



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
EPÓXIDO DE ZEYLANONA Y DERIVADOS

Tesis que presenta

IVAN HUMBERTO CHAN ZAPATA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2023



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Ivan Humberto Chan Zapata** titulado "**Evaluación de la actividad antiviral de epóxido de zeylanona y derivados**", fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de Biotecnología de Productos Naturales, en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez**, dentro de la opción en Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de noviembre de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, 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 Federal de Protección a 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 se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: 

Nombre: Ivan Humberto Chan Zapata

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 titulado “Aislamiento y evaluación antiviral de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* y *Caesalpinia yucatanensis*” (proyecto con clave A1-S-27652) bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Borges Argáez y Dra. Guadalupe Ayora Talavera por darme la oportunidad de cumplir una meta en sus grupos de investigación y por depositar su sabiduría y tiempo en este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Luisa López Ochoa y Dr. Rubén Marrero Carballo, por sus amables consejos, sugerencias y apuntes que enriquecieron este trabajo.

A los miembros del honorable sínodo, Dra. Blondy Canto Canché, Dra. Tania Coral Martínez y Dr. Víctor Aguilar Hernández, por prestar parte de su invaluable tiempo y conocimientos en las revisiones de este trabajo.

A la M. en C. Fabiola Escalante Erosa y M. en C. Ligia Brito Argáez por su apoyo técnico en la realización de los análisis de GC-MS y UHPLC-FTMS.

A mis compañeros de laboratorio y amigos.

A mí amada familia.

Al CONAHCYT por la beca otorgada (número de beca: 787552).

LISTA DE PRODUCTOS GENERADOS

- Artículo de divulgación: Borges-Argáez, R., Vera-Ku, B.M., Juárez-Méndez, M.T., Chan-Zapata, I., Jiménez-Alcalá, G., Chi May, F., Carrillo Sánchez, L.E. (2021). El *K'aakalché* (*Diospyros anisandra*), una especie con alto valor farmacéutico. *Desde el Herbario CICY*, 13, 152-155.
- Artículo de revisión: Chan-Zapata, I., Borges-Argáez, R., Ayora-Talavera, G. (2023). Quinones as promising compounds against respiratory viruses: A review. *Molecules*, 28, 4, 1981. <https://doi.org/10.3390/molecules28041981>.
- Artículo de investigación: Chan-Zapata, I., Ayora-Talavera, G., Borges-Argáez, R., Cetina-Montejo, L., Escalante-Erosa, F., Aguilar-Hernández, V., Brito-Argáez, L. Synthesis, cytotoxicity, and anti-influenza evaluation of zeylanone epoxide and derivatives. En revisión en *Journal of Asian Natural Products Research*.

DEDICATORIA

A todos aquellos que persiguen sus sueños, nunca se den por vencidos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. VIRUS DE INFLUENZA	3
1.2. ESTRUCTURA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B	4
1.3. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B	6
1.4. CICLO DE REPLICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B	8
1.5. EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B.....	13
1.6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B	14
1.7. PLANTAS MEDICINALES Y PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B	17
1.8. SÍNTESIS BIOMIMÉTICA DE PRODUCTOS NATURALES.....	20
1.9. PRODUCTOS NATURALES OBTENIDOS POR SÍNTESIS BIOMIMÉTICA CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B	22
1.10. GENERALIDADES SOBRE LAS 1,4-NAFTOQUINONAS	24
1.11. SÍNTESIS BIOMIMÉTICA DE NAFTOQUINONAS	27
1.12. NAFTOQUINONAS CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B	31
1.13. GENERALIDADES SOBRE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (1) Y ZEYLANONA (2).....	35
1.14. SÍNTESIS BIOMIMÉTICA DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (1) Y DERIVADOS.....	37
1.15. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (1) Y ZEYLANONA (2).....	42

