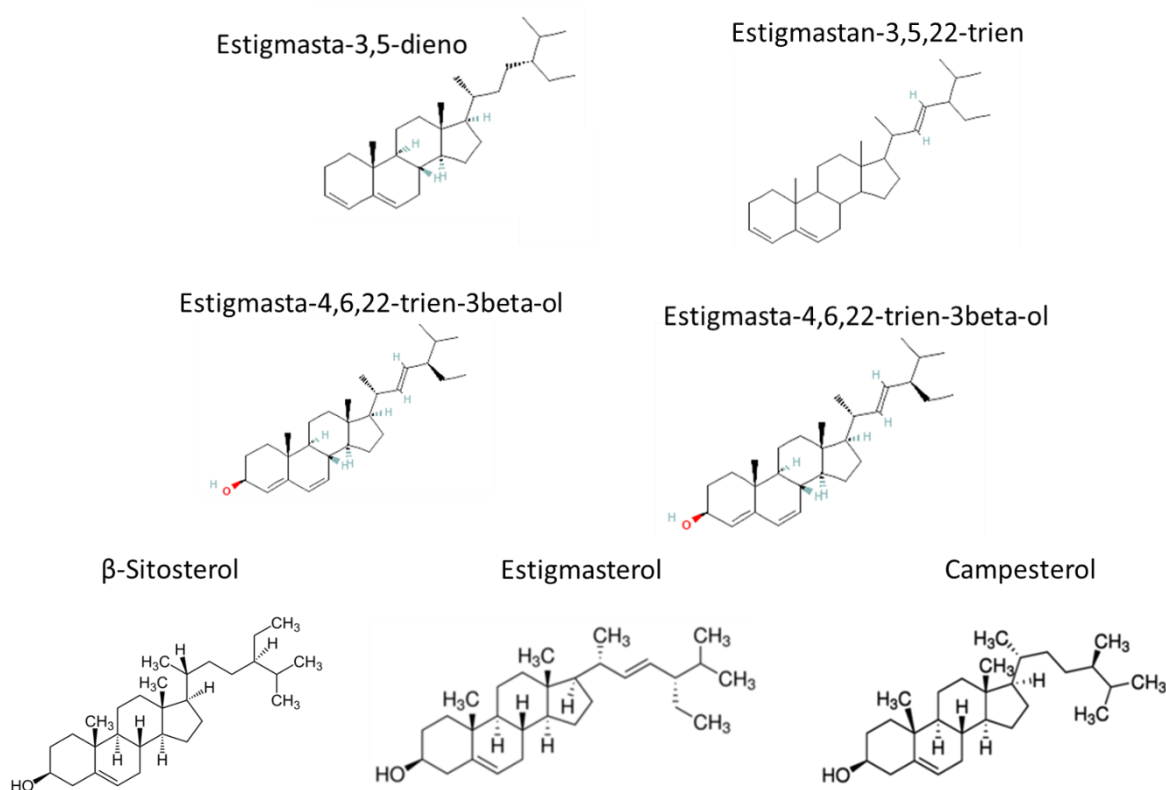


Figura 3.22 Estructura química de los componentes identificados en EY212.

La modificación química de los componentes con actividad IHA se realizó con la finalidad de conocer su posible modo de acción, por lo que, se utilizó una reacción de acetilación donde el grupo hidroxilo unido al carbono en la posición 3 del esterano fue reemplazado por un grupo acetilo (Figura 3.23). El cambio realizado modificó la actividad IHA de la mezcla de esteroides, ya que los derivados acetilados al ser evaluados con el ensayo IHA perdieron su capacidad inhibitoria, con estos resultados se cree que el grupo hidroxilo de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol sería el responsable de la interacción de estas moléculas con el sitio de unión al receptor de la proteína viral hemaglutinina (Ginex *et al.*, 2021). Se sugiere en un futuro, realizar estudios de acoplamiento molecular que permitan sugerir el modo de unión de estos compuestos al sitio activo de la HA.

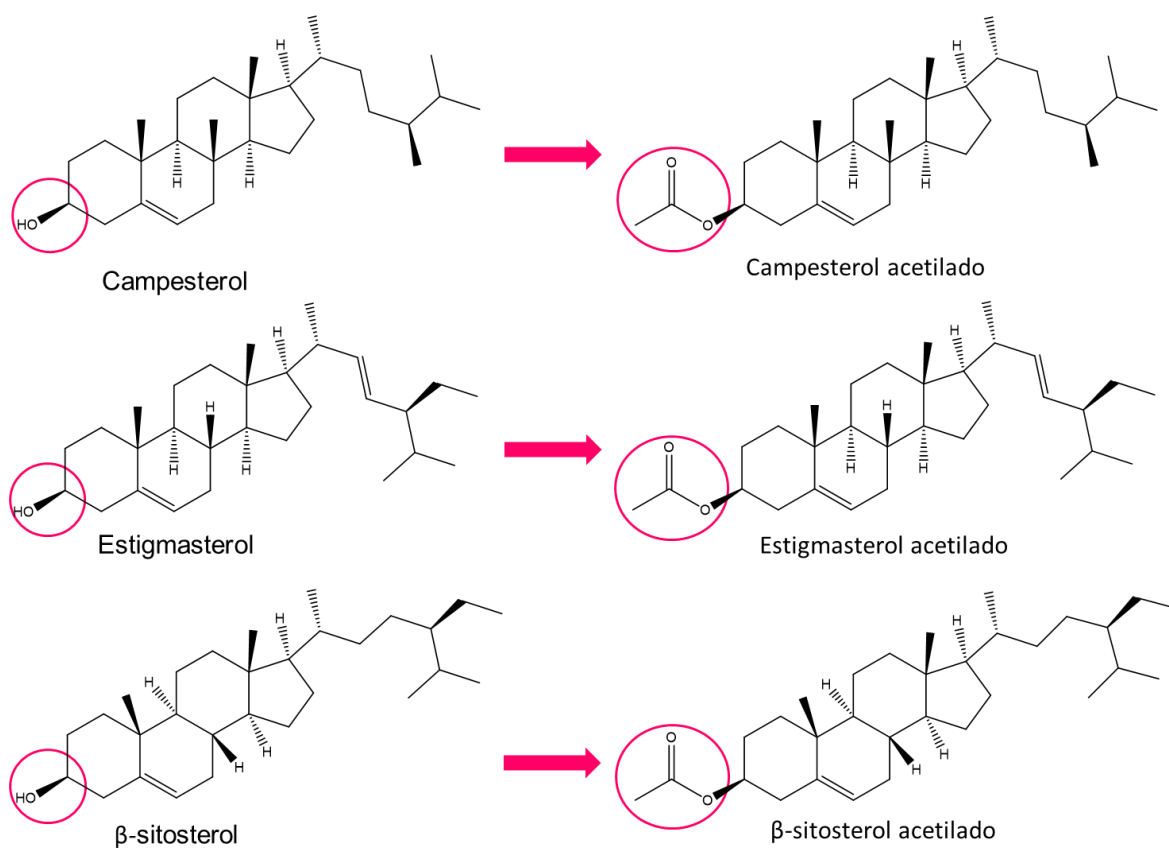


Figura 3.23 Derivados acetilados de la mezcla de esteroides Campesterol, Estigmasterol y β -Sitosterol.

4 CAPÍTULO IV

ACTIVIDAD IHA DE LA MEZCLA DE ESTEROLES Y SUS DERIVADOS ACETILADOS.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los virus de influenza A (VIA) son los únicos virus conocidos por causar pandemias, así como epidemias graves a nivel mundial (Harrington *et al.*, 2021). Los VIA poseen una envoltura viral que está formada por la membrana plasmática en la cual destacan dos proteínas la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Existen 18 subtipos de hemaglutinina y 11 subtipos de neuraminidasa diferentes (de H1 a H18 y de N1 a N11, respectivamente) (Zarubaev *et al.*, 2015b). Los VIA se encuentran en constante evolución, ya que cuando dos o más virus infectan al mismo tiempo un organismo hospedero tienen la capacidad de redistribuirse intercambiando segmentos de genes. Esta importante característica se conoce como variabilidad antigénica (Garten *et al.*, 2009). La proteína HA, es el principal antígeno del virus, contra el cual va dirigida la respuesta inmune neutralizante (anticuerpos protectores). Además, su variabilidad antigénica se traduce en la aparición de nuevas cepas contra las que no existe ningún tratamiento o vacuna, lo que la convierte en el principal factor desencadenante de las epidemias y pandemias de influenza (Girard *et al.*, 2010).

Entre los tratamientos existentes para combatir la influenza podemos encontrar los antivirales, los cuales son moléculas capaces de bloquear la ruta de replicación del virus de la influenza de distintas maneras, ya sea por inhibición del canal M2, la NA, la ARN polimerasa, la endonucleasa y la HA (Ginex *et al.*, 2021); sin embargo, en el mercado farmacéutico, como tratamientos terapéuticos; únicamente se encuentran los inhibidores del canal iónico M2, de la Neuraminidasa y la ARN polimerasa (Auladell *et al.*, 2022). Por lo anterior, es de suma importancia la constante búsqueda de moléculas bioactivas para el desarrollo de nuevos agentes antivirales.

La búsqueda de compuestos bioactivos provenientes de fuentes vegetales de manera biodirigida se basan principalmente en las proteínas virales de superficie del virus de la gripe (HA y NA) (Bai *et al.*, 2021; Hayden *et al.*, 2022). Sin embargo, una vez identificados los compuestos bioactivos, se requiere determinar las dosis adecuadas para evitar efectos tóxicos en los seres humanos (Kapoor *et al.*, 2017). Por lo tanto, es importante la

determinación de la citotoxicidad de cualquier sustancia y de este modo poder evaluar su actividad biológica. Los compuestos fitoquímicos identificados en el capítulo anterior, han mostrado potencial actividad contra el virus de influenza A en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación, por lo que se cree que estas moléculas podrían estar inhibiendo la unión del virus a la célula hospedera. En el presente capítulo primeramente se evaluó la citotoxicidad de la mezcla de esteroides y de sus derivados acetilados, y posteriormente se realizaron diferentes ensayos biológicos para determinar su actividad antiviral.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Crecimiento y mantenimiento de las células MDCK

Las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicillina, 100 µg/mL de estreptomicina (InVitrogen) y HEPES 1M. Se utilizaron matraces F75 con capacidad celular de 2×10^7 células y se incubaron a 37° C con 5% de CO₂. Para el mantenimiento de las células, el medio DMEM fue retirado por decantación y las células se lavaron dos veces con una solución salina de fosatos (PBS) estéril con pH=7.2 (GIBCO). Para el pase celular se colocaron 3 mL de Tripsina EDTA a una concentración de 1:4 en PBS. Se colocaron las células 8 min en la incubadora (37° C, 5% CO₂); las células desprendidas se colocaron en tubos cónicos de 15 mL (NEST) y se centrifugaron 5 min a 2500 RPM, luego se restituyeron con DMEM suplementado (+Ab, 10% SFB+HEPES 1M) en matraces (F75), para ser incubadas (37° C, 5% CO₂) hasta la formación de la monocapa celular, o en su defecto para la preparación de las placas que se utilizaron en los diferentes ensayos biológicos realizados (Figura 4.1).

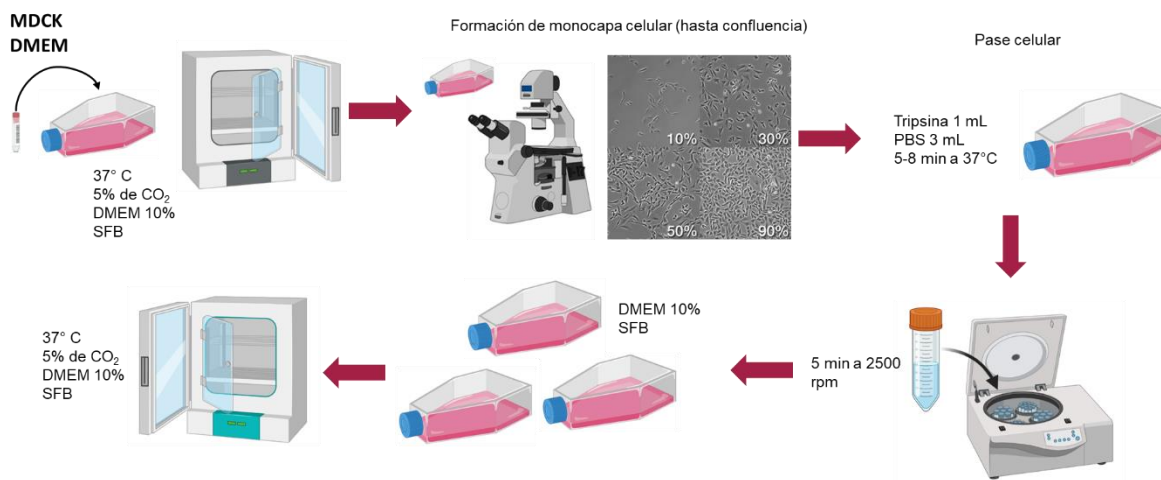


Figura 4.1 Procedimiento seguido para el crecimiento y mantenimiento de las células MDCK (Creada en Biorender.com).

4.2.2 Disolución de muestras

La preparación de la mezcla de esteroides (TO2), sus derivados acetilados (Ac-TO2) y los estándares analíticos de β -sitosterol (BS), estigmasterol (ES) y campesterol (CS), consistió en preparar un stock de cada uno, disolviéndolos en dimetilsulfóxido (DMSO) estéril (Sigma Aldrich) a una concentración de 10 mg/mL (Figura 4.2). A partir de estas soluciones se prepararon cada una de las diluciones seriadas utilizadas en los ensayos biológicos. Para obtener una menor incidencia de falsos positivos la concentración de los extractos mayor a evaluar debe ser entre 100-150 μ g/mL.

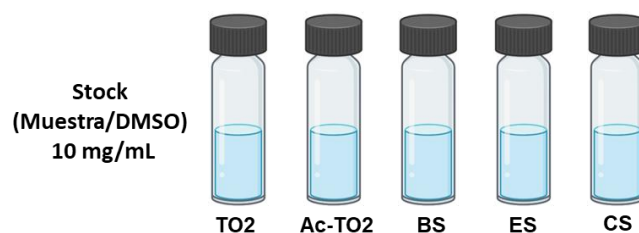


Figura 4.2 Preparación de Stock (10 mg/mL) de la mezcla de esteroides (TO2), sus derivados acetilados (Ac-TO2), β -sitosterol (BS), estigmasterol (ES) y campesterol (CS). (Creada en Biorender.com).

4.2.3 Ensayo de citotoxicidad

Se sembraron células MDCK en placas de 96 pozos con una densidad celular de 1×10^5 células/pozo en medio DMEM suplementado, y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas. Al día siguiente se retiraron los inóculos y se lavaron las células dos veces con PBS y se agregaron a cada pozo 100 μ L de las muestras (TO2, Ac-TO2, BS, ES, CS) a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.56 μ g/mL, los cuales se agregaron por cuadruplicado; así mismo para cada fracción se incluyó un control de células que solo contenía medio DMEM, así como un control de DMSO. Posteriormente, se incubaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente por 72 horas. Después del tiempo de incubación, se retiró los inóculos y se lavó con PBS. Seguidamente, se adicionó 50 μ L de cristal violeta al 0.4 % con metanol y se dejó por 30 minutos. Se lavó las placas con agua y se dejaron secar. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (Figura 4.3).

La viabilidad celular [%Viabilidad= (DOCélulas tratadas / DOControl celular) x 100], se determinó mediante la comparación de la densidad óptica de las células en presencia de las diferentes concentraciones de las fracciones y del control celular, el cual se tomó como el 100% de las células viables. La concentración que permite el crecimiento del 50% de células (CC₅₀) se determinó graficando la concentración del extracto (µg/mL) contra el porcentaje de viabilidad y obteniéndolo por análisis de regresión. Así mismo, se obtuvo la máxima concentración no citotóxica (MCNC), el cual se define como la concentración máxima de la muestra que no ejerce efecto citotóxico y resulta en más del 90% de las células viables. Una vez que se obtuvieron los valores de CC₅₀ para cada una de las fracciones, se procedió a realizar el ensayo de reducción del efecto citopático.



Figura 4.3 Metodología empleada en el ensayo de citotoxicidad. (Creada en Biorender.com).

4.2.4 Propagación del virus AH1N1 en células MDCK

El virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) a emplear fue proporcionado por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, siendo la cepa A/Yucatán/2370/09 susceptible a oseltamivir. La propagación viral en las células MDCK se realizó en un matraz F75 a una densidad celular de 2×10⁷. Primeramente, se retiraron los inóculos y se lavó la monocapa celular tres veces con PBS. Luego se preparó un inóculo de virus con DMEM para infectar un matraz F75 a una concentración de 1:15, se agregaron 3 mL de inóculo de virus al matraz con las células MDCK y se incubó el virus durante 60 min a 37°C con 5% de CO₂, agitando el matraz de adelante hacia atrás y de lado a lado cada 15 min. Se retiró el inóculo de virus y se

agregaron 12 mL de DMEM suplementado con tripsina tratada con TPCK a una concentración de 1 µg/mL. Inmediatamente después se incubó el matraz F75 infectado con el virus de la influenza durante 72 h (37°C, 5% CO₂). Diariamente se verificó el efecto citopático bajo un microscopio óptico (Nikon ECLIPSE modelo TE2000-U). Se cosechó el sobrenadante que contenía el virus de influenza cuando aproximadamente el 90 % de las células se encontraban desprendidas del fondo del matraz (generalmente 72 horas después de la infección), el sobrenadante fue transferido a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares. Finalmente se prepararon alícuotas del sobrenadante recolectado y se almacenaron a -70°C para determinar el título del lote de virus generado (Figura 4.4).

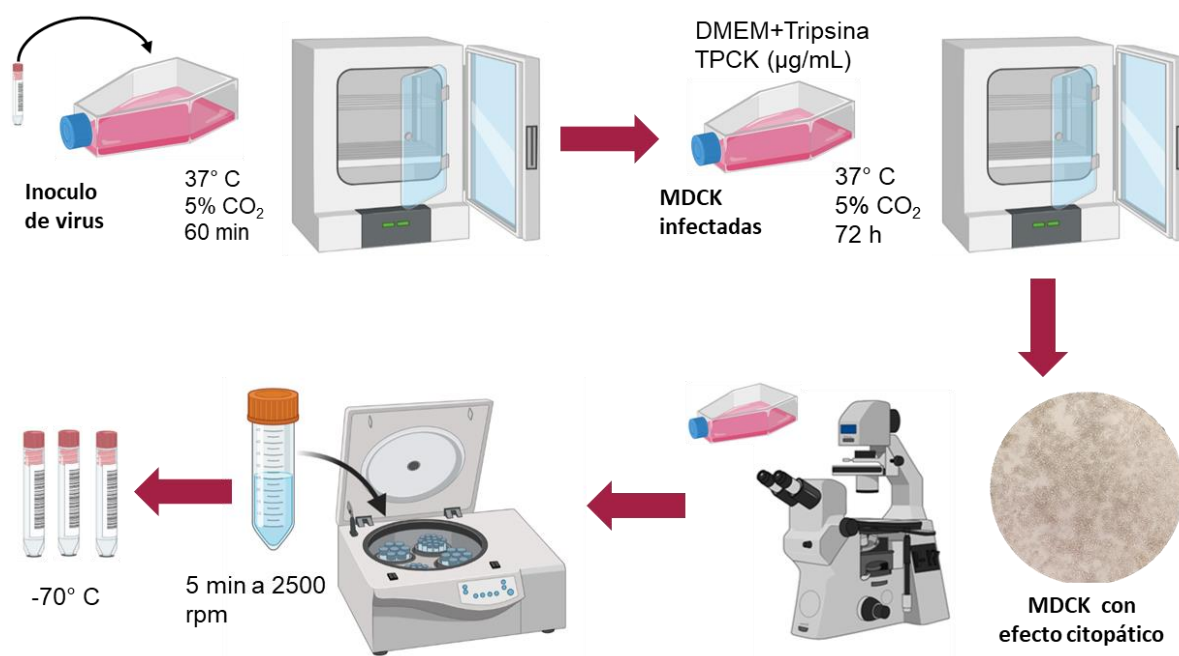


Figura 4.4 Propagación de virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) en células MDCK. (Creada en Biorender.com).

4.2.5 Determinación del título viral de la cepa A/Yucatán/2370/09 (H1N1)

4.2.5.1 Dosis infectiva de cultivo de tejidos al 50 % (TCID₅₀)

Para cada titulación de virus, se sembraron células MDCK en placas de 96 pozos con una densidad celular de 1×10^5 células/pozo y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas. Se preparó una dilución 1:10 del virus mezclando 0.15 mL de virus y 1.35 mL de medio DMEM (1:10) y en una placa de 96 pozos con fondo U se prepararon las diluciones a utilizar. En la columna 1 (A-H) se colocaron 180 µL de la dilución de virus 1:10, en los pozos de las columnas 2-12 (A-H) se colocaron 120 µL de medio DMEM. Con ayuda de una pipeta multicanal se pasaron 60 µL de los pozos de la columna 1 a la 2 y se homogenizó la dilución pipeteando cuidadosamente de arriba hacia abajo 15 a 20 veces, este paso se repitió hasta llegar a la columna once, con la finalidad de realizar diluciones triples seriadas. Las puntas de la pipeta se desecharon entre cada dilución para evitar transferir el virus que queda en las puntas. La fila 12 se dejó únicamente con medio DMEM, para utilizarse como control negativo. Las células MDCK de la placa previamente sembrada se lavaron 2 veces con PBS y con ayuda de la pipeta multicanal se colocaron las diluciones triples seriadas que se prepararon anteriormente, después se incubaron las células a 37°C con 5 % de CO₂ durante 60 min. Una vez transcurrido el tiempo de infección de 60 min se retiraron los inóculos y se agregó a cada pozo de medio DMEM suplementado con tripsina TPCK a una concentración de 1 µg/mL y nuevamente se incubaron las células a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 72 horas. Después del tiempo de incubación se retiró el medio de infección y se lavaron las células dos veces con PBS, se realizó la tinción celular agregando 50 µL de cristal violeta 0.4% en metanol durante 30 min. Las unidades de TCID₅₀ se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 3} \quad \text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL}) = x_0 - \frac{d}{2} + \frac{d \cdot x_i}{n} + v$$

Donde, x_0 es el logaritmo decimal del factor de dilución inicial, d es el logaritmo decimal del factor de dilución en serie, x_i es el puntaje de eventos positivos, n es el número de repeticiones y v es el logaritmo decimal del volumen de inoculación recíproco en mL.

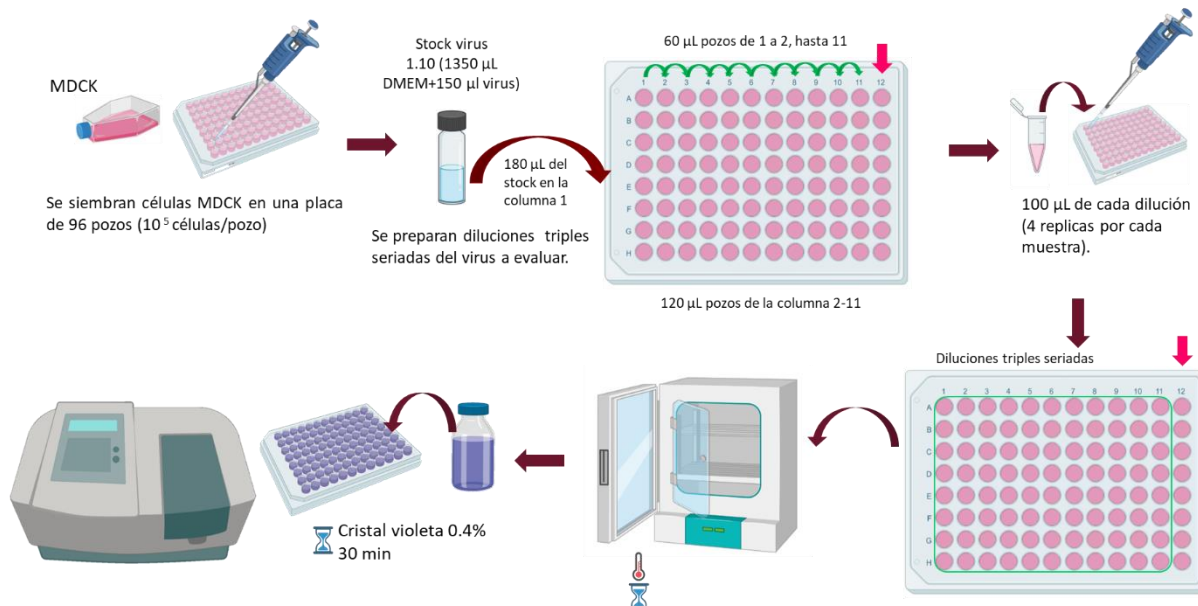


Figura 4.5 Metodología para el ensayo de dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) (Creada en Biorender.com).

4.2.5.2 Ensayo en placa (PFU/mL)

En una placa de 6 pozos se sembraron células MDCK a una densidad celular de 2.5×10^6 células/pozo por 24 horas. Se descongeló el stock de virus y se prepararon diluciones seriadas en base diez en medio DMEM a partir de 10^{-1} hasta 10^{-6} . Se lavaron las células MDCK dos veces con PBS y se inocularon las células MDCK 200 µL de cada dilución de virus. Después se incubaron las placas durante 60 min a 37 °C con 5 % de CO₂. Agitando la placa cada 10 min. Se prepararon 50 mL de medio Overlay, suficiente para varias placas de 6 pozos, se disolvieron 7.1 mL de medio MEM 10%, 1.4 mL BSA 7.5%, 0.71 mL de antibiótico 10x, 0.71 mL de glutamina 100x, 0.31 mL de Dextrán 1%, 0.71 mL de HEPES 1M, 1.4 mL de NaHCO₃ 7.5% y 37.5 mL de agua inyectable. Posteriormente, se retiró el inóculo de virus y en un tubo cónico de 15 mL se agregaron 8.75 mL del medio Overlay, 60 µL (1 µg/mL) de tripsina TPCK y 3 mL de Agar 3%, previamente calentado para su disolución. Se agregaron 2 mL de la capa de agar con medio Overlay a cada pozo. Una vez solidificada la capa de agar se colocó la placa boca abajo en la incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂. La formación de placa se puede observar a simple vista después de 72h de infección. Una vez formadas las placas (círculos vacíos) se retiró el tapón de agar con una espátula de laboratorio y cada pocillo fue teñido con 1 mL de solución de cristal violeta 0.4% en metanol durante 30 min a temperatura ambiente, para finalizar se

retiró la solución de cristal violeta y se enjuagaron los pozos con agua y se dejaron secar las placas temperatura ambiente (Figura 4.6). Para determinar el título viral de la muestra en PFU/mL, se contaron las placas en el pozo con número de placa superior a diez. La fórmula utilizada fue $\text{PFU/mL} = \text{número de placas por pocillo} \times \text{factor de dilución del pocillo respectivo} \times \text{recíproco del volumen inoculado en mL}$.

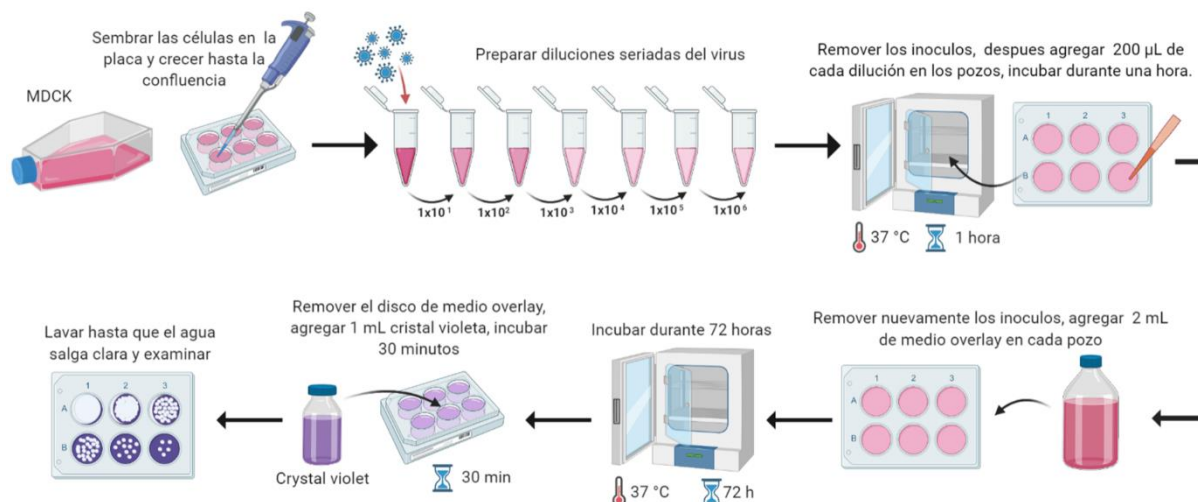


Figura 4.6 Proceso empleado para realizar ensayos en placa. (Creada en Biorender.com).

4.2.6 Ensayo de reducción de efecto citopático (co-tratamiento)

Este ensayo se realizó para evaluar si las fracciones y particiones previenen la habilidad del virus de unirse a los receptores de la superficie celular, al inhibir los receptores virales (Figura 4.7). Se sembraron células MDCK en placas de 96 pozos con medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 10% y se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO_2 , hasta confluencia por un periodo de 24 horas. Las concentraciones de las fracciones se mezclaron con el virus y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se removi6 el medio DMEM de las células y se lavaron dos veces con PBS, se agregó 100 µL de la mezcla virus-fracción por cuadruplicado y se incubaron por 1 hora a 37°C con 5 % de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se removi6 el in6culo y se a6adi6 el medio DMEM con tripsina TPCK (1 µg/mL). Se incub6 en presencia de 5% de CO_2 durante 72 horas (Figura 4.7). Finalmente, las placas fueron te6idas y se analizaron en un lector de placas a 490 nm para determinar su densidad 6ptica y as6

poder calcular el porcentaje de viabilidad celular $[(CT-CV) / (CC-CV)] \times 100$. Ajustando los datos a través de una regresión logarítmica se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50}), definida como la concentración que inhibe 50% de la tasa de infección celular.

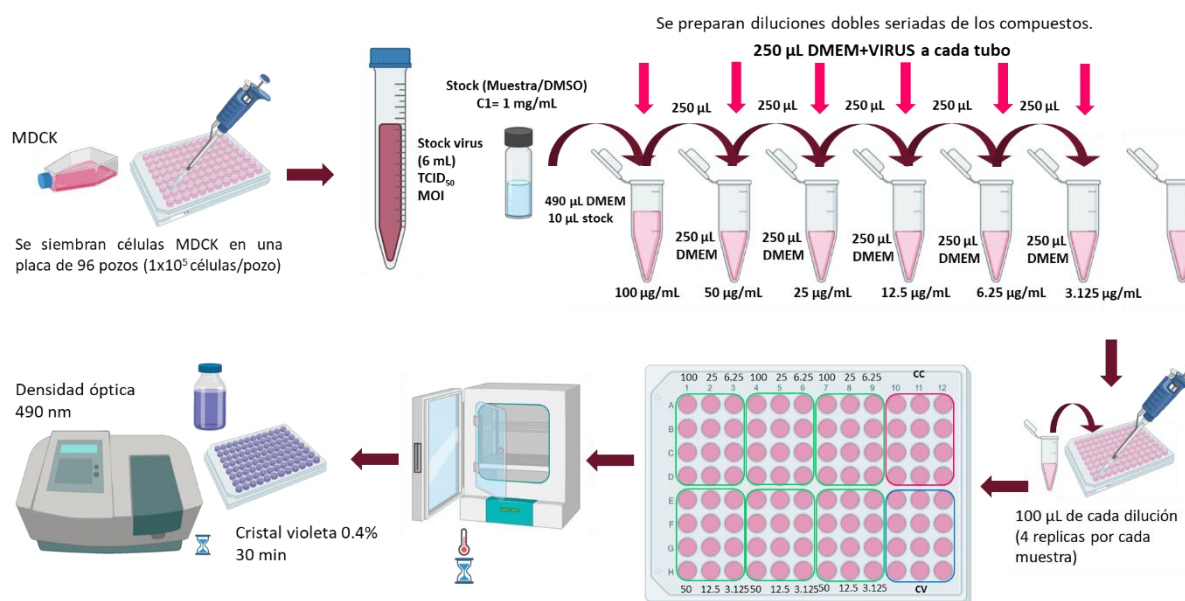


Figura 4.7 Metodología del ensayo de reducción de efecto citopático a nivel de co-tratamiento. (Creada en Biorender.com).

4.2.7 Ensayo de inhibición de la actividad de unión de la HA a las células MDCK

Las células MDCK se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^5 células/pozo en medio DMEM suplementado y se incubaron a 37°C con CO_2 al 5% por 24 horas. Como control positivo para la inhibición de unión de la HA con el receptor de ácido siálico se empleó el glicosacárido sintético 6'SLN (6-sialil-(N-acetilactosamina) (Ayora-Talavera *et al.*, 2014), además se utilizó la cepa A/Yucatán/2370/09 (H1N1) del virus de influenza. Se prepararon mezclas virus-6'SLN a 500 µM y de virus-compuestos utilizando la concentración a la que inhibieron más del 90% de la tasa de infección celular. Las células fueron infectadas con las mezclas respectivas de virus-compuestos y virus-6'SLN cada 10 min durante 1 hora, una vez transcurrido este tiempo se retiraron los inóculos y se agregó DMEM suplementado con tripsina TPCK (1µg/mL). Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C con 5% de CO_2 , una vez transcurrido el tiempo de incubación los inóculos fueron retirados y se almacenaron a -70°C , posteriormente se determinó la inhibición de unión de la HA en función de la reducción de títulos virales mediante ensayos IHA y ensayos en placa (Figura 4.8).

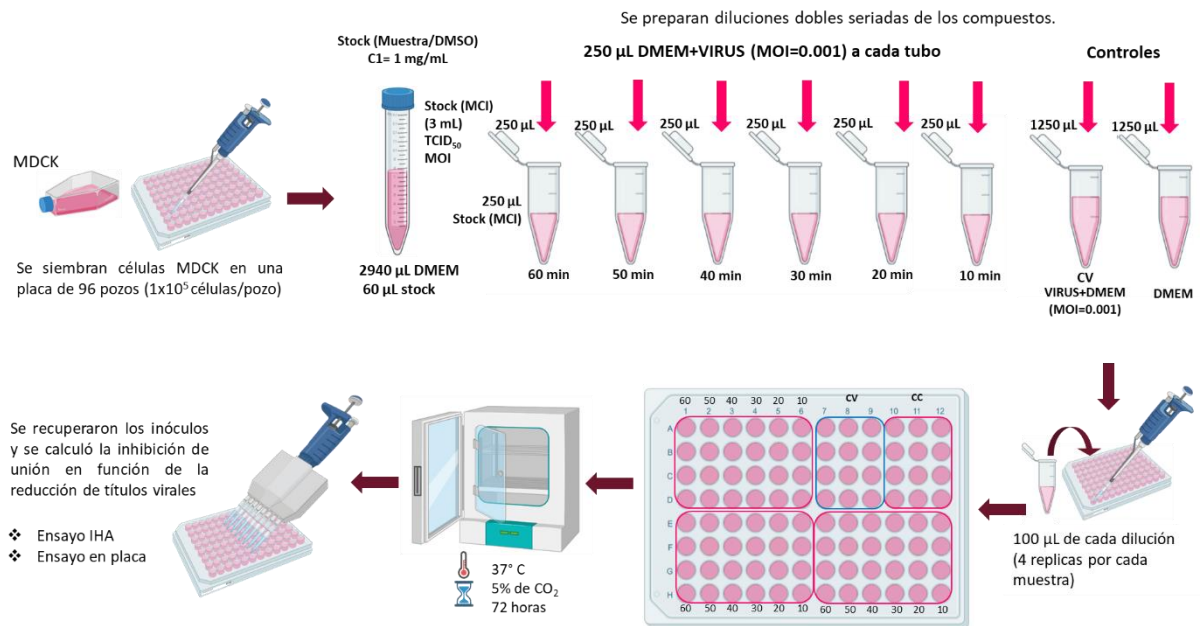


Figura 4.8 Metodología llevada a cabo para el ensayo de inhibición de unión de la HA a las células MDCK. (Creada en Biorender.com).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Citotoxicidad de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados

Los resultados de citotoxicidad mostraron que tanto la mezcla TO2 como sus derivados acetilados Ac-TO2 no presentan citotoxicidad. En la Figura 4.9 se puede observar que los esteroides de manera individual tienen una curva muy similar a la de la mezcla TO2 (BS, ES, CS). También se puede observar que en todas las concentraciones evaluadas el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo entre 80 y 95%, por otro lado, los derivados acetilados Ac-TO2 mostraron un incremento de citotoxicidad manteniendo la viabilidad celular entre 70 y 85%.

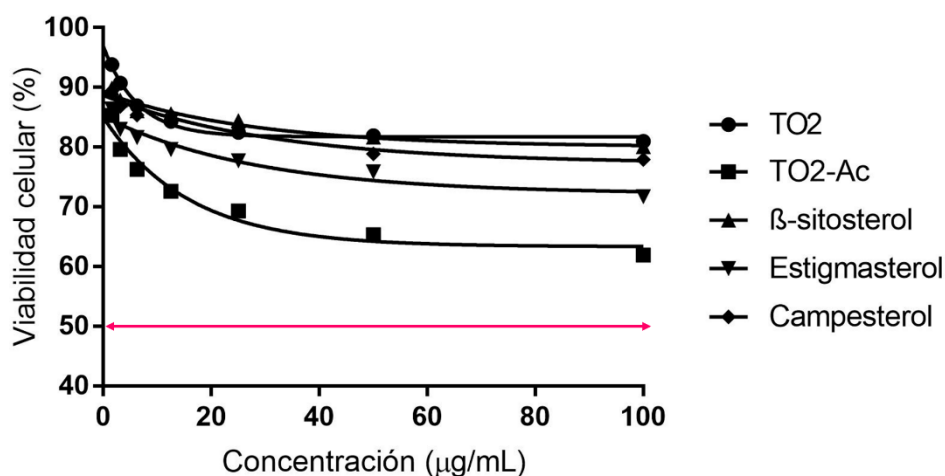


Figura 4.9 Efecto citotóxico de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados

A partir de los resultados de porcentaje de viabilidad celular se calcularon los valores de concentración citotóxica media (CC_{50}) de cada muestra mediante regresión lineal. En la Tabla 4.1 se reportan cada uno de los valores obtenidos de las diferentes muestras analizadas. El β -sitosterol resultó ser el componente menos citotóxico, mientras que el estigmasterol fue el más citotóxico de los tres esteroides identificados en la mezcla TO2. Además, se determinó que los derivados acetilados de los esteroides aumentaron su citotoxicidad notablemente, a pesar de ello la CC_{50} de estos se encuentra por encima de la máxima concentración evaluada.