1.16. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (1).....	43
1.17. DERIVADOS HIDROXILADOS DE PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B	45
JUSTIFICACIÓN	47
HIPÓTESIS.....	49
OBJETIVO GENERAL	50
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	51
 CAPÍTULO II	 52
SÍNTESIS BIOMIMÉTICA Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA Y DERIVADOS	52
2.1. INTRODUCCIÓN	52
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
2.2.1. Materiales y equipos empleados en la síntesis de los compuestos	53
2.2.2. Materiales y equipos empleados en la caracterización de los compuestos	54
2.2.3. Síntesis biomimética de epóxido de zeylanona (1) y derivados (2 y 3)	55
2.2.3.1. Síntesis de 5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (1b).....	55
2.2.3.2. Síntesis de (±)-12,12a-dihidro-1,7-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5 <i>H</i> - dibenzo[<i>b,h</i>]fluoren-5,6,11,13(5a <i>H</i>)-tetrona (1c)	56
2.2.3.3. Síntesis de (±)-epóxido de zeylanona (1).....	57
2.2.3.4. Síntesis de (±)-zeylanona (2)	59

2.2.3.5. Síntesis de ramentona (3b).....	60
2.2.3.6. Síntesis de 5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (3c).....	61
2.2.3.7. Síntesis de (±)-12,12a-dihidro-1,4,7,10-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,h</i>]fluoren-5,6,11,13(5a <i>H</i>)-tetrona (3d).....	62
2.2.3.8. Síntesis de derivado hidroxilado (±)-3	63
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
2.3.1. Síntesis de 5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (1b).....	64
2.3.2. Síntesis de (±)-12,12a-dihidro-1,7-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,h</i>]fluoren-5,6,11,13(5a <i>H</i>)-tetrona (1c)	68
2.3.3. Síntesis de (±)-epóxido de zeylanona (1).....	71
2.3.4. Síntesis de (±)-zeylanona (2)	76
2.3.5. Síntesis de ramentona (3b).....	80
2.3.6. Síntesis de 5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (3c).....	84
2.3.7. Síntesis de (±)-12,12a-dihidro-1,4,7,10-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,h</i>]fluoren-5,6,11,13(5a <i>H</i>)-tetrona (3d)	88
2.3.8. Síntesis de derivado hidroxilado (±)-3	91
 CAPÍTULO III.....	 99
ACTIVIDAD ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA Y DERIVADOS	99
3.1. INTRODUCCIÓN	99
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
3.2.1. Materiales y equipos empleados en los ensayos biológicos.....	100

3.2.2. Compuestos a evaluar	101
3.2.3. Línea celular y virus de influenza	101
3.2.4. Ensayo de citotoxicidad	102
3.2.5. Ensayo de reducción del efecto citopático	103
3.2.6. Análisis estadístico	103
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	104
3.3.1. Efecto citotóxico de las naftoquinonas sintéticas	104
3.3.2. Efecto de las naftoquinonas sintéticas en la reducción del efecto citopático	110
 CAPÍTULO IV	 119
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	119
4.1. DISCUSIÓN	119
4.2. CONCLUSIONES GENERALES	122
4.3. PERSPECTIVAS	123
BIBLIOGRAFÍA	124
 ANEXO I: ARTÍCULO DE REVISIÓN	 141
QUINONES AS PROMISING COMPOUNDS AGAINST RESPIRATORY VIRUSES: A REVIEW	141
1. INTRODUCTION	141
2. RESPIRATORY VIRUSES	142

2.1. Parainfluenza virus (PIV), human metapneumovirus (HMPV), and respiratory syncytial virus (RSV)	142
2.2. Adenovirus (AdV).....	143
2.3. Rhinovirus (RV).....	143
2.4. Bocavirus (BoV)	144
2.5. Influenza virus.....	144
2.6. Coronavirus (CoV)	145
3. PHARMACOLOGICAL TREATMENTS FOR RESPIRATORY VIRUS INFECTIONS	146
4. QUINONES.....	149
5. QUINONES AND RESPIRATORY VIRUSES	151
5.1. Quinones with activity against influenza viruses	157
5.2. Quinones with activity against CoVs.....	168
5.3. Quinones with activity against other respiratory viruses	173
6. FUTURE TRENDS.....	174
7. CONCLUSIONS	175
REFERENCES	176