Tabla 4.1 Concentración citotóxica media de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados.

Muestra	CC ₅₀ (μg/mL)	MCNC (μg/mL)
TO2	438.38	3.125
TO2-Ac	147.03	<1.563
βS	750.82	<1.563
ES	163.91	<1.563
CS	696.46	<1.563

CC₅₀: Concentración citotóxica media
MCNC: Máxima concentración no citotóxica

4.3.2 Título viral de la cepa A/Yucatán/2370/09 (H1N1)

El ensayo en placa se basa en la capacidad del virus de la gripe para formar placas líticas bien definidas en la monocapa de células. Las placas se forman debido al efecto citopático causado por el virus, lo que provoca la muerte de las células infectadas, la superposición del agar en la monocapa hace posible la formación de las placas, limitando las infecciones posteriores a las células que fueron infectadas originalmente. Estas placas se observan a simple vista como círculos vacíos en la monocapa cuando esta es teñida con cristal violeta. La formación de placas líticas es provocada por virus totalmente infecciosos, y se denominan unidades formadoras de placa (PFU). El ensayo en placa es una medida cuantitativa del número de partículas infecciosas en una muestra determinada. En la Figura 4.10 se puede observar el ensayo en placa para calcular el título del virus A/Yucatán/2370 que se utilizará en el ensayo de reducción de efecto citopático. Se calculó el número de placas en la dilución 1×10^{-7} el cual fue 24 PFU, con la siguiente fórmula se calculó el número de PFU/mL:

$$PFU/mL = \text{Número placas} \times \text{Factor dil.} \times \text{Recíproco del volumen}$$

$$PFU/mL = 24 \times 10^7 \times 2.5$$

$$PFU/mL = 6 \times 10^8 \text{ PFU}$$

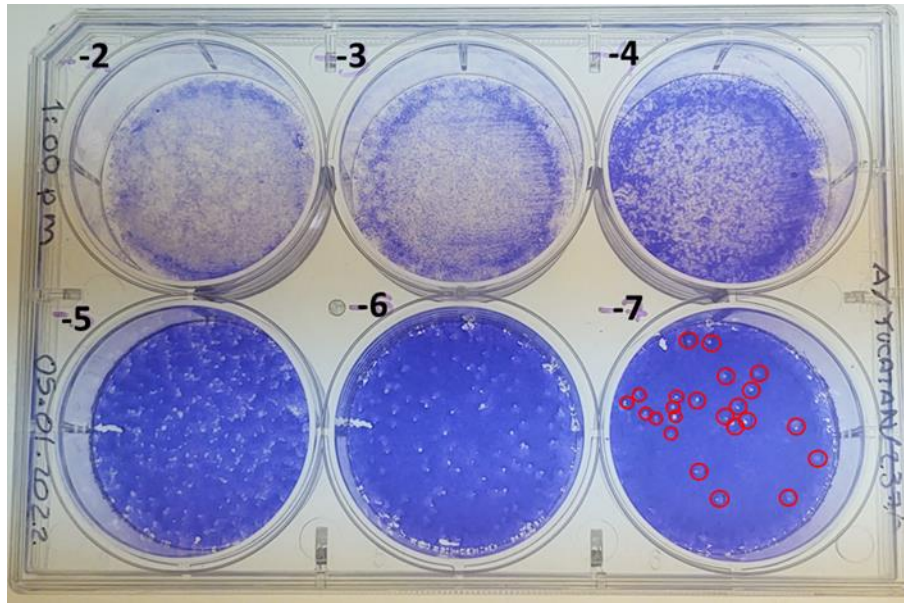


Figura 4.10 Ensayo de placa en células MDCK, placa de 6 pozos fijada y teñida. Las placas líticas aparecen como áreas circulares claras en la monocapa celular teñida con cristal violeta. Los números sobre los pocillos indican la dilución de la muestra de virus titulada

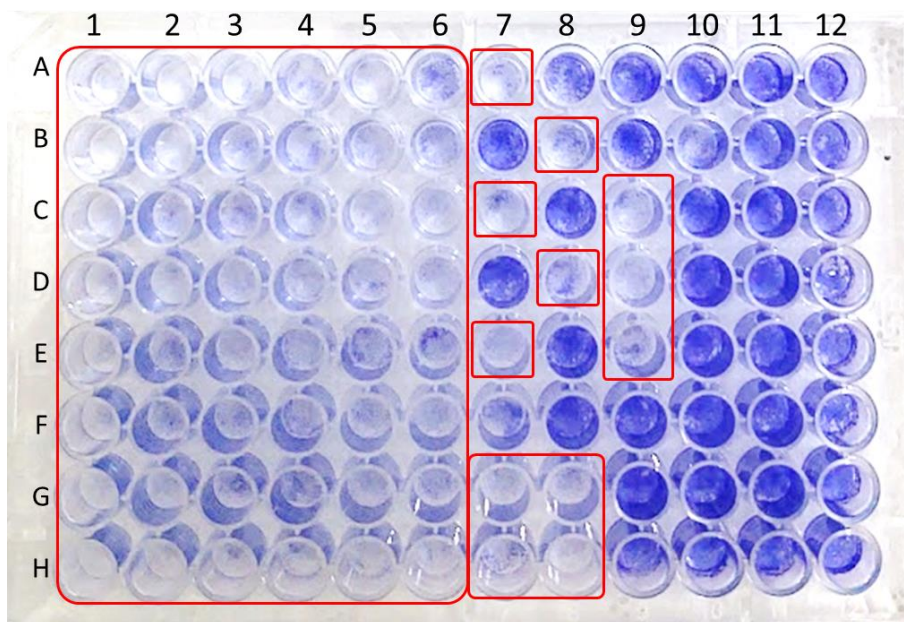


Figura 4.11 Ensayo TCID50 en células MDCK, placa de 96 pozos fijada y teñida. Los pozos vacíos indican efecto citopático completo, los pozos con solo algunas partes de la monocapa desprendida indican efecto citopático incompleto, en cambio los pozos con color violeta indican que no hay efecto citopático.

El ensayo TCID₅₀ permite una determinación de la cantidad de virus infeccioso en un volumen de muestra dado. TCID₅₀ se refiere a la cantidad de muestra necesaria para que el virus cause una infección productiva en el 50% de los cultivos de tejidos o cultivos celulares inoculados. En la mayoría de los casos, la infección productiva por el virus de la influenza se ve directamente por la aparición de efecto citopático, es decir, muerte celular en cultivos infectados. La replicación adecuada del virus depende de las diluciones en serie, el control celular y el control viral. Finalmente, la aplicación de matemáticas simples permite calcular la cantidad de partículas de virus infecciosos presentes en la muestra de interés. El cálculo de TCID₅₀ se realizó con el método de Reed y Muench modificado basado en el trabajo de Spearman y Karber utilizando la siguiente fórmula (Figura 4.11):

$$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL}) = x_0 - \frac{d}{2} + \frac{d * x_i}{n} + v$$

$$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL}) = \text{log}_{10}(10) - \frac{\text{log}_{10}(3)}{2} + \frac{\text{log}_{10}(3) * 65}{8} + \text{log}_{10}\left(\frac{1}{0.1}\right)$$

$$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL}) = 1 - 0.2385 + 3.8766 + 1$$

$$\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL}) = 5.638$$

$$\text{TCID}_{50}/\text{mL} = 10^{5.638}$$

$$\text{TCID}_{50}/\text{mL} = 4.35 \times 10^5$$

El título viral de la muestra de virus evaluada fue de 4.35×10^5 TCID₅₀/mL, con este dato se podrá calcular la cantidad de virus a emplear para el ensayo de reducción de efecto citopático.

4.3.3 Reducción del efecto citopático del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) mediante co-tratamiento con componentes con actividad IHA.

El efecto citopático es un conjunto de cambios morfológicos en las células provocado por la infección de algún tipo de virus. Estos cambios generalmente producen la muerte de las células infectadas. Para evaluar la actividad IHA de los componentes identificados en *E. yucatanensis* se realizó el ensayo de reducción de efecto citopático. Con la finalidad de determinar si los compuestos eran capaces de inhibir la entrada del virus a la célula, realizando un proceso de co-tratamiento entre la cepa de virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) con los compuestos identificados y sus derivados. Para este ensayo se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01. En la Figura 4.12 se puede observar el porcentaje de viabilidad celular de acuerdo con la concentración de TO2 y TO2-Ac, donde a una concentración de 100 µg/mL de TO2 en co-tratamiento con el virus logra mantener más del 90% de viabilidad celular. En el caso de Ac-TO2, a pesar de que a 100 µg/mL se observa un 90% de viabilidad celular a menores concentraciones la viabilidad celular se reduce considerablemente.

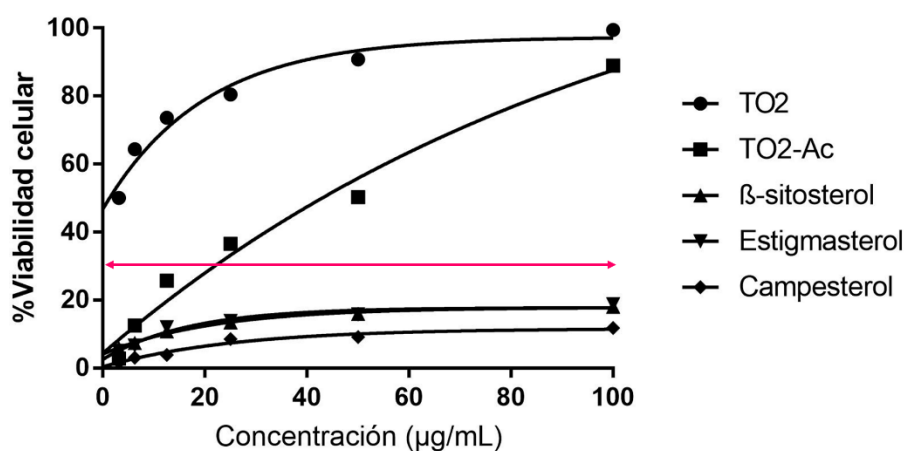


Figura 4.12 Ensayo de reducción de efecto citopático a nivel de co-tratamiento de TO2 (campesterol, estigmasterol y β-bitosterol) y TO2-Ac (derivados acetilados de campesterol, estigmasterol y β-bitosterol) en células MDCK, MOI=0.01.

A partir de los resultados de viabilidad celular, se calcularon los valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) mediante una regresión lineal, el valor del índice de selectividad es un indicador de la eficacia de los componentes evaluados, componentes con valores a partir de 10 se consideran efectivos. En la Tabla 4.2 se reportan cada uno de los valores obtenidos, donde TO2 mostró una CI_{50} =3.125 μ g/mL, mientras que Ac-to2 mostro una CI_{50} =50 μ g/mL (16 veces mayor). Como era de esperarse los esteroides identificados en TO2 de manera individual no mostraron actividad inhibitoria. De acuerdo con los índices de selectividad TO2 hasta ahora ha presentado los resultados más prometedores en cuanto a actividad IHA.

Tabla 4.2 Concentración inhibitoria media (CC_{50}) de la mezcla de esteroides y sus derivados acetilados.

Muestra	CC_{50}	CI_{50}	IS
	(μ g/mL)	(μ g/mL)	(CC_{50}/CI_{50})
TO2	196.36	3.125	62.84
TO2-Ac	147.03	50	2.94
β S	>100	>100	<1
ES	>100	>100	<1
CS	>100	>100	<1

CC_{50} =Concentración citotóxica media

CI_{50} =Concentración inhibitoria media

IS=Índice de selectividad

4.3.4 Efecto del tiempo de co-tratamiento del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) en la actividad de unión de la HA viral.

El ensayo de inhibición de la actividad de unión de la HA permitió dilucidar un posible modo de acción de los componentes con actividad IHA. Con el proceso de co-tratamiento entre el virus y los compuestos (esteroides y sus derivados) a diferentes tiempos se determinó el porcentaje de reducción de PFU/mL, considerando que cuando el virus ingresa a la célula y completa su ciclo de replicación para después infectar las células a su alrededor formando colonias, por lo tanto, los compuestos al bloquear la entrada del virus a la célula no habría proceso de replicación viral y por consiguiente se reducirían las unidades formadoras de placas.

En la Tabla 4.3 se presentan los porcentajes de reducción de PFU/mL de cada muestra evaluada. La diferencia de porcentajes respecto al tiempo en el co-tratamiento con TO2 es mínima diferencia, este resultado es muy similar al del control positivo 6'SLN. Contrariamente con los derivados Ac-TO2 si hay una diferencia respecto al tiempo de co-tratamiento. Cabe resaltar que en este ensayo se utilizó la concentración a la que los componentes inhibieron más del 90% de la tasa de infección celular, por lo tanto, las diferencias en el tiempo de co-tratamiento se deben a la capacidad intrínseca de los componentes de bloquear la actividad de unión de la HA a las células.

Tabla 4.3 Porcentaje de reducción de PFU/mL de la mezcla de esteroides TO2 y sus derivados Ac-TO2

Tiempo (min)	Reducción de PFU/mL (%)		
	TO2	Ac-TO2	6'SLN
10	94.00	57.71	96.86
20	94.95	71.43	98.00
30	97.52	80.95	98.29
40	98.29	90.48	98.57
50	98.57	91.43	99.05
60	99.05	94.29	99.24
CV	0.00		
CC	100.00		

4.4 DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos a partir de los ensayos biológicos la mezcla de esteroides TO2 compuesta por campesterol, estigmasterol y β -sitosterol y sus derivados AC-TO2 mostraron información muy importante que ayudó a comprender mejor su actividad biológica contra el virus de influenza. Primeramente, en los ensayos de citotoxicidad se determinó que la concentración citotóxica media (CC_{50}) tanto de la mezcla de esteroides TO2 como de sus derivados AC-TO2 estaba por encima de la máxima concentración medida (100 $\mu\text{g/mL}$) ya que la viabilidad celular en todas las concentraciones evaluadas osciló entre 80 y 90%. Sin embargo, la acetilación de los esteroides produjo una disminución en su valor de CC_{50} , lo que se traduce en un aumento de citotoxicidad, que si bien este no afectó gravemente a las células es un cambio importante en términos del funcionamiento de estos compuestos en futuros ensayos (García *et al.*, 2016).

En cuanto al ensayo de reducción de efecto citopático para la mezcla TO2 se obtuvo una $CI_{50}=3.125$ $\mu\text{g/mL}$, dando un valor de $IS=62.84$, caso contrario para los derivados acetilados donde su $CI_{50}=50$ $\mu\text{g/mL}$ dio como resultado un $IS=2.94$, estos resultados sugieren que la acetilación realizada a la mezcla de esteroides TO2 disminuye la selectividad de los componentes hacia HA (Salas *et al.*, 2020). Esto se vio reflejado en el ensayo de inhibición de la actividad de unión de la HA con las células, ya que los derivados AC-TO2 hasta los 40 min co-tratamiento lograron reducir el 90% de las unidades formadoras de placas. Mientras que la mezcla de esteroides TO2 desde los primeros 10 min logró reducir un 94% de las unidades formadoras de placas, a su vez TO2 logró este resultado tan eficientemente como el control positivo 6'SLN. En la Figura 4.13 se encuentran fotografías del ensayo en placa a los 10 y 60 minutos de co-tratamiento de virus-TO2, a los 10 min en la dilución 4 se puede observar una gran cantidad de placas, en cambio a los 60 min se observan unas cuantas placas. Con esto se confirma que hay una reducción de unidades formadoras de placas, lo que significa que la mezcla de esteroides TO2 inhibe la actividad de unión de la HA (Xu *et al.*, 2010).

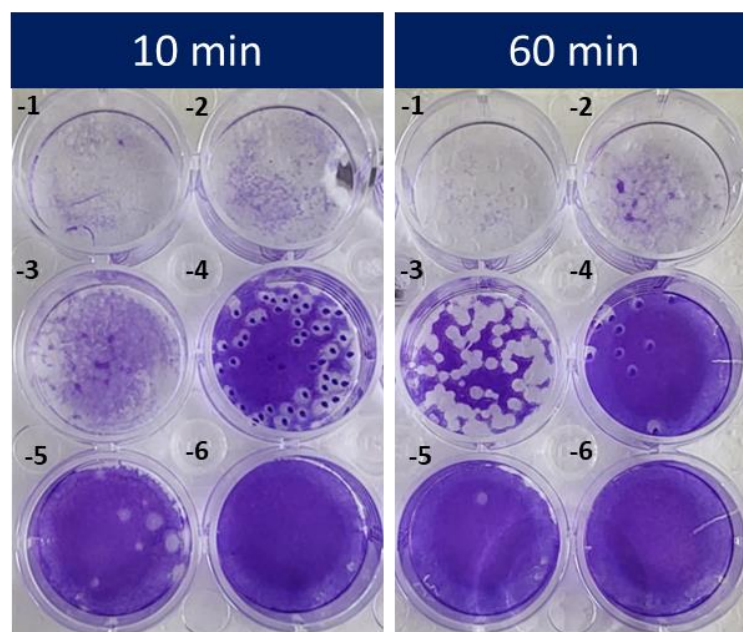


Figura 4.13 Efecto del tiempo de co-tratamiento de virus-TO2 en el ensayo de inhibición de actividad de unión de la HA, MOI=0.01.

5 CAPÍTULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 DISCUSIÓN

El riesgo del surgimiento de una pandemia o epidemia a causa de un nuevo virus, es latente. Actualmente las estrategias de mitigación no farmacéuticas (distanciamiento social, restricciones de viaje y movimiento, medidas de higiene) han reducido la circulación de la influenza. Sin embargo, este tipo de estrategias se ven limitadas ya que a medida que han disminuido las infecciones por SARS-CoV-2 los casos de influenza han ido en aumento (Hayden *et al.*, 2022). La búsqueda de nuevos esquemas para el tratamiento de la influenza debido a la resistencia que desarrollan los virus a los tratamientos actuales es una de las alternativas para enfrentar futuras epidemias por influenza. Los enfoques actuales para el descubrimiento de fármacos incluyen el uso de productos naturales, que pueden explorarse para la investigación y el desarrollo de nuevos productos antivirales (Nielsch *et al.*, 2016)

El objeto de estudio del presente proyecto fue la identificación de componentes con potencial actividad antiviral contra el virus de influenza. Por lo tanto, el extracto de corteza de tallo de *E. yucatanensis* que anteriormente fue reportado con actividad antiviral (Cetina-Montejo, 2012; May-May, 2013) fue fraccionado de manera biodirigida con el ensayo de inhibición de hemaglutinación. Con esto se identificó una mezcla de fitoesteroides compuesta por 71.37% de β -sitosterol, 17.55% de estigmasterol y 11.07% de campesterol) en las fracciones con mayor actividad IHA. Los triterpenoides y los esteroides en general son componentes naturales comúnmente encontrados en plantas y que entre sus propiedades biológicas incluyen actividad antiviral. Diversos estudios realizados informan su capacidad de unirse fuertemente a la hemaglutinina viral (HA), interrumpiendo la unión de los virus a los receptores celulares (Kazakova *et al.*, 2010; Mehrbod *et al.*, 2021).

Los componentes en TO2 fueron modificados químicamente mediante una reacción de acetilación para determinar el efecto en su actividad. Algunos fármacos han sido descubrimientos al azar a partir de modificaciones químicas que incrementan su potencia y efectividad, o en su defecto, para mejorar sus propiedades de solubilidad, potencia, absorción, distribución, metabolismo, incluso para la disminución de sus efectos

secundarios (Gao *et al.*, 2011). En otras palabras, los derivados obtenidos a partir de un componente bioactivo permiten el análisis de la relación estructura-actividad, así como el entendimiento de los grupos funcionales de interés que interactúan con el sitio activo.

Los ensayos biológicos de la mezcla de esteroides TO2 y sus derivados acetilados Ac-TO2 demostraron tenían un efecto en las etapas tempranas del ciclo de replicación viral, en la evaluación individual de los estándares puros de los esteroides no mostraron actividad IHA, indicando un efecto sinérgico entre los compuestos. Wang *et al.* evaluaron la actividad antiviral de triterpenos pentacíclicos conjugados con ácido L-ascórbico, donde la potencial sinergia de los compuestos incrementa su actividad antiviral (Wang *et al.*, 2016).

En el ensayo de reducción de efecto citopático a nivel de co-tratamiento la mezcla TO2 mostro una $CI_{50}=3,125 \mu\text{g/mL}$ ($IS=62.84$), mientras que los derivados acetilados (Ac-TO2) una $CI_{50}=50 \mu\text{g/mL}$ ($IS=2.94$). Al realizar la modificación química se requiere aumentar la concentración de los componentes para lograr inhibir el 50% de la infeccion, este resultado se ve reflejado de igual manera en el índice de selectividad de los derivados Ac-TO2, el cual es menor que el de los componentes originales en TO2. Se observo el mismo efecto en el ensayo de inhibición de formación de placas (PFU), donde TO2 mostró una inhibición del 94 % de PFU en los primeros 10 min de co-tratamiento, en cambio, Ac-TO2 mostro la misma inhibición hasta los 60 min de co-tratamiento, los resultados sugieren que la selectividad de los componentes está relacionada con el grupo Hidroxilo de los esteroides.

Anteriormente, en un estudio realizado por Yu *et al.* (2014) informaron sobre ciertos triterpenos pentacíclicos con actividad antiviral *in vitro* contra el virus de influenza A/WSN/33 (H1N1) se unían fuertemente a la hemaglutinina (HA) de la envoltura viral, interrumpiendo la interacción de la HA con el receptor de ácido siálico y, por lo tanto, la unión de los virus a las células huésped. Los resultados obtenidos para TO2 y Ac-TO2 indican que el mecanismo de acción de las mezclas de esteroides podría deberse al bloqueo de la hemaglutinina, lo que impide la unión de las partículas virales a la célula y a su vez la replicación viral del virus. Además, el grupo hidroxilo de los esteroides podría tener un papel clave en el bloqueo efectivo de la HA, ya que de acuerdo con lo publicado por Ginex *et al.* en 2020, el grupo hidroxilo en derivados de Arbidol tiene un papel fundamental en el bloqueo efectivo de la HA, ya que la presencia o ausencia de este se veía directamente reflejado en la afinidad de unión del Arbidol con la HA (Ginex *et al.*, 2021).

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

La mezcla de esteroides identificada en la corteza de tallo de *Erythrostemon yucatanensis* inhibieron las cepas del virus de la influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) y A/Mexico/InDRE797/10 (AH1N1), en etapas tempranas del ciclo de replicación viral, mediante el bloque de la HA, que a su vez impide la entrada del virus en las células huésped. También se encontró que el grupo hidroxilo en los esteroides tiene un papel importante en el bloqueo efectivo de la HA, puesto que, la ausencia de este disminuye la selectividad de estos componentes. Este es el primer informe sobre las propiedades de inhibición de la hemaglutinina de los compuestos bioactivos de *E. yucatanensis*.

5.3 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos del presente proyecto representan un aporte acerca del uso de productos de origen natural a la búsqueda continua de nuevos antivirales. Sin embargo, aún es necesario realizar más estudios para poder dilucidar el mecanismo exacto de estas moléculas. Entre los análisis que se podrían realizar se encuentran los siguientes:

1. Evaluar la actividad antiviral de los otros esteroides identificados con posible actividad antiviral en la corteza de tallo de *E. yucatanensis* para determinar la sinergia entre estos componentes mediante la variación de su concentración,
2. Modificaciones químicas que ayuden a entender mejor la relación estructura actividad de los diferentes grupos funcionales en las estructuras de los esteroides. Teniendo en cuenta la afinidad de otras moléculas con el sitio de unión al receptor de la HA.
3. Realizar estudios de modelado y dinámica molecular para comprobar los resultados de la relación estructura actividad obtenidos de manera experimental.
4. Realizar ensayos *in vivo* para confirmar la efectividad de estos compuestos a nivel de tratamiento.

Todas estas actividades ayudarían a determinar el mecanismo de acción de los componentes y las acciones a realizar para aumentar la efectividad de estos componentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Akram, M., Tahir, I. M., Shah, S. M. A., Mahmood, Z., Altaf, A., Ahmad, K., ... Mehboob, H. (2018). Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. *Phytotherapy Research*, Vol. 32, pp. 811–822. <https://doi.org/10.1002/ptr.6024>
- Auladell, M., Phuong, H. V. M., Mai, L. T. Q., Tseng, Y.-Y., Carolan, L., Wilks, S., ... Fox, A. (2022). Influenza virus infection history shapes antibody responses to influenza vaccination. *Nature Medicine*, 28(2), 363–372. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01690-w>
- Ayora, G. (1999). Influenza: Historia de una enfermedad. *Revista Biomédica*, 10(490), 57–61. Retrieved from <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991017.html>
- 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(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/v13040624>
- Caceres, C. J., Seibert, B., Cargnin Faccin, F., Cardenas-Garcia, S., Rajao, D. S., & Perez, D. R. (2022). Influenza antivirals and animal models. *FEBS Open Bio*, 12(6), 1142–1165. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13416>
- Cauldwell, A. V., Long, J. S., Moncorgé, O., & Barclay, W. S. (2014). Viral determinants of influenza A virus host range. *Journal of General Virology*, 95(PART 6), 1193–1210. <https://doi.org/10.1099/vir.0.062836-0>
- Cecil, C. E., Davis, J. M., Cech, N. B., & Laster, S. M. (2011). Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *International Immunopharmacology*, 11(11), 1706–1714. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.002>
- Cetina-Montejo, L. (2012). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE Caesalpinia yucatanensis CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA A (H1N1) PANDÉMICO*.
- De Graaf, M., & Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO Journal*, 33(8), 823–841. <https://doi.org/10.1002/embj.201387442>

-
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9, pp. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>
- Duwe, S. C., Schmidt, B., Gärtner, B. C., Timm, J., Adams, O., Fickenschner, H., & Schmidtke, M. (2021). Prophylaxis and treatment of influenza: options, antiviral susceptibility, and existing recommendations. *GMS Infectious Diseases*, 9, Doc02. <https://doi.org/10.3205/id000071>
- Erbelding, E. J., Post, D. J., Stemmy, E. J., Roberts, P. C., Augustine, A. D., Ferguson, S., ... Fauci, A. S. (2018). A universal influenza vaccine: The strategic plan for the national institute of allergy and infectious diseases. *Journal of Infectious Diseases*, 218(3), 347–354. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy103>
- Ferhadian, D., Contrant, M., Printz-Schweigert, A., Smyth, R. P., Paillart, J. C., & Marquet, R. (2018). Structural and functional motifs in influenza virus RNAs. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00559>
- Flerlage, T., Boyd, D. F., Meliopoulos, V., Thomas, P. G., & Schultz-Cherry, S. (2021). Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 425–441. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00542-7>
- Gagnon, E., Bruneau, A., Hughes, C. E., de Queiroz, L. P., & Lewis, G. P. (2016). A new generic system for the pantropical Caesalpinia group (Leguminosae). *PhytoKeys*, 71(1), 1–160. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.71.9203>
- Gao, L., Zu, M., Wu, S., Liu, A. L., & Du, G. H. (2011). 3D QSAR and docking study of flavone derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(19), 5964–5970. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.071>
- García, M. A., Aguilar, A., Gutiérrez, M., Rodríguez, F., Morales, J. A., Guerrero, P. J., ... Del-toro-sánchez, C. (2016). Y DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE TEMPISQUE (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Biotechnia*, XVIII(3), 3–8.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., ... Cox, N. J. (2009). *Antigenic and Genetic Characteristics Influenza Viruses Circulating in Humans*. 325(July).
-

-
- Gaurav, S., Jeyabalan, G., & Anil, A. (2020). Review Article Pharmacognostical , Phytochemical and Pharmacological Review of Piper attenuatum (B . HAM) AND Caesalpinia crista (LINN). *International Journal of Health and Biological Sciences*, 3(4), 7–13.
- Ginex, T., & Luque, F. J. (2021). Searching for effective antiviral small molecules against influenza A virus: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 31(1), 53–66. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1831471>
- Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M., & Kieny, M. P. (2010). The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*, 28(31), 4895–4902. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.031>
- Harrington, W. N., Kackos, C. M., & Webby, R. J. (2021). The evolution and future of influenza pandemic preparedness. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(5), 737–749. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00603-0>
- Hayden, F. G., Asher, J., Cowling, B. J., Hurt, A. C., Ikematsu, H., Kuhlbusch, K., ... Monto, A. S. (2022). Reducing Influenza Virus Transmission: The Potential Value of Antiviral Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 74(3), 532–540. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab625>
- Heida, R., Bhide, Y. C., Gasbarri, M., Kocabiyik, Ö., Stellacci, F., Huckriede, A. L. W., ... Frijlink, H. W. (2021). Advances in the development of entry inhibitors for sialic-acid-targeting viruses. *Drug Discovery Today*, 26(1), 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.009>
- Hutchinson, E. C. (2018). Influenza Virus. *Trends in Microbiology*, 26(9), 809–810. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013>
- Ison, M. G., Hayden, F. G., Hay, A. J., Gubareva, L. V., Govorkova, E. A., Takashita, E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2021). Influenza polymerase inhibitor resistance: Assessment of the current state of the art - A report of the isirv Antiviral group. *Antiviral Research*, 194. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105158>
- Kalil, A. C., & Thomas, P. G. (2019). Influenza Fisiopatología. *Critical Care*, 23(258), 1–7.
- Kapoor, R., Sharma, B., & Kanwar, S. S. (2017). Antiviral Phytochemicals: An Overview. *Biochemistry & Physiology: Open Access*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000220>
-

-
- Karpagasundari, C., & Kulothungan, S. (2014). Analysis of bioactive compounds in *Physalis minima* leaves using GC MS, HPLC, UV-VIS and FTIR techniques. ~ 196 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 196–201.
- Kazakova, O. B., Giniyatullina, G. V, Yamansarov, E. Y., & Tolstikov, G. A. (2010). Betulin and ursolic acid synthetic derivatives as inhibitors of Papilloma virus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(14), 4088–4090. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.083>
- Khuntia, B. K., Sharma, V., Wadhawan, M., Chhabra, V., Kidambi, B., Rathore, S., ... Sharma, G. (2022). Antiviral Potential of Indian Medicinal Plants Against Influenza and SARS-CoV: A Systematic Review. *Natural Product Communications*, 17(3). <https://doi.org/10.1177/1934578X221086988>
- Kiani, M. A., Ghazanfarpour, M., & Saeidi, M. (2019). *Influenza: A Unique Disease*. 7(64), 9349–9354. <https://doi.org/10.22038/ijp.2019.37939.3278>
- Klingen, T. R., Reimering, S., Guzmán, C. A., & McHardy, A. C. (2018). In Silico Vaccine Strain Prediction for Human Influenza Viruses. *Trends in Microbiology*, 26(2), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.001>
- Kosik, I., & Yewdell, J. W. (2019). Influenza hemagglutinin and neuraminidase: Yin–yang proteins coevolving to thwart immunity. *Viruses*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/v11040346>
- Krammer, F., & Palese, P. (2015). Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(3), 167–182. <https://doi.org/10.1038/nrd4529>
- Kumar, R., Patel, D. K., Prasad, S. K., Sairam, K., & Hemalatha, S. (2012). Antidiabetic activity of alcoholic root extract of *Caesalpinia digyna* in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2 SUPPL.), S934–S940. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60340-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60340-2)
- Laurie, K. L., & Rockman, S. (2021). Which influenza viruses will emerge following the SARS-CoV-2 pandemic? *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 15(5), 573–576. <https://doi.org/10.1111/irv.12866>
- Li, R., Liu, T., Liu, M., Chen, F., Liu, S., & Yang, J. (2017). Anti-influenza A Virus Activity of Dendrobine and Its Mechanism of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
-

65(18), 3665–3674. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00276>

- Liu, A., Shu, S., Qin, H., Lee, S., & Du, G. (2009). In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Medica*, 75(4), 337–339. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1112208>
- Liu, J., Gong, L., & Sun, Z. (2019). Genetic and antigenic characterization of influenza A (H1N1) pdm09 in Yantai, China, during the 2009 – 2017 influenza season. (March 2018), 351–360. <https://doi.org/10.1002/jmv.25328>
- Liu, T., Wang, M., Qi, S., Shen, X., Wang, Y., Jing, W., ... Gao, H. (2020). New cassane-type diterpenoids from kernels of *Caesalpinia bonduc* (Linn.) Roxb. and their inhibitory activities on phosphodiesterase (PDE) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) expression. *Bioorganic Chemistry*, 96. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103573>
- Liu, Z., Zhao, J., Li, W., Shen, L., Huang, S., Tang, J., ... Zhang, R. (2016). Computational screen and experimental validation of anti-influenza effects of quercetin and chlorogenic acid from traditional Chinese medicine. *Scientific Reports*, 6(January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep19095>
- Martha E . Méndez-González *, Wendy M . Torres-Avilez , Alfredo Dorantes-Euán y Rafael Durán-García Los mayas peninsulares. *Rev. Folotec., Mex.*, 37(2), 97–106.
- Maurya, R., Ravi, M., Singh, S., & Yadav, P. P. (2012). A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*, 83(2), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.007>
- May-May, Á. (2013). Evaluación de la actividad antiviral de compuestos obtenidos de *Caesalpinia yucatanensis* contra el virus de la influenza a (H1N1). 11(2), 430–439.
- Mehrbod, P., Safari, H., Mollai, Z., Fotouhi, F., Mirfakhraei, Y., Entezari, H., ... Tofighi, Z. (2021). Potential antiviral effects of some native Iranian medicinal plants extracts and fractions against influenza A virus. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03423-x>
- Meiyanto, E., Lestari, B., Sugiyanto, R. N., Jenie, R. I., Utomo, R. Y., Sasmito, E., & Murwanti, R. (2019). *Caesalpinia sappan* L. heartwood ethanolic extract exerts genotoxic inhibitory and cytotoxic effects. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0351-9>
- Moradi, M. T., Karimi, A., & Lorigooini, Z. (2018). Alkaloids as the natural anti-influenza

-
- virus agents: a systematic review. *Toxin Reviews*, 37(1), 11–18.
<https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1323338>
- Nadaf, M., Joharchi, M., & Amiri, M. S. (2019). Ethnomedicinal Uses of Plants for the Treatment of Nervous Disorders at the Herbal Markets of Bojnord, North Khorasan Province, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(2), 153–163.
- Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2022). Seasonality of influenza and other respiratory viruses. *EMBO Molecular Medicine*, 14(4), 4–6.
<https://doi.org/10.15252/emmm.202115352>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nielsen, U., Fuhrmann, U., & Jaroch, S. (2016). Approaches to Drug Discovery. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 270).
<https://doi.org/10.1056/nejm196405212702106>
- Oliveira, A. F., Teixeira, R. R., De Oliveira, A. S., De Souza, A. P. M., Da Silva, M. L., De Paula, S. O., & Schmidt, T. J. (2017). Potential antivirals: Natural products targeting replication enzymes of dengue and Chikungunya viruses. *Molecules*, 22(3).
<https://doi.org/10.3390/molecules22030505>
- Perveen, S. (2018). *Capítulo Introductorio: Terpenos y Terpenoides*. (March).
- Qiu, S., Sun, H., Zhang, A. H., Xu, H. Y., Yan, G. L., Han, Y., & Wang, X. J. (2014). Natural alkaloids: Basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 401–406. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60063-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60063-7)
- Quiroz-Carranza, J., & Orellana, R. (2010). Use and management of firewood in dwellings of six localities from yucatán, México. *Madera Bosques*, 16(2), 47–67.
<https://doi.org/10.21829/myb.2010.1621172>
- Rao, Y. K., Fang, S. H., & Tzeng, Y. M. (2005). Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.039>
- Rawat, G., Tripathi, P., & Saxena, R. K. (2013). Expanding horizons of shikimic acid: Recent progresses in production and its endless frontiers in application and market
-