ANEXO II: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	194
---	-----

SYNTHESIS, CYTOTOXICITY, AND ANTI-INFLUENZA EVALUATION OF ZEYLANONE EPOXIDE AND DERIVATIVES.....	194
--	-----

1. INTRODUCTION	195
-----------------------	-----

2. RESULTS AND DISCUSSION.....	195
--------------------------------	-----

2.1. Chemical synthesis of naphthoquinones.....	195
2.2. Cytotoxicity and antiviral activity.....	197
3. EXPERIMENTAL	200
REFERENCES	200
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	202

LISTADO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y FÓRMULAS QUÍMICAS

Algunas de las abreviaturas, acrónimos y siglas se emplearon a lo largo de este documento considerando sus respectivos vocablos del idioma inglés, con la finalidad de facilitar futuras búsquedas relacionadas con sus términos correspondientes, así como también debido a que dichas abreviaturas, acrónimos y siglas se utilizan de manera general en la literatura en español.

%VC	Porcentaje de viabilidad celular
%REC	Porcentaje de reducción del efecto citopático
<i>p</i> -TsOH·H ₂ O	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico monohidratado
3CL ^{pro}	Proteasa similar a 3-quimotripsina
4HBA	Ácido 4-hidroxibenzoico
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AlCl ₃	Cloruro de aluminio
An	Acetona
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN complementario
ARNm	ARN mensajero
ARNv	ARN viral
AS	Ácido siálico
BOMO	Benciloximetil éter
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
CIR	Centro de Investigaciones Regionales
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A

CRM1	Región cromosómica 1
DCC	N, N'-d ciclohexilcarbodiimida
DE	Desviación estándar
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC ₅₀	Concentración efectiva media
ERC	Compartimiento de reciclaje endosómico
ERO	Especie reactiva de oxígeno
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FTMS	Espectrómetro de masas por transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GPP	Geranil difosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HA	Hemaglutinina
HCl	Ácido clorhídrico
He	Helio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HESI-II	Sonda de ionización por electrospray
HGA	Homogentisato
HO·	Radical hidroxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hx	Hexano
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IMPα	Importina α
IMPβ	Importina β
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

KI	Yoduro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
LiCl	Cloruro de litio
M ^{pro}	Proteasa principal
M1	Proteína matriz 1
M2	Proteína de canal iónico
M	Segmento matriz
MDCK	Células de riñón canino Madin-Darby
MEC	Concentración efectiva mínima
MeOH	Metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MOI	Multiplicidad de infección
MOMCI	Cloruro de metoximetilo
MOMO	Metoximetil éter
MS	Espectrometría de masas
MTMO	Metiltiometil éter
MVA	Ácido mevalónico
N ₂	Nitrógeno molecular
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NA	Neuraminidasa
NaCl	Cloruro de sodio
NaH	Hidruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NEP	Proteína de exportación nuclear
NES	Secuencias de exportación nuclear
NLS	Secuencias de localización nuclear
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
NP	Nucleoproteína
NPC	Complejo del poro nuclear
NS1	Proteína no estructural 1
NS3	Proteína no estructural 3
NS	Segmento no estructural
O ₂	Oxígeno molecular