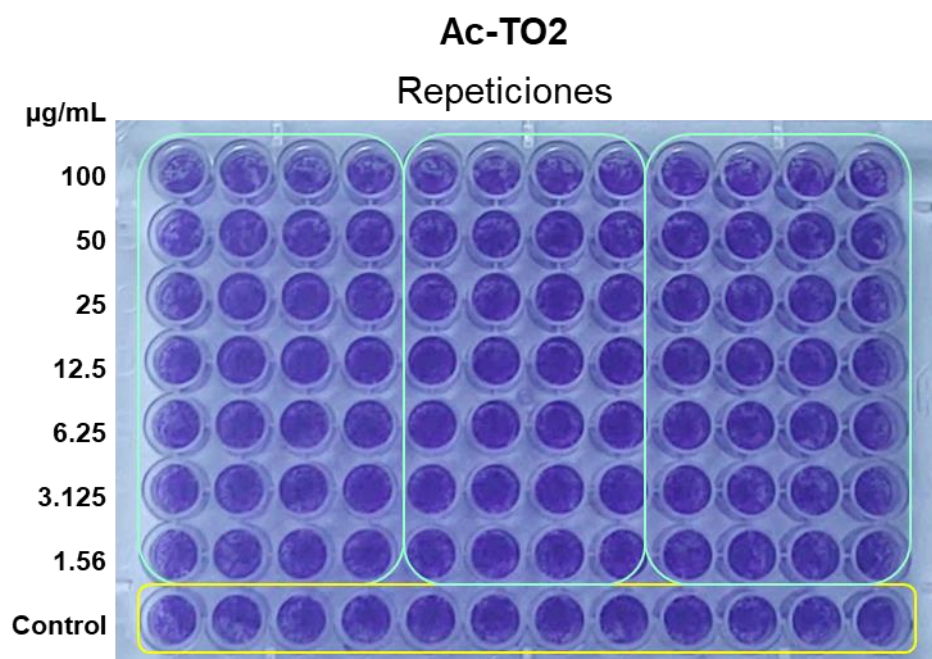
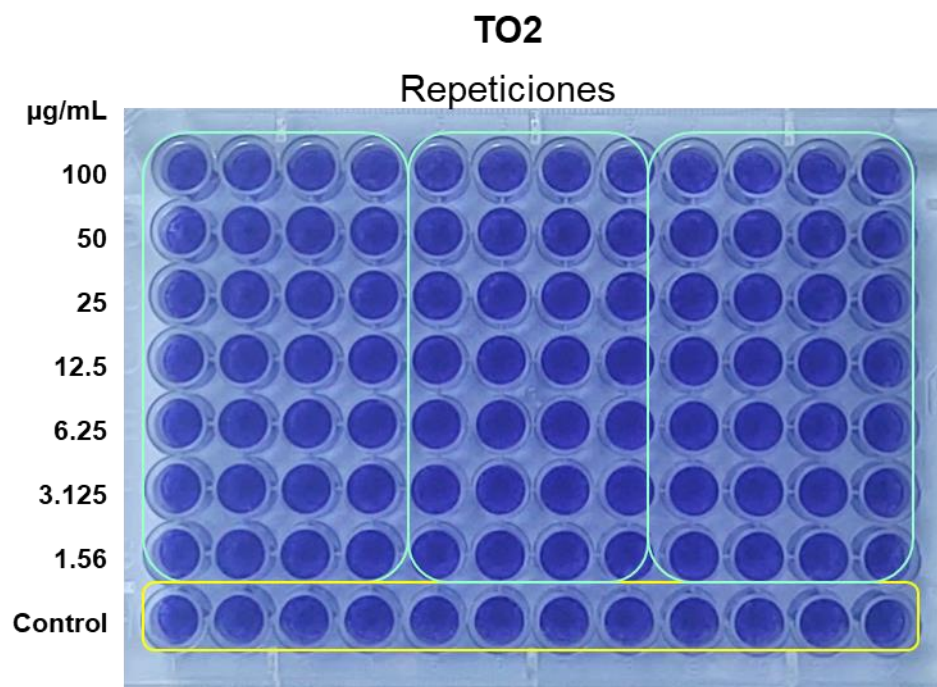
-
- trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4277–4287. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4840-y>
- Roomi, M. W., Jariwalla, R. J., Kalinovsky, T., Roomi, N., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2008). Inhibition of cellular invasive parameters in influenza A virus-infected MDCK and Vero cells by a nutrient mixture. *BioFactors*, 33(1), 61–75. <https://doi.org/10.1002/biof.5520330106>
- Rosado-Aguilar, J. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Borges-Argaez, R., & Arjona-Cambranes, K. A. (2017). Acaricidal activity of *Havardia albicans* and *Caesalpinia gaumeri* methanolic leaf extracts on *Rhipicephalus microplus* and its toxicity to laboratory animals. *Experimental and Applied Acarology*, 71(4), 345–354. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0130-1>
- Rossman, J. S., & Lamb, R. A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411(2), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>
- Salas, C. O., Zarate, A. M., Kryštof, V., Mella, J., Faundez, M., Brea, J., ... Espinosa-Bustos, C. (2020). Promising 2,6,9-trisubstituted purine derivatives for anticancer compounds: Synthesis, 3D-QSAR, and preliminary biological assays. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010161>
- Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K., & Kobayashi, N. (2011). Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Letters*, 585(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.017>
- Skehel, J. J., & Waterfield, M. D. (1975). Studies on the primary structure of the influenza virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 93–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.93>
- Solís-Rodríguez, U. R. J., Ramos-Zapata, J. A., Hernández-Cuevas, L., Salinas-Peba, L., & Guadarrama, P. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi diversity and distribution in tropical low flooding forest in Mexico. *Mycological Progress*, 19(3), 195–204. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01550-x>
- Suarez, D. L. (2016). Common aspects of animal influenza 1 Influenza A virus. *Animal Influenza*, 1–29. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/9781118924341.ch1>
- Takayama, H., Iimura, Y., Kitajima, M., Aimi, N., Konno, K., Inoue, H., ... Katsuura, K. (1997). Discovery of anti-influenza A virus activity of a corynanthe-type indole
-

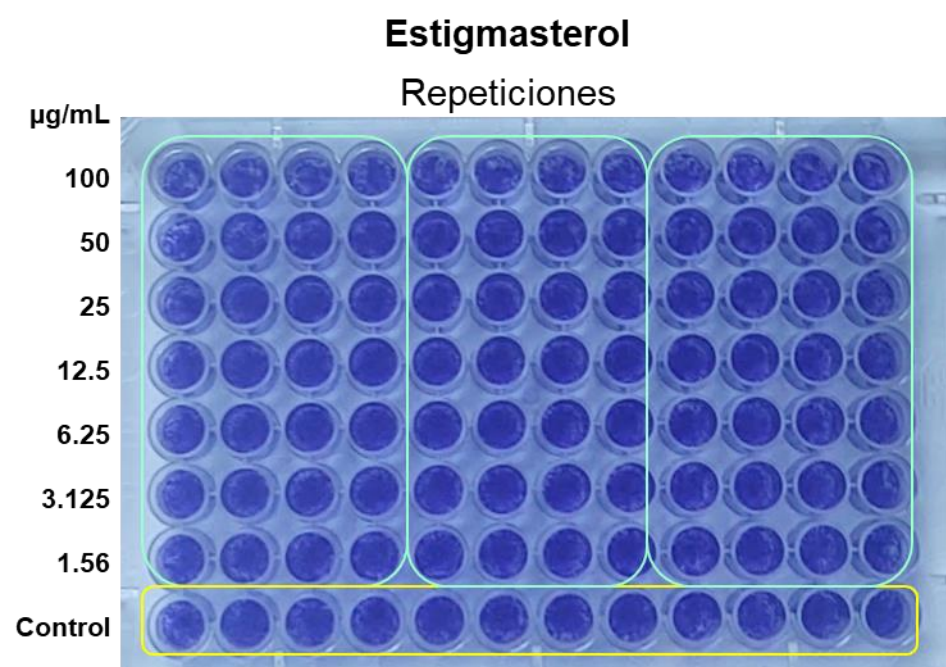
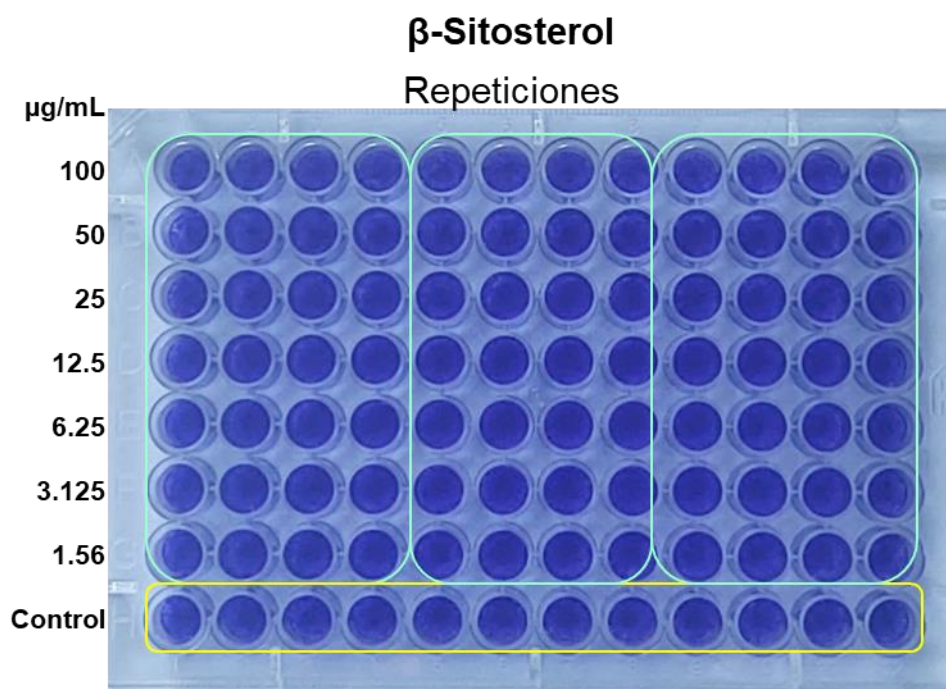
-
- alkaloid, hirsutine, in vitro and the structure-activity relationship of natural and synthetic analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 7(24), 3145–3148. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)10154-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)10154-8)
- Wang, H., Xu, R., Shi, Y., Si, L., Jiao, P., Fan, Z., ... Xiao, S. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of novel l-ascorbic acid-conjugated pentacyclic triterpene derivatives as potential influenza virus entry inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110, 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.005>
- Wang, L., Song, J., Liu, A., Xiao, B., Li, S., Wen, Z., ... Du, G. (2020). Research Progress of the Antiviral Bioactivities of Natural Flavonoids. *Natural Products and Bioprospecting*, 10(5), 271–283. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00257-x>
- Wang, S., Liao, H., Zhang, J., Cheng, T. R., & Wong, C. (2019). Development of a universal influenza vaccine using hemagglutinin stem protein produced from *Pichia pastoris*. *Virology*, 526(June 2018), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.005>
- Wohlbold, T. J., & Krammer, F. (2014). In the shadow of hemagglutinin: A growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses*, 6(6), 2465–2494. <https://doi.org/10.3390/v6062465>
- Wu, W., Li, R., Li, X., He, J., Jiang, S., Liu, S., & Yang, J. (2015). Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) Entry. *Viruses*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/v8010006>
- Xiao, S., Tian, Z., Wang, Y., Si, L., Zhang, L., & Zhou, D. (2018). Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. *Medicinal Research Reviews*, 38(3), 951–976. <https://doi.org/10.1002/med.21484>
- Xu, G., Dou, J., Zhang, L., Guo, Q., & Zhou, C. (2010). Inhibitory effects of baicalein on the influenza virus in vivo is determined by baicalin in the serum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(2), 238–243. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.238>
- Yan, H., Ma, L., Wang, H., Wu, S., Huang, H., Gu, Z., ... Li, Y. (2019). Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. *Journal of Natural Medicines*, 73(3), 487–496. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01287-7>
-

-
- Yang, Z. F., Bai, L. P., Huang, W. B., Li, X. Z., Zhao, S. S., Zhong, N. S., & Jiang, Z. H. (2014). Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. *Fitoterapia*, 93, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.12.011>
- Yin, H., Jiang, N., Shi, W., Chi, X., Liu, S., Chen, J. L., & Wang, S. (2021). Development and effects of influenza antiviral drugs. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040810>
- York, A., & Fodor, E. (2013). Biogenesis, assembly and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biology*, 10(8), 1274–1282. <https://doi.org/10.4161/rna.25356>
- Yu, M., Si, L., Wang, Y., Wu, Y., Yu, F., Jiao, P., ... Zhou, D. (2014). Discovery of pentacyclic triterpenoids as potential entry inhibitors of influenza viruses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), 10058–10071. <https://doi.org/10.1021/jm5014067>
- Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A., & Zandi, K. (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, 162(9), 2539–2551. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y>
- Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M., & Abubakar, S. (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal*, 8(1), 560. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-560>
- Zarubaev, V. V., Garshina, A. V., Tretiak, T. S., Fedorova, V. A., Shtro, A. A., Sokolova, A. S., ... Salakhutdinov, N. F. (2015a). Broad range of inhibiting action of novel camphor-based compound with anti-hemagglutinin activity against influenza viruses in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 120, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.004>
- Zarubaev, V. V., Garshina, A. V., Tretiak, T. S., Fedorova, V. A., Shtro, A. A., Sokolova, A. S., ... Salakhutdinov, N. F. (2015b). Broad range of inhibiting action of novel camphor-based compound with anti-hemagglutinin activity against influenza viruses in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 120(June), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.004>
- Zhang, G. B., Zhang, B., Zhang, X. X., & Bing, F. H. (2013). Homonojirimycin, an alkaloid from dayflower inhibits the growth of influenza A virus in vitro. *Acta Virologica*, 57(1), 85–86. https://doi.org/10.4149/av_2013_01_85
-

ANEXO 1: ENSAYOS BIOLOGICOS

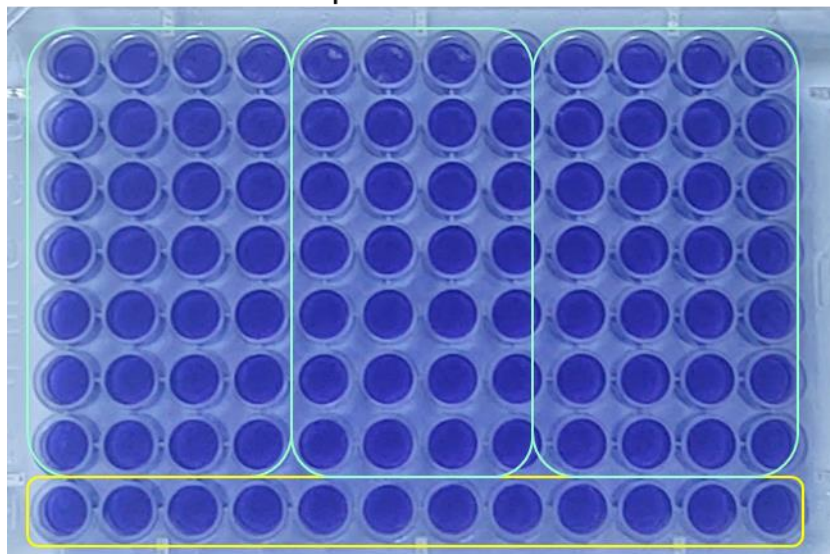
➤ Citotoxicidad





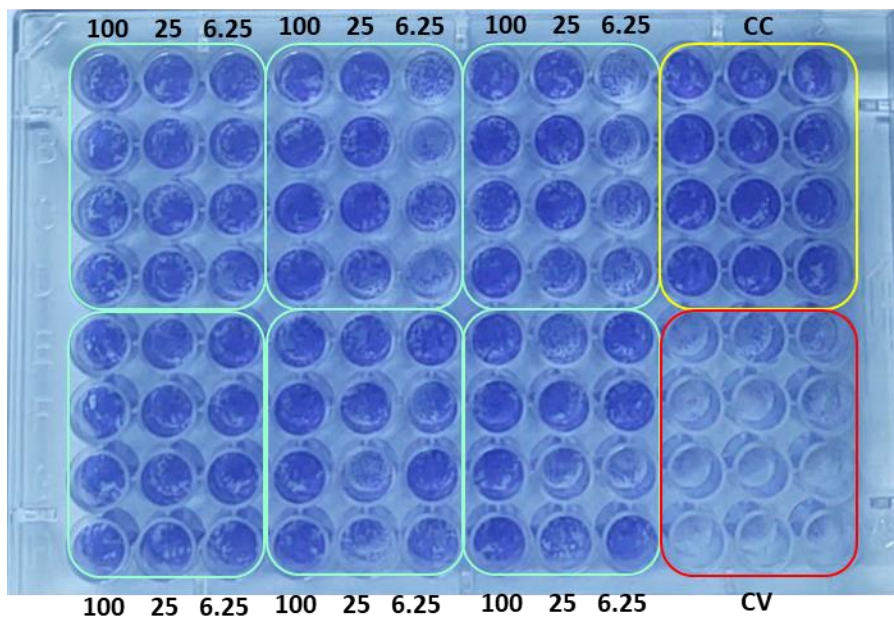
Campesterol

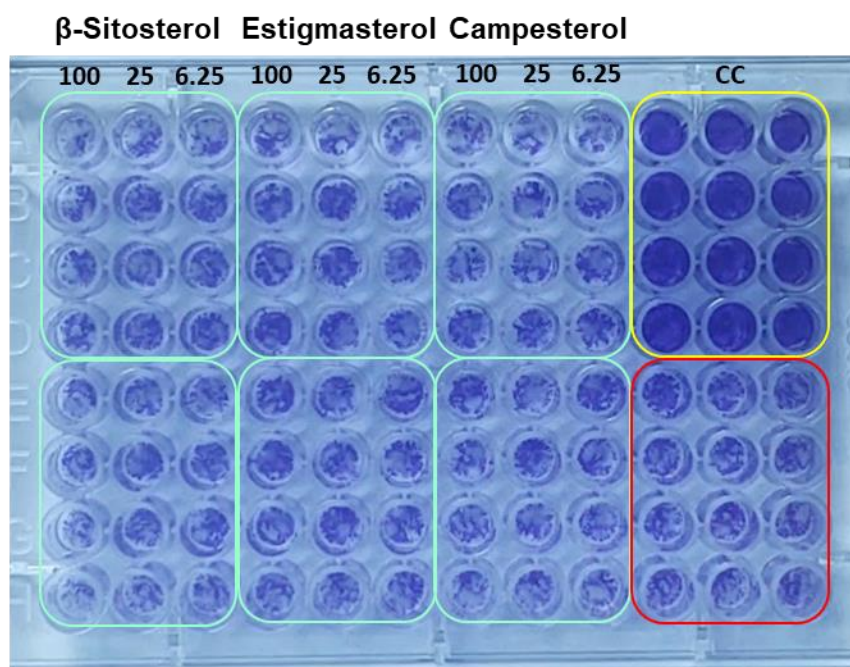
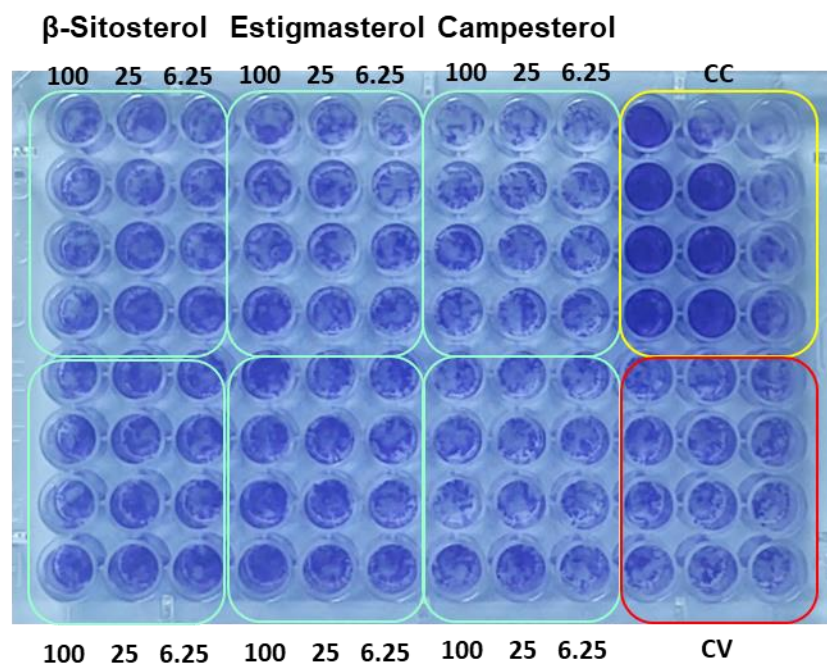
Repeticiones



- Ensayo de reducción de efecto citopático (co-tratamiento)

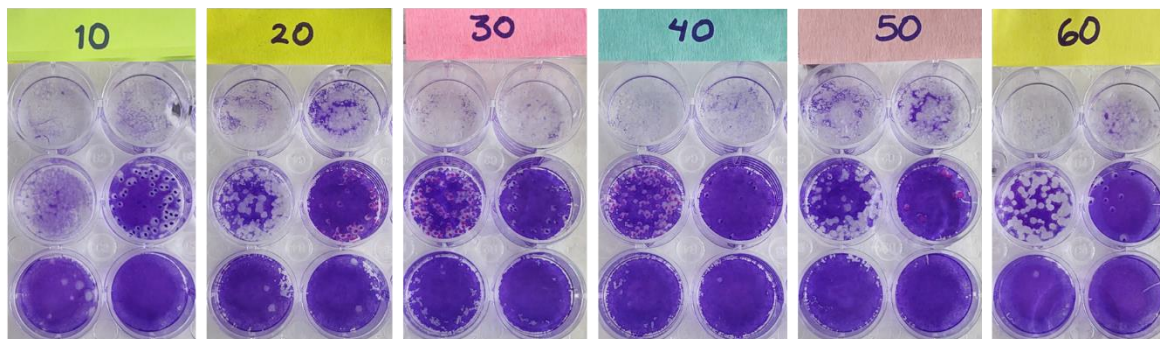
TO2



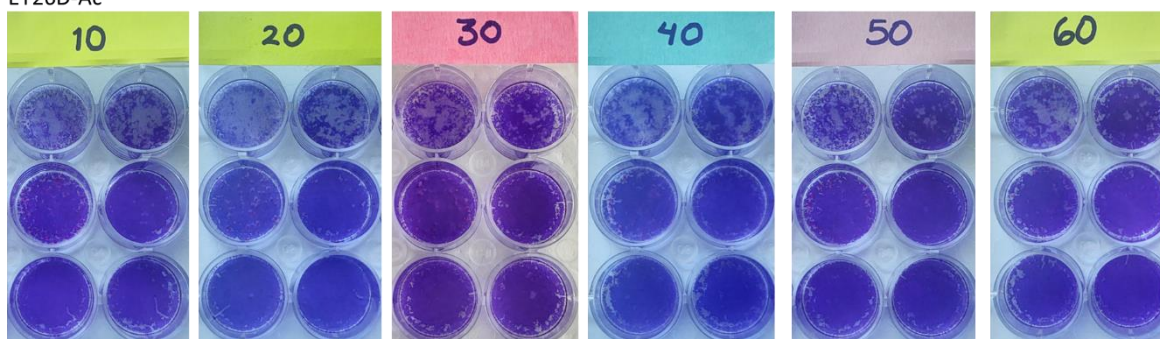


➤ Ensayo de inhibición de formación de placas (PFU)

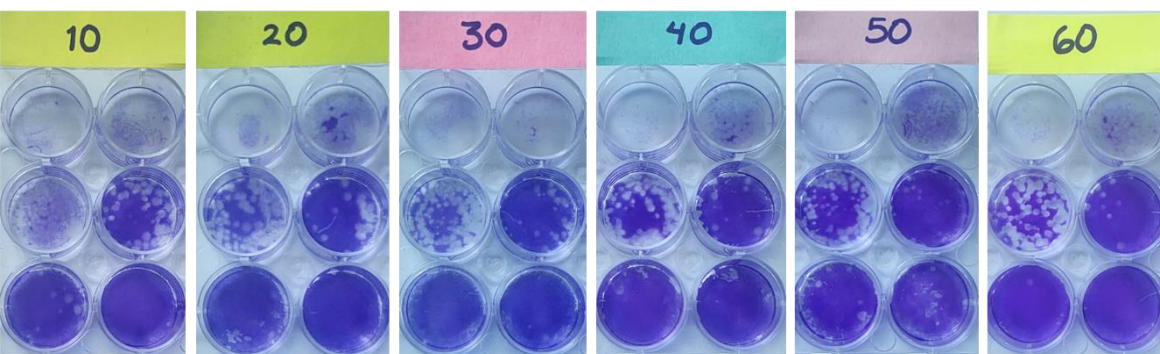
EY26D



EY26D-Ac



6'SLN



ANEXO 2: ARTICULO PUBLICADO

Bioassay-Guided Fractionation of *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis Components with Anti-hemagglutinin Binding Activity against Influenza A/H1N1 Virus.

Tania Ortiz-López ¹, Rocío Borges-Argáez ^{1*}, Guadalupe Ayora-Talavera ², Ernesto Canto-Ramírez³, Lisseth Cetina-Montejo ³, Ángel May-May ³, Fabiola Escalante-Erosa¹ and Mirbella Cáceres-Farfán ¹

¹ Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 × 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, México; tani4.ortiz@gmail.com (T.O.L.); fabiola@cicy.mx (F.E.E.); bella@cicy.mx (M.C.F.)

² Departamento de Virología, Centro de Investigaciones Regionales, Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 96 s/n × Av. Jacinto Canek y Calle 47, Paseo de Las Fuentes, 97225 Mérida, México; talavera@correo.uady.mx

³ Independent scholars Mérida, Yucatán, 97000, México; dna179002@outlook.es; lcetinam@gmail.com; angel_may_may@hotmail.com

* Correspondence: rborges@cicy.mx Tel.: +52 99-99-42-83-30

Abstract: *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis is a legume tree native to and widely distributed in southeast Mexico, where its branches are used in traditional medicine. An in vitro evaluation of the antiviral activity of extracts and fractions from the leaves, stem bark and roots against two strains of the AH1N1 influenza virus was performed, leading to the identification of bioactive compounds in this medicinal plant. In a cytopathic effect reduction assay, the fractions from the leaves and stem bark were the active elements at the co-treatment level. These were further fractionated based on their hemagglutination inhibition activity. The analysis of spectroscopy data identified a combination of phytosterols (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol) in the stem bark active fraction as the main anti-hemagglutinin binding components, while 5-hydroxy-2-(2-hydroxy-3,4,5-trimethoxyphenyl)-7-metoxi-4H(chromen-4-ona), which was isolated from the leaf extracts, showed a weak inhibition of viral hemagglutinin. Time of addition experiments demonstrated that the mixture of sterols had a direct effect on viral particle infectivity at the co-treatment level (IC₅₀ = 3.125 μ g/mL). This effect was also observed in the virus plaque formation inhibition assay, where the mixture showed 90% inhibition in the first 20 min of co-treatment at the same concentration. Additionally, it was found using qRT-PCR that the NP copy number was reduced by 92.85% after 60 min of co-treatment. These results are the first report of components with anti-hemagglutinin binding activity in the genus *Erythrostemon* sp.

Keywords: *Erythrostemon yucatanensis*; influenza A H1N1 virus; anti-hemagglutinin; sterols; flavone

1. Introduction

Respiratory viral infections are a global health problem with a significant clinical impact. The high mutation capacity of viruses creates a race to find new and effective antivirals to combat novel viral pathogens. Medicinal plants are an essential source of chemical compounds with different biological properties. These natural sources of compounds have a myriad of applications in the pharmaceutical, food, perfume, agrochemical and cosmetics industries [1,2]. The World Health Organization classifies a medicinal plant as any that contains substances which can be used for therapeutic purposes, the whole or parts (e.g., roots, stem, leaves, stem bark, fruits and seeds) of which can have applications in the control or treatment of diseases, including respiratory infections [3].

The influenza virus presents a constant threat of a new pandemic: few antiviral options are available, and antiviral resistance even to the most novel influenza inhibitors has been detected [4]. Bio-directed studies using plant sources have mainly focused on the influenza virus' surface viral proteins, neuraminidase (NA) and hemagglutinin (HA) [5,6]. These glycoproteins are associated with virus transmission and pathogenicity [7]. HA recognizes sialic acid receptors in the respiratory mucosa, allowing virus adsorption into the cell. The sialidase activity of NA contributes to virus release from infected cells and virus dispersion within the host [8].

The *Erythrostemon* genus belongs to the *Caesalpinia* group, a large pantropical clade of about 205 plant species in the subfamily *Caesalpinioideae* (*Leguminosae*). Its genus delimitation has undergone considerable changes, and the current phylogeny-based classification of the *Caesalpinia* group recognizes 26 genera (*Erythrostemon*, *Cenostigma*, *Biancaea*, *Guilandina*, *Moullava*, *Caesalpinia*, etc.). Trees and shrubs in this group are used in traditional medicine as antimicrobials (*Cenostigma gaumeri* (Greenm.) E. Gagnon & G. P. Lewis) [9], antioxidants (*Biancaea sappan* (L.) Tod., Hort. Bot. Panorm) [10], analgesics and antihyperglycemics (*Guilandina bonduc* L.) [11], antidiabetics and antituberculars (*Moullava digyna* (Rottl.) E. Gagnon & G. P. Lewis) [12], anti-inflammatories (*Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. [13] and for the treatment of different affections, including leprosy (*Caesalpinia crista* L. emend. Dandy & Exell) [14], the common cold and asthma (*Caesalpinia minax* Hance) [15]. Phenolic compounds with antiviral activity have been identified from *B. sappan*, including protosappanin A and B, brazilin, brazilein, 3-deoxysappanchalcone and sappanchalcone [16]. *Erythrostemon yucatanensis* (Greenm.) Gagnon & GP Lewis comprises 31 species, all widely distributed across the southern USA, Mexico and Central America [17,18]. In the Yucatan Peninsula in southeast Mexico, *E. yucatanensis* is widely used for fuel wood and its flowers are greatly appreciated for honey production [19]. In traditional Mayan medicine, it is used for the treatment of culturally related diseases. [20]. As part of a search for biologically active metabolites in the flora of southeast Mexico [21,22], the aim of this study was to evaluate the antiviral activity of extracts from *E. yucatanensis* throughout a bio-directed fractionation. The selection of active components was based on their ability to inhibit the virus' hemagglutinin-binding activity.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Plant material was collected in Yaxcabá municipality in the state of Yucatan, Mexico, by taxonomists from the Natural Resources Unit of the Scientific Research Centre of Yucatan (Centro de Investigacion Cientifica de Yucatán (CICY)). One specimen from each collection was archived in the Roger Orellana Herbarium (CICY) under the collection ID 2310. Stem bark, roots and leaves were dried under artificial light for 72 h at 60 °C, ground, weighed and stored in airtight bags. For the bioassay-guided purification (Figure 1), 3.06 kg of dried leaves, 1.02 kg of stem bark and 30 g of roots were extracted via static maceration in methanol (MeOH) for 24 h at room temperature. The extraction was filtered and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator at 40 °C.

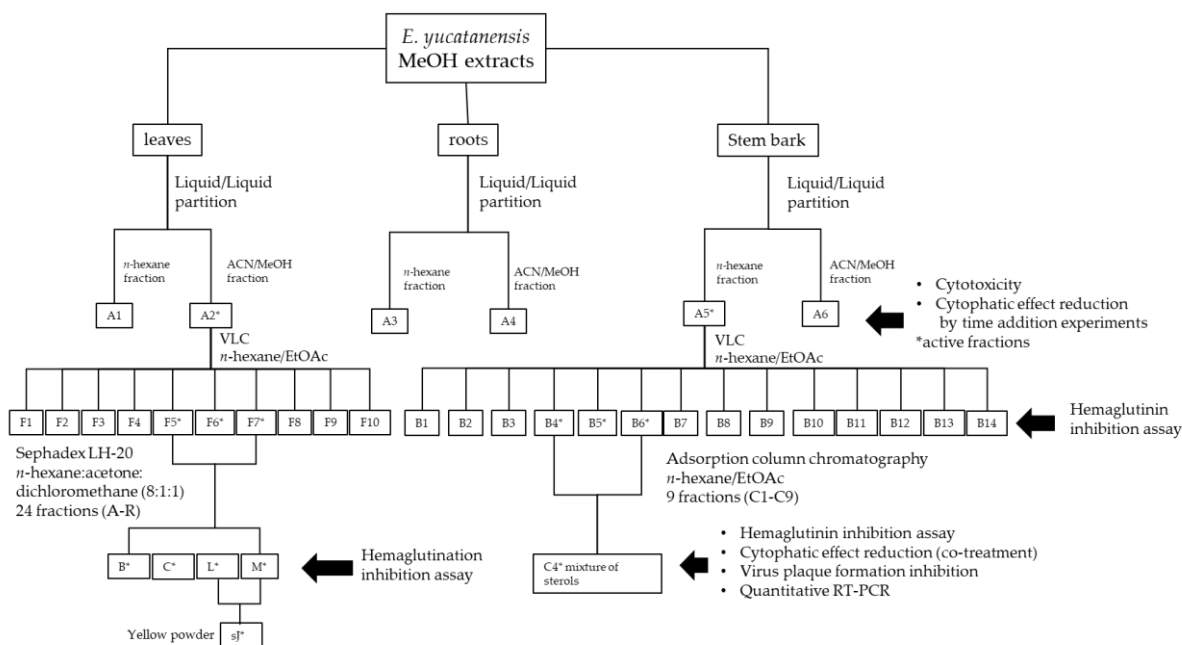


Figure 1. Experimental strategy for the bioassay-guided fractionation of antiviral compounds in *Erythrostemon yucatanensis*.

2.2. Methanolic Extract Fractionation

The leaf (38.10 g), root (0.24 g) and stem bark (1.04 g) MeOH extract were processed with a liquid–liquid partition using MeOH/ACN/*n*-hexane, following the method described by Borges-Argáez *et al.* [23]. Briefly, each extract was dissolved in MeOH and ACN (acetonitrile), placed in a separation funnel and extracted with *n*-hexane at a 1:1:3 ratio (*v/v/v*); this was repeated three times. Both the *n*-hexane fraction and the ACN/MeOH fraction were obtained after drying under reduced pressure. Fractions A1 (*n*-hexanic extract), A2 (ACN/MeOH extracts) from the leaves, A3 (*n*-hexanic extract), A4 (ACN/MeOH extracts) from the roots, A5 (*n*-hexanic extract), and A6 (ACN/MeOH

extracts) from the stem bark were selected for cytotoxic and antiviral evaluation (i.e., pre-treatment, co-treatment and post-treatment) (Figure 1).

2.3. Biological Assays

2.3.1. Cells and Viruses

Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells were kept in Dulbecco's minimal essential media (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (GIBCO) and 1M HEPES and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The influenza virus strains employed in the analyses were A/Yucatan/2370/09 (oseltamivir carboxylate susceptible) and A/MexicoInDRE/797/2010 (oseltamivir carboxylate resistant). They were cultured in MDCK cells, harvested at 72 h post-infection, aliquoted and stored at –80 °C until use.

2.3.2. Cytotoxicity Assay

MDCK cells were grown in 96-well plates at a density of 1×10⁵ cells/well and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h. After washing the cells twice with phosphate buffer saline (PBS), 100 µL of each fraction (A1–A10) was placed in the wells at one of seven concentrations: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.56 µg/mL. Four replicates were carried out for each fraction at each concentration. As controls, each plate also had one well containing only DMEM. The plates were incubated for 72 h at 37 °C in 5% CO₂. The inoculum was removed, and the cells were washed once with PBS, stained with 0.4% crystal violet in MeOH and incubated at room temperature for 30 min. After incubation, they were washed with running tap water and allowed to dry. Absorbance was measured at 490 nm using a Multilabel Plate Reader (Victor 3x Perkin-Elmer 2030). Cell viability was determined from the ratio between the optical density (OD) of the treated cells and the OD of the cell control considering 100% viable cells. %Cell viability = $(OD_{\text{treated cells}}/OD_{\text{cell control}}) \times 100$. The 50% cell cytotoxicity (i.e., the concentration causing cell death in 50% of the cells (CC₅₀)) was calculated by plotting the extract concentration (µg/mL) versus the cell viability percentage and the curve regression analysis. Calculations were also performed to determine the maximum non-cytotoxic concentration (MCNC); that is, the maximum sample concentration with no cytotoxic effect and over 90% cell viability. Once the CC₅₀ values for each fraction were calculated, a cytopathic effect reduction assay was performed.

2.3.3. Cytopathic Effect Reduction Assay

Pre-treatment was run to determine if the extracts blocked viral infection. MDCK cells were grown in 96-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. They were washed twice with PBS and incubated for another 24 h with 100 µL per well of the fraction (A1–A6) in quadruplicate. The inoculum was removed, and the cells were washed with PBS and incubated for 1 h at 37 °C in 5% CO₂ with 50 µL of virus at 0.001 MOI for A/Yucatan/2370/2009 and 0.01 MOI for A/InDRE/797/2011. The virus was removed, and the cells were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO₂ in 100 µL DMEM supplemented with 1 µg/mL TPCK trypsin.

Co-treatment was performed to evaluate if the fractions prevented the virus from binding to cell surface receptors. MDCK cells were grown in 96-well plates in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h. Different concentrations of the fractions A1–A6 were mixed with the respective viruses (0.001 MOI for A/Yucatan/2370/2009 and 0.01 MOI for A/InDRE/797/2011) and incubated for 1 h at room temperature. The virus + fraction mixtures (100 µL) were added to the cells and incubated for 1 h at 37 °C in 5% CO₂, with four replicates per fraction. The inoculum was removed, DMEM supplemented with 1 µg/mL TPCK trypsin was added to each well, and the cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 72 h.

Post-treatment evaluated if the extracts inhibited viral replication or blocked virus release from infected cells. MDCK cells were seeded in 96-well plates containing DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C in the presence of 5% CO₂ until confluence. The cells were washed twice with PBS and infected with 100 µL of virus (0.001 MOI for A/Yucatan/2370/2009 and 0.01 MOI for A/InDRE/797/2011) and incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂. After the removal of the virus inoculum, the cells were incubated with 100 µL of different dilutions of the fractions (A1–A6) in DMEM supplemented with 1 µg/mL TPCK trypsin and incubated for 72 h in 5% CO₂, with four well replicates per dilution. The cells were stained with 0.4% crystal violet in methanol for 30 min and washed with running tap water. Once dried, optical density (OD) was measured at 490 nm. In all the assays, the tested concentrations for fractions A1, A2, A3 and A6 ranged from 25 to 0.78 µg/mL, while for fractions A4 and A5, the concentrations ranged from 6.26 to 0.195 µg/mL. All assays were performed in triplicate. Oseltamivir carboxylate was used as a positive control. The percentage of viral inhibition was calculated with the following equation: viral inhibition = $[(A-B)/(C-B)] \times 100$, where A is the OD of the infected cells, B is the OD of the virus control and C is the OD of the control cells. The mean inhibitory concentration of the viral effect (IC₅₀) was calculated using linear regression.

2.3.4. Hemagglutination Inhibition Assay

A hemagglutination inhibition (HI) assay was performed to evaluate if the components isolated from *E. yucatanensis* stem bark and leaves inhibited virus hemagglutination. The fractions were diluted in PBS at different concentrations (100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL) by mixing 4 HAU of virus (in 25 µL) with the extract fractions (25 µL). These mixtures were placed in 96-well U-bottom plates and incubated for 1 h at room temperature. Soon after, 50 µL of 1% turkey erythrocytes solution was added to each well and incubated for 1 h. All assays were performed in duplicate. Controls were erythrocytes alone and a virus–erythrocyte mixture.

2.3.5. Plaque Assay

MDCK cells were seeded in 12-well plates at a density of 1×10⁶ cells/well in DMEM supplemented with 10% SFB and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. The positive control was the influenza virus strain A/MexicoInDRE/797/2010 (MOI = 0.01) and synthetic glycosaccharide 6'SLN (6-sialyl-(N-acetylactosamine) [24] (Ayora-Talavera *et al.*, 2014). Two mixtures, virus + C4 fraction (3.125 µg/mL) and virus + 6'SLN (157 µg/mL), were incubated at room temperature for six different time intervals (10, 20, 30, 40, 50 and 60 min). The mixture was added to the cells and incubated for 1 h at 37 °C to allow for virus adsorption. The mixture was removed, and the cells

were incubated in 3% agar overlay media supplemented with 1 µg/mL TPCK trypsin at 37 °C and 5% CO₂. After 72 h, the overlay media was removed, and the cells were stained with 0.4% crystal violet in MeOH for 30 min. Plaque formation inhibition was calculated as the plaque-forming units (PFUs) in each well compared to the virus control.