O ₂ ^{·-}	Radical anión superóxido
OSB	<i>o</i> -succinilbenzoato
OTBS	<i>tert</i> -butildimetilsilil éter
ppm	Partes por millón
PA	Polimerasa ácida
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
PBS	Solución tampón de fosfatos salinos
PFU/mL	Unidades formadoras de placas por mL
PKS	Policétido sintasa
PL ^{pro}	Proteasa similar a papaína
rNTP	Ribonucleósidos trifosfato
RanGTP	Ran guanosín trifosfato
RBS	Sitio de unión al receptor
RE	Retículo endoplásmico
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNPc	Ribonucleoproteína complementaria
RNPv	Ribonucleoproteína viral
SARS-CoV-2	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
SRP	Partículas de reconocimiento de señales
T _r	Tiempo de retención
TC ₅₀	Concentración tóxica media
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona
UADY	Universidad Autónoma de Yucatán
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de los virus de influenza A.....	6
Figura 1.2. Entrada de los virus de influenza hacia la célula.	9
Figura 1.3. Transcripción y replicación de ARNv.	10
Figura 1.4. Ensamblaje y transporte de RNPv.....	11
Figura 1.5. Liberación de los virus de influenza.....	12
Figura 1.6. Mecanismos de evasión de los virus de influenza.	14
Figura 1.7. Metabolitos secundarios con actividad contra virus de influenza.	19
Figura 1.8. Productos naturales derivados de plantas y aprobados para uso terapéutico.	21
Figura 1.9. Metabolitos secundarios obtenidos por síntesis biomimética y con actividad contra virus de influenza.	24
Figura 1.10. Estructura química de 1,4-naftoquinona.	25
Figura 1.11. Reacciones químicas implicadas en la ruta de biosíntesis propuesta para naftoquinonas monoméricas.	26
Figura 1.12. Reacciones químicas implicadas en la ruta de biosíntesis propuesta para las naftoquinonas diméricas de interés 1 (epóxido de zeylanona) y 2 (zeylanona).	27
Figura 1.13. Naftoquinonas monoméricas sintetizadas por medio de reacciones de doble acilación de Friedel-Crafts.....	29
Figura 1.14. Naftoquinonas diméricas obtenidas a través de adiciones de Michael secuenciales.	31
Figura 1.15. Naftoquinonas aisladas de fuentes vegetales con actividad contra virus de influenza.	33
Figura 1.16. Naftoquinonas sintéticas con actividad contra virus de influenza.	35

Figura 1.17. Naftoquinonas presentes en <i>D. anisandra</i>	36
Figura 1.18. Configuraciones relativas de 1 (epóxido de zeylanona) y 2 (zeylanona).....	37
Figura 1.19. Síntesis biomimética de (±)-1 (epóxido de zeylanona) y (±)-2 (zeylanona) a partir de 1a (plumbagina).....	38
Figura 1.20. Síntesis de compuesto (±)-69	39
Figura 1.21. Doble acilación de Friedel-Crafts en la síntesis de 3b (ramentona).....	40
Figura 1.22. Adiciones de Michael en la síntesis de (±)-1 (epóxido de zeylanona), (±)-2 (zeylanona) y el derivado (±)-3	41
Figura 1.23. Compuesto (±)-1c	44
Figura 1.24. Metabolitos secundarios y sus derivados hidroxilados con actividad antiviral.....	46
Figura 1.25. Esquema experimental planteado.....	51
Figura 2.1. Protección del grupo hidroxilo de 1a (plumbagina).....	55
Figura 2.2. Reacción de dimerización para la síntesis de (±)-1c	56
Figura 2.3. Síntesis de (±)-1 (epóxido de zeylanona).....	58
Figura 2.4. Síntesis de (±)-2 (zeylanona).....	59
Figura 2.5. Síntesis de 3b (ramentona).....	60
Figura 2.6. Protección de grupos hidroxilo de 3b (ramentona).....	61
Figura 2.7. Reacción de dimerización para la síntesis de (±)-3d	62
Figura 2.8. Síntesis de (±)-3	63
Figura 2.9. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) de 1b (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona).....	66
Figura 2.10. Espectro de RMN- ¹ H de 1b (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	67

Figura 2.11. Espectro de RMN- ¹ H de (±)-1c obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	70
Figura 2.12. Cromatograma (A) , espectro de masas con ion molecular [M+H] ⁺ y aductos (B) y espectro de masas de ion molecular [M+H] ⁺ (C) de (±)-1 (epóxido de zeylanona).	73
Figura 2.13. Espectro de RMN- ¹ H de (±)-1 (epóxido de zeylanona) obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	75
Figura 2.14. Cromatograma (A) , espectro de masas con ion molecular [M+H] ⁺ y aductos (B) y espectro de masas de ion molecular [M+H] ⁺ (C) de (±)-2 (zeylanona).	78
Figura 2.15. Espectro de RMN- ¹ H de (±)-2 (zeylanona) obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	79
Figura 2.16. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) de 3b (rarentona).	82
Figura 2.17. Espectro de RMN- ¹ H de 3b (rarentona) obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	83
Figura 2.18. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) de 3c (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona).	85
Figura 2.19. Espectro de RMN- ¹ H de 3c (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	86
Figura 2.20. Espectro de RMN- ¹³ C de 3c (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) obtenido a 151 MHz en CDCl ₃	87
Figura 2.21. Espectro de RMN- ¹ H de (±)-3d obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	90
Figura 2.22. Cromatograma (A) , espectro de masas con ion molecular [M+H] ⁺ y aducto (B) y espectro de masas de ion molecular [M+H] ⁺ (C) de (±)-3	93
Figura 2.23. Espectro de RMN- ¹ H de (±)-3 obtenido a 600 MHz en CDCl ₃	94
Figura 2.24. Espectro de RMN- ¹³ C de (±)-3 obtenido a 151 MHz en CDCl ₃	95
Figura 2.25. Esquema general de la síntesis de (±)-1 (epóxido de zeylanona) y (±)-2 (zeylanona).	97
Figura 2.26. Esquema general de la síntesis de (±)-3 (derivado hidroxilado).	98