2.3.6. RNA Extraction and Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

MDCK cells were grown in 12-well plates at a density of 1×10^6 cells/well. The C4 fraction and 6'SLN were prepared at concentrations of 3.125 µg/mL and 250 µM, respectively, and co-treated with the influenza virus strain A/InDRE797/10 at MOI = 0.01 for 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min at room temperature before the cells were infected with the co-treated solutions at different times and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 1 hr. Then, the inoculum was removed, 1 mL of DMEM supplemented with TPCK trypsin at a concentration of 1 µg/mL was added to each well and the cells were incubated for 24 hr at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Subsequently, the cells and supernatant were harvested, and total viral RNA was extracted using the ROCHE Magna Pure Compact RNA Isolation kit according to the manufacturer's instructions. The RNA was stored at -80 °C until use. The detection and quantification of the NP gene was performed using real-time qRT-PCR with oligonucleotides (forward 5'GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG 3'; reverse 5'GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC3') and a hydrolysis probe (TaqMan) (5'/ 56- FAM CYA CTG CAA GCC CA/BHQ) [25,26] with a quantitative qRT-PCR kit (One-Step Invitrogen SuperScript TM III Platinum One-Step). For the standard curve, the plasmid pDrive cloning vector QIAGEN containing the NP gene from strain A/InDRE797/10 was used as a control.

2.3.7. Data Analysis and Interpretation

Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments. Statistical significance was calculated by a one-way ANOVA analysis and Dunnett's test, with *p*-values <0.05 considered as significant, using the GraphPad Prism 6.01 software.

2.4. Bioassay-guided Fractionation of Leaf Extracts.

The bioassay-guided fractionation was based on the hemagglutinin binding inhibitory activity of the extracts. The leaf extracts (38.10 g) were processed by liquid-liquid partition, which resulted in the A1 (11.60 g) and A2 (26.50 g) fractions, as previously described in Section 2.2. Fraction A2 was processed using VLC on silica gel (13 × 5 cm) eluted with 500 mL each of *n*-hexane (100%, 1 L, fraction 1–2) followed by 95:5 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 3), 90:10 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 4), 80:20 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 5), 70:30 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 6), 60:40 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 7), 50:50 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 8), 40:60 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 9), 30:70 *n*-hexane:acetone (500 mL, fraction 10) and finally 100% acetone (250 mL, fraction 11). The resulting 15 fractions were compared using TLC and those with similar compositions were combined to obtain ten final fractions (F1–F10). Then, fractions F5, F6 and F7 (100 mg in total) were processed by gel permeation chromatography using a Sephadex LH20 (1.5 × 60 cm) and *n*-hexane:acetone:dichloromethane (8:1:1) as the mobile phase, resulting in 43 fractions. Based on the R_f value from the TLC results, 24 final fractions (A–R) were obtained. The

fractions L and M yielded a yellow precipitate named sJ (5 mg), which was identified as a flavone using ^1H -NMR and bidimensional analysis.

2.5. Bioassay-guided Fractionation of Stem Bark Extracts.

The bioassay-guided fractionation was based on the hemagglutinin binding inhibitory activity of the extracts. The partitioning of the stem bark extract (1.02 kg) produced the A5 (122.5 g) and A6 (925.2 g) fractions. A portion (40 g) of A5 was processed using VLC on silica gel (6×7 cm) and eluted with 500 mL of *n*-hexane (100%, 500 mL, fraction 1) followed by decreasing proportions of *n*-hexane:EtOAc (80:20, 70:30, 50:50, 25:75) until reaching 100% EtOAc. The column was washed with 100% MeOH (500 mL) to isolate 22 fractions. These were compared using TLC (*n*-hexane:EtOAc; 8:2 and 7:3) to produce 14 final fractions (B1–B14). Then, fraction B6 (1.03 g) was fractionated via adsorption column chromatography (3.5×30 cm) using silica gel (Sigma Aldrich) as the stationary phase, a 60 Å pore size and a 70–230 mesh. It was eluted with 250 mL each of *n*-hexane (100%, 250 mL) followed by decreasing proportions of *n*-hexane:EtOAc (100:00, 90:10, 80:20, 80:20, 75:25, 75:25, 50:50, 50) until reaching 100% EtOAc. The column was washed with 100% MeOH (250 mL), resulting in 261 fractions. These were compared using TLC (*n*-Hx: CH_2Cl_2 :An; 8:1:1), which produced 9 final fractions (C1–C9) (Figure 1). A precipitate was isolated from fraction C4 and washed with MeOH, resulting in a white powder that was characterized using GC-MS.

2.6. Characterization of Anti-HA Compounds in C4.

2.6.1. Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR)

The C4 fraction was also analysed via Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) using a spectroscope (BRUKER Tensor II, Madison WI, USA) with a diamond tip ATR detector. Data (Madison WI, USA) were collected within a $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ range with a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans in the specified wavelength range. The equipment automatically processed the data with an atmospheric CO_2 compensation for each spectrum and an ATR diamond angle correction.

2.6.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

The C4 fraction was analysed using GC-MS with a gas chromatographer (Agilent Technologies 7890A, Santa Clara, CA, USA) coupled to a mass detector (Agilent Technologies 5975C, Santa Clara, CA, USA) with a 5% phenyl- 95% methylpolysiloxane column (30 m long, 0.25 mm diameter, 0.25 μm film thickness) (Agilent Technologies 19091S–433HP-5MS, Santa Clara, CA, USA). Helium was the carrier gas, and the analysis parameters were as follows: initial temperature of $120\text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min, increase by $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ to $200\text{ }^\circ\text{C}$ in 2 min, increase by $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ to $300\text{ }^\circ\text{C}$ in 15 min and constant for 15+ min.

2.6.3. NMR Structure Elucidation

^1H , ^{13}C , COSY, HMQC and HMBC NMR spectra were recorded with a spectrometer (Santa Clara, CA, USA) (Varian 600 MHz) in CDCl_3 using TMS as an internal standard.

3. Results

3.1. Antiviral Activity of Leaf, Root and Stem Bark Fractions of *E. yucatanensis*

The antiviral activity of the leaf, root and stem bark fractions (A1–A6) was assessed in the different virus + extract treatments. The results of the cytotoxicity assay revealed that the leaf (A2) and stem bark (A5) fractions exhibited cytotoxic activity in the range of 41.70 to >100 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). However, in the co-treatment (Table 1), the leaf and stem bark fractions were active against both virus strains with selectivity indexes >300, as indicated for A2. Thus, our results suggest that these fractions may affect the entrance of the virus into the cell via the interaction with viral hemagglutinin. The root fractions, A3 and A4, had the highest cytotoxicity. The cytopathic effect is the set of morphological changes or damage to the cells suffer being infected by a virus and that normally results in cell death. None of the fractions or extracts were active ($\text{IC}_{50} > 6.25 \mu\text{g/mL}$) in pre-treatment or post-treatment, although fraction A5 did exhibit some activity against the A/Mexico/Indre797/10 strain with an IC_{50} of 3.62 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, the root extracts were excluded from the study and no further fractionation was performed.

Table 1. Cytotoxic and antiviral activity of fractions A1 to A6 from *E. yucatanensis* during co-treatment assays.

Fractions	CC50	A/Yucatán/2370/09	A/México/InDRE797/10
(Plant part)	$\mu\text{g/mL}$	MOI:0.001	MOI:0.01
		IC50 (SI)	IC50(SI)
		$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
A1 (leaves)	>100	>25 (4.00)	>25 (4.00)
A2 (leaves)	71.95	<0.195 (368.97)	<0.195 (368.97)
A3 (roots)	15.96	>6.25 (2.55)	>6.25 (2.55)
A4 (roots)	12.24	>6.25 (1.95)	>6.25 (1.95)
A5 (stem bark)	41.7	2.51(16.6)	4.83 (8.63)
A6 (stem bark)	50.47	>25 (8.04)	<0.78 (64.70)

CC₅₀—50% cell toxicity concentration; IC₅₀ 50%—inhibition concentration; SI—selective index, CC₅₀/IC₅₀.

3.2. Leaf Components from *E. yucatanensis* with Anti-HA Activity

The HI assay was used as an indirect approach to determine which leaf components showed anti-HA activity. From the bioassay fractionation, fractions F5, F6 and F7 exhibited the ability to inhibit hemagglutination at all tested concentrations (100, 50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 2). These three fractions were combined (fraction F567), and the anti-HA activity was further evaluated in the 24 resulting fractions (A–R) (Figure 1). Fractions B, C, L and M were active, although only the

yellow precipitate sJ, obtained from fractions L and M, showed weak inhibitory activity (Figure 2). The other fractions were not analysed further due to the small amount of sample obtained and their complexity, as determined by TLC (Figure 2). The pure sample was analysed using GC/MS, ^1H NMR and bidimensional analysis. The ^1H NMR analysis identified resonances for a strongly chelated OH group at $\delta 12.55$, typical of the 5-OH group; resonances for methoxyl groups between $\delta 3.87$ and 3.99 and aromatic protons; and a signal at $\delta 7.34$ typical of a flavone proton. A $^3\text{J}_{\text{CH}}$ correlation between the methoxyl protons at $\delta 3.81$ and the carbon at $\delta 165.59$ was observed in the HMBC spectral data, which allowed the assignment of the methoxylated proton to the C-7 position. The HMBC data also identified a methoxyl at $\delta 3.99$ attached to C4' and a methoxyl at $\delta 3.874$ attached to C3'. The final methoxyl group at $\delta 3.82$ was assigned to the C5' position. Additional OH group correlations were confirmed by the $^3\text{J}_{\text{CH}}$ correlation between a $\delta 12.55$ proton and the carbons at $\delta 97.79$ (C6) and $\delta 105.93$ (C4a) and by $^2\text{J}_{\text{CH}}$ with $\delta 161.84$ (C5). The HSQC experiment identified eight protonated carbons. The substitution pattern on the A and B rings was fully established using NOE experiments with the irradiation of each methoxyl group. Based on this, the flavone sJ was unequivocally identified as 5-hydroxy-2(2-hydroxy-3,4,5-trimethoxyphenyl)-7-methoxy-4H(chromen-4-one).

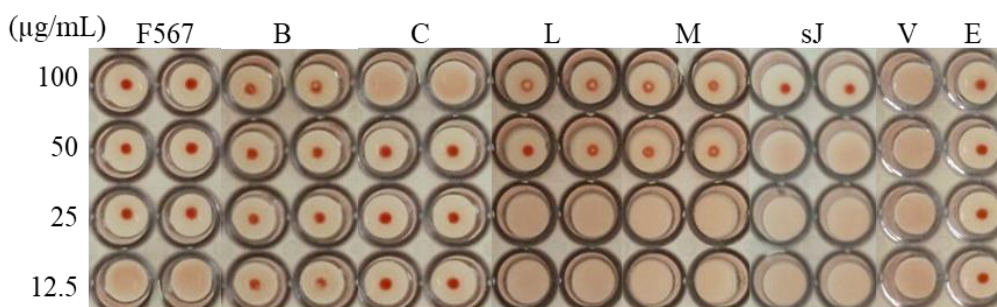


Figure 2. Hemagglutination inhibition activity of fractions F567, B, C, L and M and flavone sJ from the leaves of *E. yucatanensis*. Results: full inhibition (red button) or no inhibition (no red button). Controls: virus + erythrocytes (V) and erythrocytes (E).

3.3. Stem Bark Fractions from *E. yucatanensis* with Anti-HA Activity

The initial screening of the fractions from stem bark showed that A5 had some activity against the virus A/México/InDRE797/10. The bioguided fractionation resulted in 14 fractions (B1–B14), and fraction B6 also showed anti-HA activity in the HI assay at a concentration of 6.25 to 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3). The sequential chromatographic fractionation of B6 ended with a final component named C4, which was a white crystalline powder that showed inhibition at a concentration of 6.25 $\mu\text{g/mL}$ when evaluated in the HI assay. The C4 sample had a single spot on the TLC assay with an R_f of 0.31 corresponding to the 80:20 *n*-hexane:AcOEt elution system, suggesting that C4 was a pure compound. The IR analysis showed absorption bands for hydroxyl groups at 3400 cm^{-1} and the tensile vibration of C–H bonds around 2900 cm^{-1} (Figure 4a). However, the GC-MS analysis showed that C4 had three main peaks with RTs of 20.10 min (campesterol), 20.50 min (stigmasterol) and 20.90 min (β -sitosterol) (Figure 4b).

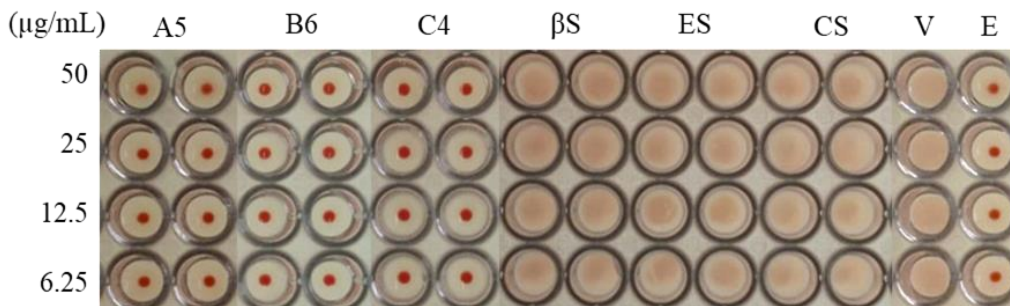
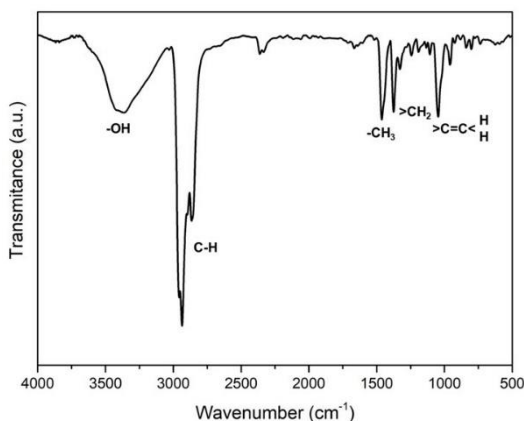


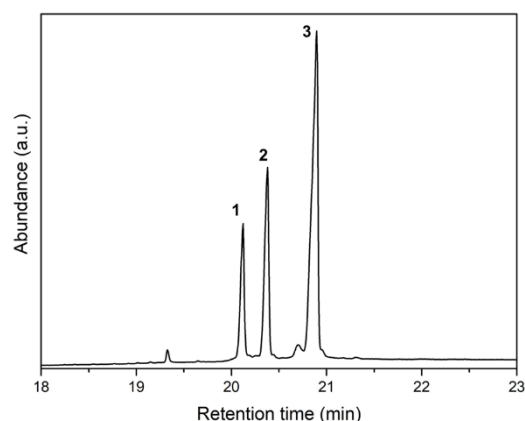
Figure 3. Hemagglutination inhibition assay of some stem bark fractions from *E. yucatanensis*. Results: full inhibition (red button) or no inhibition (no red button). HI assay of stem bark fractions (A5, B6 and C4) and analytical standards of β -sitosterol (β S), stigmasterol (ES) and campesterol (CS). Controls: virus + erythrocytes (V) and erythrocytes (E).

A typical fragment was observed in the mass fragmentation spectra at m/z 396, which corresponded to a fragment with a loss of 18 units due to a water molecule (from the OH group in position 3). This fragment underwent a new fragmentation, giving rise to the m/z 255 fragment, formed by the loss of the side chain attached to the sterane. The presence of these sterols was also confirmed by the fragments resulting from the loss of the side chain by the original sterane without water loss (273 m/z), and the subsequent loss of 18 units due to the water molecule (OH group in position 3) (Figure 4c).

The ^1H NMR analysis revealed a profile that was characteristic of steroidal compounds. The series of intense high-field signals noted in the spectrum is associated with the presence of methyl groups at δ 1.01 (s), δ 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz), δ 0.84 (d, $J = 2.7$ Hz), δ 0.83 (s), δ 0.82 (s), δ 0.81 (s) and δ 0.68 (s). The proton resonating at δ 3.51 (ddd, $J = 19.2, 10.6, 6.8$ Hz) corresponds to the proton of a carbon bonded to a hydroxyl group; this is a characteristic signal for the hydrogen located at position 3 of the sterane, which, according to the coupling constants, allows for the location of the hydroxyl group in the β -position. The signals at δ 5.02 (dd, $J = 15.1, 8.6$ Hz, 3H) and δ 5.15 (dd, $J = 15.1, 8.7$ Hz) are characteristic of the vinyl protons on the C-22 and C-23 carbons of stigmasterol, respectively. Another characteristic signal for sterols was present in the spectrum of a signal at δ 5.35 (d, $J = 2.8$ Hz), which corresponds to the vinyl proton at position 6 of the sterane (Figure 4d). These data confirmed that the sample was a mixture of three compounds: campesterol, stigmasterol and β -sitosterol.



(a)



(b)

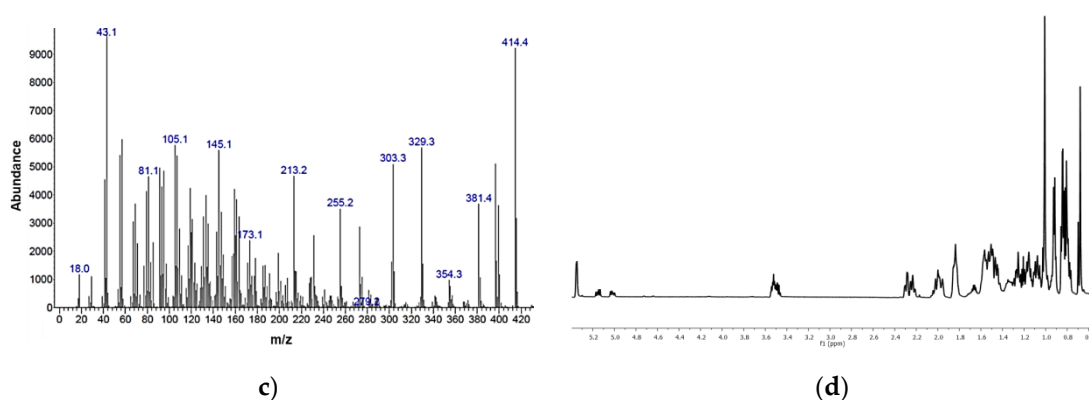


Figure 4. Characterization of anti-HA compounds in C4: **a)** FTIR spectra of C4 showed absorption bands for hydroxyl groups at 3400 cm^{-1} as well as the tensile vibration of C–H sp^3 bonds around 2900 cm^{-1} . The bands found in the fingerprint region could be related to the vibrational modes of methyl, methylene and C = C double bonds. **b)** GC-MS chromatogram of C4 showing three main peaks at retention times of 20.10 min, 20.50 min and 20.90 min that were characterized as campesterol (peak 1), stigmasterol (peak 2) and β -sitosterol (peak 3), with a similar molecular mass from m/z 414. **c)** Chromatogram of the mass fragmentation (GC-MS) of C4, with a fragment at m/z 396, which corresponds to the OH group in position 3; an m/z 255 fragment, formed by the loss of the side chain attached to the sterane; and the fragments resulting from the loss of the side chain by the original sterane without water loss (273 m/z) and with the subsequent loss of 18 units due to the water molecule (OH group of position 3). **d)** ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 600 MHz) of the C4 fraction corresponding to a mixture of steroidal compounds.