Figura 3.1. Curvas de citotoxicidad y sus respectivos valores de concentración citotóxica media (CC ₅₀) correspondientes a (±)-1 (epóxido de zeylanona), (±)-2 (zeylanona) y (±)-3 (derivado).	104
Figura 3.2. Porcentajes de viabilidad celular (%VC) correspondientes a los tratamientos con (±)-1 (epóxido de zeylanona), (±)-2 (zeylanona) y (±)-3 (derivado).	105
Figura 3.3. Naftoquinonas monoméricas y diméricas con toxicidad en células MDCK.	107
Figura 3.4. Mezclas racémicas de naftoquinonas con estudios de citotoxicidad reportados. ...	108
Figura 3.5. Mecanismos de citotoxicidad de las naftoquinonas.	109
Figura 3.6. Curvas de actividad antiviral y sus respectivos valores de concentración inhibitoria media (IC ₅₀) correspondientes a (±)-1 (epóxido de zeylanona) (A), (±)-2 (zeylanona) (B) y (±)-3 (derivado) (C) en células MDCK infectadas con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001.	111
Figura 3.7. Porcentajes de reducción del efecto citopático (%REC) correspondientes a los tratamientos con (±)-1 (epóxido de zeylanona), (±)-2 (zeylanona) y (±)-3 (derivado) en células MDCK infectadas con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm (A), A/Sydney/5/97 (H3N2) (B) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) (C) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001.	113
Figura 3.8. Mezclas racémicas de naftoquinonas con poca o nula actividad contra virus de influenza.	115
Figura 3.9. Naftoquinonas sin actividad contra virus de influenza.	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Datos de RMN- ¹ H obtenidos para el compuesto 1b (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) y su comparación con los valores reportados por Maruo <i>et al.</i> (2013).	68
Tabla 2.2. Datos de RMN- ¹ H obtenidos para el compuesto (±)-1c y su comparación con los valores reportados por Maruo <i>et al.</i> (2013).	71
Tabla 2.3. Datos de RMN- ¹ H obtenidos para el compuesto (±)-1 (epóxido de zeylanona) y su comparación con los valores reportados por Uc-Cachón <i>et al.</i> (2013).	76
Tabla 2.4. Datos de RMN- ¹ H obtenidos para el compuesto (±)-2 (zeylanona) y su comparación con los valores reportados por Gu <i>et al.</i> (2004).....	80
Tabla 2.5. Datos de RMN- ¹ H obtenidos para el compuesto 3b (ramentona) y su comparación con los valores reportados por Schroeder <i>et al.</i> (2016).....	84
Tabla 2.6. Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C obtenidos para el compuesto 3c (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona).	88
Tabla 2.7. Datos de RMN- ¹ H obtenidos para el compuesto (±)-3d	91
Tabla 2.8. Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C obtenidos para el compuesto (±)-3	96
Tabla 3.1. Efecto citotóxico (CC ₅₀ y %VC) de (±)-1 (epóxido de zeylanona), (±)-2 (zeylanona) y (±)-3 (derivado).	110

RESUMEN

El epóxido de zeylanona (**1**) es una naftoquinona dimérica presente en la corteza del tallo de *Diospyros anisandra* y cuya estructura fue descrita por primera vez por el grupo de trabajo de la Dra. Rocío Borges Argáez en el año 2013. Este compuesto ha demostrado inhibir la replicación de virus de influenza A y B, patógenos que representan un problema de salud pública global. Considerando que se ha reportado un esquema de síntesis biomimética para **1** y su análogo zeylanona (**2**), en esta investigación se planteó como objetivo determinar la citotoxicidad y actividad contra virus de influenza de **(±)-1**, **(±)-2** y un derivado hidroxilado **(±)-3**. El primer paso en la síntesis de **(±)-3** implicó la generación de la naftoquinona ramentona mediante una reacción de doble acilación de Friedel-Crafts entre 1,4-dimetoxibenceno y anhídrido 2-metilmaleico. Posteriormente, los dímeros fueron sintetizados después de reacciones de protección, dimerización (adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares secuenciales) y desprotección partiendo de las naftoquinonas monoméricas plumbagina y ramentona. Los productos de interés **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** se obtuvieron con rendimientos de reacción globales de 1.4% (tres pasos), 3% (cuatro pasos) y 0.1% (cuatro pasos), respectivamente. Luego se determinó su toxicidad en células MDCK, observándose citotoxicidad moderada en **(±)-1** ($CC_{50} = 33.23 \mu M$) y **(±)-2** ($CC_{50} = 19.37 \mu M$), así como citotoxicidad elevada en **(±)-3** ($CC_{50} = 7.73 \mu M$), lo que coincidió con la evidencia que indica que las quinonas racémicas son moléculas que presentan ciertos niveles de toxicidad celular. Finalmente, los ensayos de actividad antiviral con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) demostraron que **(±)-2** ($IC_{50} > 12.5 \mu M$) y **(±)-3** ($IC_{50} > 6.25 \mu M$) no inhibieron la replicación viral, mientras que **(±)-1** inhibió la replicación de estos virus a la máxima concentración evaluada ($IC_{50} > 12.5 \mu M$). A pesar de que los dímeros mostraron poca o nula actividad antiviral, se puede concluir que los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento sobre las mezclas racémicas de naftoquinonas y su papel como potenciales compuestos bioactivos contra la influenza, a reserva de estudios pertinentes a futuro.

ABSTRACT

Zeylanone epoxide (**1**) is a dimeric naphthoquinone from the stem bark of *Diospyros anisandra* and its structure was described for the first time by the research group of Dr. Rocío Borges-Argáez in 2013. This compound inhibited the replication of influenza A and B viruses, which are pathogens that represent a global public health problem. Considering that a biomimetic synthesis scheme has been reported for **1** and its analog zeylanone (**2**), the objective of this research was to determine the cytotoxicity and activity against influenza viruses of (**±**)-**1**, (**±**)-**2**, and a hydroxylated derivative (**±**)-**3**. The first step in the synthesis of (**±**)-**3** involved the generation of the naphthoquinone ramentone through a double Friedel-Crafts acylation between 1,4-dimethoxybenzene and 2-methylmaleic anhydride. Subsequently, the dimers were synthesized after protection reactions, dimerization (sequential intermolecular and intramolecular Michael additions), and deprotection starting from the monomeric naphthoquinones plumbagin and ramentone. The products (**±**)-**1**, (**±**)-**2**, and (**±**)-**3** were obtained with overall yields of 1.4% (three steps), 3% (four steps), and 0.1% (four steps), respectively. The toxicity was determined in MDCK cells, observing moderate cytotoxicity in (**±**)-**1** ($CC_{50} = 33.23 \mu\text{M}$) and (**±**)-**2** ($CC_{50} = 19.37 \mu\text{M}$), as well as high cytotoxicity in (**±**)-**3** ($CC_{50} = 7.73 \mu\text{M}$), which is in accordance with the evidence indicating that racemic quinones are molecules that exert certain levels of cellular toxicity. Finally, antiviral activity assays with influenza viruses A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2), and B/Yucatan/286/10 (Victoria lineage) demonstrated that (**±**)-**2** ($IC_{50} > 12.5 \mu\text{M}$) and (**±**)-**3** ($IC_{50} > 6.25 \mu\text{M}$) did not inhibit viral replication, while (**±**)-**1** inhibited the replication of these viruses at the maximum concentration evaluated ($IC_{50} > 12.5 \mu\text{M}$). Although the dimers showed little or no antiviral activity, it can be concluded that the results obtained in this work contribute to the knowledge about racemic mixtures of naphthoquinones and their role as potential bioactive compounds against influenza, subject to relevant future studies.