The pure standards of these sterols did not show inhibitory activity when evaluated in the HI assay (Figure 3) and at the co-treatment level in the cytopathic effect reduction assay (Table 2), in contrast to C4, which showed inhibitory activity in both assays with $\text{CI}_{50} = 3.125\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $\text{SI} = 62.84$. The cytotoxicity results showed that C4 and the sterols (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol) had CC_{50} values higher than the maximum concentration measured ($>100\text{ }\mu\text{g/mL}$); thus, the SI was very low, suggesting that the activity identified in fraction C4 was likely a synergistic effect produced by the mixture of the three sterols identified.

Table 2. Cytotoxic and antiviral activity of C4, β -sitosterol, stigmasterol and campesterol.

Samples	CC50 $\mu\text{g/mL}$	A/Yucatán/2370/09 MOI:0.01	
		IC50 $\mu\text{g/mL}$	SI CC50/IC50
C4 (fraction)	196.36	3.125	62.84
β -sitosterol	>100	>100	<1
Stigmasterol	>100	>100	<1
Campesterol	>100	>100	<1

CC50—50% cell toxicity concentration; IC50—50% inhibition concentration; SI—selective index, CC50/IC50.

3.4. Inhibition of Virus HA Binding and Infection by Component C4 from the Stem Bark of *E. yucatanensis*

The inhibition of viral HA binding and MDCK cell infection was assessed using a plaque assay. In the presence of 6'SLN, plaque formation was inhibited at 60% after only a 10 min incubation (virus + 6'SLN) and reached 100% inhibition after 30 min. Interestingly, in the presence of $3.125\text{ }\mu\text{g/mL}$ of C4, this fraction's inhibitory activity reached 90% at only 10 min of incubation and further increased to 100% after 30 min (Figure 5). The inhibitory effect of 6'SLN and the C4

fraction remained constant throughout the entire hour of incubation. Since plaque assays are used to quantify influenza virus replication rates, these results suggest that the components in the C4 fraction inhibited viral hemagglutinin binding to host cell sialic acid, thus preventing entry into the cell.

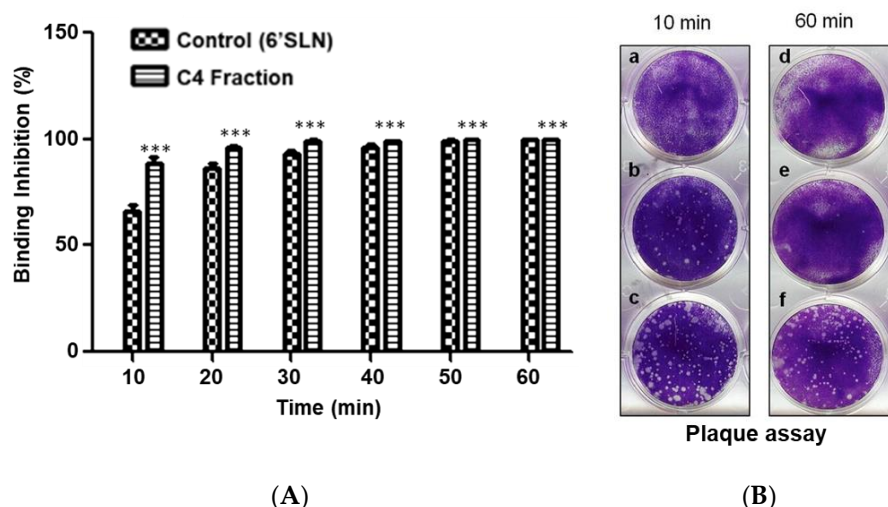


Figure 5. A) Binding inhibition percentage of virus A/México/InDRE797/10 in MDCK cells at MOI= 0.01, co-treated at different times with the C4 fraction, *** $p < 0.001$. B) Plaque assay of C4 fraction (a and d), 6'SLN (b and e) and viral control (c and f).

The effect of the C4 fraction on virus infection and replication was assessed by measuring NP gene copies in a standard curve using qRT-PCR. The results showed that in the presence of 6'SLN, the number of NP copies decreased in the first 10 min with 91.2% inhibition; after 20 min, NP synthesis was 100% inhibited with respect to the viral control. For the C4 sterol mixture, at 10 min of incubation the percentage of inhibition was 84.72%, while it reached 92.85% after 60 min of co-treatment (Table 3). These results suggest that C4 possesses an HA inhibitory activity that prevents binding to the cell receptor with a further effect on the infection and replication capacity of the H1N1 virus.

Table 3. Copy number of the NP gene of virus A/Yucatan/2370/09 co-treated with the C4 fraction or 6'SLN detected using qRT-PCR.

Time (min)	Number of copies		% Inhibition	
	6'SLN	C4	6'SLN	C4
10	685.25	1189.51	91.2	84.72
20	0	1193.4	100	84.67
30	0	1112.74	100	85.7
40	0	1277.16	100	83.59
50	0	1334.84	100	82.85
60	0	556.51	100	92.85
*CV	7780.06			
*CC	0			

*CV—viral control.

*CC—cell control.

4. Discussion

The present study addressed the antiviral activity of *E. yucatanensis* extracts and pure compounds against the AH1N1pdm09 influenza virus and their possible mechanism of action. The influenza virus replication cycle initiates when viral HA binds to cell surface glycoconjugates containing terminal sialic acid residues [27]. Viral HA from human influenza strains preferentially recognizes receptors bound in an α -2,6 conformation (SA α 2,6) to the sugar [28,29]. Our results revealed that the leaf and stem bark fractions were the most effective when added at the co-treatment level, having a significant effect on the inhibition of the binding capacity of viral HA on the MDCK cells' surface.

The bioguided purification of the leaf fractions using an HI assay identified 5-hydroxy-2-(2-hydroxy-3,4,5-trimethoxyphenyl)-7-methoxy-4H(chromen-4-ona) as one of the components present in the active fractions. The results suggested that the activity of the isolated flavone increased when other components were present. Previous research has identified several methoxylated flavones with cytotoxic and anti-HIV-1 activities [30], first reported in leaves of *Gardenia carinata* from the *Rubiaceae* family [31]. There are no previous reports of this compound in members of the *Erythrostemon* group (reclassified into 26 genera); thus, this is the first report for a species (*E. yucatanensis*) in this group [32]. The isolation and identification reported in this study is a phytochemical contribution to the genera *Erythrostemon*.

The plaque assay is one of the most reliable and commonly used methods to titre infectious virus particles. The effectiveness of a compound/extract/fraction in reducing the plaque size or plaque phenotype can be used as an indicator of its antiviral effect. The synthetic 6'SLN [33], used as positive control, inhibited virus plaque formation beginning at 10 min of incubation. At different co-treatment times, plaque formation was inhibited by the C4 fraction from *E. yucatanensis* stem bark as efficiently as observed in the presence of 6'SLN. It seems that blocking the virus from binding to the host cell affected viral infection, which was quantified by the number of NP copies, demonstrating that the inhibition of viral binding to the cell by the stem bark extract had a direct effect on viral replication. These results are relevant considering that there is a lack of drugs targeting viral binding to the host cell; these entry inhibitors might be considered as key targets for the development of new antivirals.

The bioguided purification of stem bark extracts helped us to characterize a mixture of sterols (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol) as the constituents of the C4 fraction that effectively inhibited hemagglutinin in the HI assay and in the cytopathogenic effect reduction assay at the co-treatment level. An individual evaluation of the pure standards of these sterols did not show any antiviral activity, suggesting that the HA inhibitory activity resulted from a synergistic effect among these compounds. The identification of molecules of plant origin and, in particular, the synergistic effect of these molecules should be investigated deeply, as the greater efficiency of combinations of molecules with antiviral effects has been previously reported [34,35]. The most important plant sterols (commonly known as phytosterols) are stigmasterol, campesterol and β -sitosterol [36]. Due to their structural similarity, all three are widely used for various industrial and pharmaceutical applications, for example, as additives in functional foods, humectants, epithelial cell regenerators and cholesterol reducers. The anti-inflammatory effects of this phytosterol mixture have also been demonstrated in mice models. Their inhibition of pro-inflammatory cytokines is the main reason for their pharmacological effect [37].

Phytosterols similar to those reported in the present study have been isolated from extracts of the plants *Celastrus paniculatus* Willd. (*Celastraceae*) and *Aleurites moluccanus*. These extracts have been evaluated for their activity against the Newcastle disease virus (NDV) and avian influenza virus (AIV) H5N1, showing a 90% inhibition for the *A. moluccanus* extract in terms of viral titre reduction as evaluated by the HI assay [38]. However, only minimal research has been carried out on the activity of these compounds against influenza viruses [39].

5. Conclusions

The mixtures of leaf and stem bark extracts from *Erythrostemon yucatanensis* inhibited both the A/Yucatan/2370/09 (H1N1) and A/Mexico/InDRE797/10 (AH1N1) influenza virus strains, mainly by blocking viral entry into the host cells. Bioassay-guided fractionation based on influenza HI activity allowed for the identification of a mixture of β -sitosterol, stigmasterol and campesterol as the antiviral agent in the stem bark extract. This is the first report on the anti-hemagglutinin inhibition properties of bioactive compounds from *E. yucatanensis*. Natural source antivirals of this type are a valuable addition to the ongoing search for new antivirals.

Author Contributions: Conceptualization, T.O.-L., R.B.-A. and G.A.-T.; data curation, T.O.-L. and R.B.-A.; formal analysis, T.O.-L., E.C.-R., L.C.-M., Á.M.-M., F.E.-E. and M.C.-F.; funding acquisition, R.B.-A.; investigation, T.O.-L., L.C.-M., Á.M.-M. and E.C.-R.; methodology, R.B.-A. and G.A.-T.; project administration, R.B.-A.; resources, R.B.-A. and G.A.-T.; supervision, R.B.-A. and G.A.-T.; validation, T.O.-L., R.B.-A. and G.A.-T.; visualization, T.O.-L., R.B.-A. and G.A.-T.; writing—original draft, T.O.-L., R.B.-A. and G.A.-T.; writing—review and editing, T.O.-L., R.B.-A. and G.A.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CONACYT, grant number 27652.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We acknowledge the technical support of Francisco Chí-May for plant collection and José Martín Baas-López for FTIR assistance. We are grateful to CONACYT for supporting Ortiz-López with a grant for her PhD degree at CICY.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

- González Mera, I.F.; González Falconí, D.E.; Morera Córdova, V. Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Bionatura*. **2019**, *4*, 1000–1009.
- Li, Y.; Kong, D.; Fu, Y.; Sussman, M.R.; Wu, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *148*, 80–89.
- Ahad, B.; Shahri, W.; Rasool, H.; Reshi, Z.A.; Rasool, S.; Hussain, T. Medicinal Plants and Herbal Drugs: An Overview. *Med. Aromat. Plants*. **2021**, 1–40.
- Harrington, W.N.; Kackos, C.M.; Webby, R.J. The evolution and future of influenza pandemic preparedness. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 737–749.
- Juárez-Méndez, M.T.; Borges-Argáez, R.; Ayora-Talavera, G.; Escalante-Rebolledo, S.E.; Escalante-Erosa, F.; Cáceres-Farfán, M. *Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-hemagglutinin-neuraminidase activity on influenza AH1N1pdm09 virus. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *36* (10), 2666–2672.
- Karar, M.G.E.; Matei, M.F.; Jaiswal, R.; Illenberger, S.; Kuhnert, N. Neuraminidase inhibition of Dietary chlorogenic acids and derivatives—potential antivirals from dietary sources. *Food Funct.* **2016**, *7*, 2052–2059.
- Ginex, T.; Luque, F.J. Searching for Effective Antiviral Small Molecules against Influenza A Virus: A Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2021**, *31*, 53–66.
- Wohlbald, T.J.; Krammer, F. In the shadow of hemagglutinin: A growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses*, **2014**, *6*, 2465–2494.
- Rosado-Aguilar, J.A.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Borges-Argáez, R.; Arjona-Cambranes, K.A. Acaricidal Activity of *Havardia albicans* and *Caesalpinia gaumeri* Methanolic Leaf Extracts on *Rhipicephalus microplus* and Its Toxicity to Laboratory Animals. *Exp. Appl. Acarol.* **2017**, *71*, 345–354.
- Meiyanto, E.; Lestari, B.; Sugiyanto, R.N.; Jenie, R.I.; Utomo, R.Y.; Sasmito, E.; Murwanti, R. *Caesalpinia sappan* L. heartwood ethanolic extract exerts genotoxic inhibitory and cytotoxic effects. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **2019**, *19*, 27–36.

- Liu, A.L.; Shu, S.H.; Qin, H.L.; Lee, S.M.Y.; Wang, Y.T.; Du, G.H. In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Med.* **2009**, *75*, 337–339.
- Kumar, R.; Patel, D.K.; Prasad, S.K.; Sairam, K.; Hemalatha, S. Antidiabetic activity of alcoholic root extract of *Caesalpinia digyna* in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, S934–S940.
- Rao, Y.K.; Fang, S.H.; Tzeng, Y.M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 249–253.
- Chethana, K.R.; Sasidhar, B.S.; Naika, M.; Keri, R.S. Phytochemical composition of *Caesalpinia crista* extract as potential source for inhibiting cholinesterase and β -amyloid aggregation: Significance to Alzheimer's disease. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2018**, *8*, 500.
- Wu, S.; Wu, Z.; Fu, C.; Wu, C.; Yuan, J.; Xian, X.; Gao, H. Simultaneous identification and analysis of cassane diterpenoids in *Caesalpinia minax* Hance by high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 4000–4013.
- Liu, A.L.; Shu, S.H.; Qin, H.L.; Lee, S.M.Y.; Wang, Y.T.; Du, G.H. In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Med.*, **2009**, *75*, 337–339. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1112208>.
- Gagnon, E.; Bruneau, A.; Hughes, C.E.; De Queiroz, L.P.; Lewis, G.P. A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). *PhytoKeys*. **2016**, *71*, 1–160.
- Zanin, J.L.B.; De Carvalho, B.A.; Salles Martineli, P.; Dos Santos, M.H.; Lago, J.H.G.; Sartorelli, P.; Viegas, C., Jr.; Soares, M.G. The genus *Caesalpinia* L. (*Caesalpinaceae*): Phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*, **2012**, *17*, 7887–7902.
- Quiroz-Carranza, J.; Orellana, R. Use and management of firewood in dwellings of six localities from Yucatan, Mexico. *Madera y bosques*, **2010**, *16*, 47–67.
- Méndez-González, M.E.; Torres-Avilez, W.M.; Dorantes-Euán, A.; Durán-García, R. Jardines medicinales en Yucatán: Una alternativa para la conservación de la flora medicinal de los mayas. *Rev. Fitotec. Mex.* **2014**, *37*, 97–106.
- Borges-Argáez, R.; Chan-Balan, R.; Cetina-Montejo, L.; Ayora-Talavera, G.; Sansores-Peraza, P.; Gómez-Carballo, J.; Cáceres-Farfán, M. In vitro evaluation of anthraquinones from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) roots and several derivatives against strains of influenza virus. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *132*, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.056>.
- Cetina-Montejo, L.; Ayora-Talavera, G.; Borges-Argáez, R. Zeylanone epoxide isolated from *Diospyros anisandra* stem bark inhibits influenza virus in vitro. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 1543–1552. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04223-y>.
- Borges-Argáez, R.; Peña-Rodríguez, L.M.; Waterman, P.G. Flavonoids from two *Lonchocarpus* species of the Yucatan Peninsula. *Phytochemistry*. **2002**, *60*, 533–540.
- Ayora-Talavera, G.; Cetina-Montejo, L.; Matos-Patrón, A.; Romero-Beltrán, L. Hemagglutinin variants of influenza A (H1N1) pdm09 virus with reduced affinity for sialic acid receptors. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 1207–1211.
- Hoffmann, E.; Neumann, G.; Kawaoka, Y.; Hobom, G.; Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 6108–6113.
- Hoffmann, E.; Stech, J.; Guan, Y.; Webster, R.G.; Perez, D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 2275–2289.
- De Graaf, M.; Fouchier, R.A. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* **2014**, *33*, 823–841. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387442>.
- Dou, D.; Revol, R.; Östbye, H.; Wang, H.; Daniels, R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1581.
- Heida, R.; Bhide, Y.C.; Gasbarri, M.; Kocabiyik, Ö.; Stellacci, F.; Huckriede, A.L.W.; Hinrichs, W.L.J.; Frijlink, H.W. Advances in the development of entry inhibitors for sialic-acid-targeting viruses. *Drug Discov. Today*, **2021**, *26*, 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.009>.
- Tuchinda, P.; Saijai, A.; Pohmakotr, M.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Napaswat, C.; Santisuk, T.; Reutrakul, V. Anti-HIV-1 cycloartanes from leaves and twigs of *Gardenia thailandica*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 366–370. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818951>.
- Kongkum, N.; Tuchinda, P.; Pohmakotr, M.; Reutrakul, V.; Piyachaturawat, P.; Jariyawat, S.; Suksen, K.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Napaswat, C. DNA topoisomerase II α inhibitory and anti-HIV-1 flavones from leaves and twigs of *Gardenia carinata*. *Fitoterapia*. **2012**, *83*, 368–372.

-
-
- Gagnon, E.; Bruneau, A.; Hughes, C.E.; De Queiroz, L.P.; Lewis, G.P. A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (*Leguminosae*). *PhytoKeys*. **2016**, *71*: 1–160.
- Ayora-Talavera, G.; Cetina-Montejo, L.; Matos-Patrón, A.; Romero-Beltrán, L. Hemagglutinin variants of influenza A (H1N1) pdm09 virus with reduced affinity for sialic acid receptors. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 1207–1211.
- Prasad, A.; Muthamilarasan, M.; Prasad, M. Synergistic antiviral effects against SARS-CoV-2 by plant-based molecules. *Plant Cell Re.* **2020**, *39*, 1109–1114.
- Tan, Y.L.; Tan, K.S.W.; Chu, J.J.H.; Chow, V.T. Combination Treatment with Remdesivir and Ivermectin Exerts Highly Synergistic and Potent Antiviral Activity Against Murine Coronavirus Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 700502.
- Pineda Rodríguez, M.; Hung Llamas, B.R.; García Delgado, B. Fitosteroles y Patentes: Sus Aplicaciones en la Industria Farmaceutica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, **2005**, *36*. [accessed: July 07, 2022]. ISSN: 0253-5688. Available on: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525018>
- Villa-De la Torre, F.; Kinscherf, R.; Bonaterra, G.; Arana-Argaez, V.E.; Méndez-González, M.; Cáceres-Farfán, M.; Borges-Argáez, R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Critonia aromatisans* leaves: Downregulation of pro-inflammatory cytokines. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *190*, 174–182.
- Ashrafi, S.; Rahman, M.; Ahmed, P.; Alam, S.; Hossain, M. Prospective Asian plants with corroborated antiviral potentials: Position standing in recent years. *Beni-Suef Univ J. Basic Appl Sci.* **2022**, *11*, 1–26.
- Chang, Te-Hung.; Segovia, S.; Sabbah, A.; Mgbemena, V.; Bose, S. Cholesterol-rich lipid rafts are required for release of infectious human respiratory syncytial virus particles. *Virology*. **2012**, *422*, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.029>.