INTRODUCCIÓN

Los virus de influenza son patógenos que tienen un genoma de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de sentido negativo segmentado (Javanian *et al.*, 2021). Típicamente, estos virus ocasionan epidemias estacionales anuales. Sin embargo, han representado un problema de salud global ya que algunas cepas han producido brotes pandémicos. La más reciente fue en el año 2009 y tuvo lugar cuando un virus de influenza A H1N1 de origen porcino infectó a la población humana (Li y Cao, 2017).

El tratamiento convencional contra la influenza comprende los fármacos antivirales y aunque han mostrado ser efectivos, también generan resistencia viral (Zaraket *et al.*, 2021). Por lo tanto, los productos naturales aislados de plantas han aparecido como una alternativa fundamental en el desarrollo de nuevas terapias contra la influenza (Zhang *et al.*, 2020). No obstante, el uso de especies vegetales como fuente de compuestos bioactivos ha presentado dificultades importantes, por lo que la síntesis biomimética (o bioinspirada) está siendo empleada para la formación de numerosos productos naturales (Atanasov *et al.*, 2015).

Desde sus inicios, el área de la síntesis biomimética ha crecido hasta convertirse en parte esencial de la química orgánica. La síntesis biomimética implica la síntesis de productos naturales basándose en el conocimiento de los pasos de una ruta biosintética propuesta o establecida y dependiendo de la ruta elegida, se pueden obtener estructuras complejas, como las naftoquinonas (Bulger *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la estructura 1,4-naftoquinona es común en diversos metabolitos con actividad antiviral (Dar *et al.*, 2021). En este sentido, se ha descrito que el epóxido de zeylanona (**1**), una naftoquinona dimérica aislada de la corteza del tallo de *Diospyros anisandra*, inhibe la replicación de los virus de influenza y bloquea el transporte extranuclear de la nucleoproteína (NP) viral, ocasionando un decremento en el número de partículas virales (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). Además, se ha reportado que **1** y su análogo zeylanona (**2**) pueden ser producidos por medio de síntesis biomimética, como (**±**)-**1** y (**±**)-**2** (Maruo *et al.*, 2013). Para el compuesto **1**, se ha evidenciado que el derivado (**±**)-**1c** de esta molécula (con grupos hidroxilo protegidos) no presenta el efecto antiviral (Cetina Montejo, 2016). Por otra parte, se ha observado que la actividad antiviral de algunos metabolitos (incluyendo quinonas) es dependiente del número de grupos hidroxilo en sus estructuras (Guo *et al.*, 2022).

Entonces, considerando que hasta el momento no hay estudios que sustenten el efecto antiviral de **2** y que las propiedades de **1** dependerían de sus grupos hidroxilo, se ha planteado como objetivo del presente trabajo evaluar la actividad de **(±)-1**, **(±)-2** y el derivado **(±)-3** contra virus de influenza A y B. Las estructuras se obtuvieron por síntesis biomimética, siguiendo las metodologías descritas por Dessolin *et al.* (2001) y Schroeder *et al.* (2016) para la generación del intermediario ramentona (**3b**) por medio de una doble acilación de Friedel-Crafts entre 1,4-dimetoxibenceno (**3a**) y anhídrido 2-metilmaleico (**4**) con cloruro de aluminio (AlCl₃). Luego, los compuestos **3b** y plumbagina (**1a**) se utilizaron como materiales de partida para la síntesis de las naftoquinonas diméricas de interés, de acuerdo a lo reportado por Maruo *et al.* (2013) y con mecanismos que consistieron en una doble acilación de Friedel-Crafts y adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares. Posteriormente, la actividad citotóxica de las moléculas fue determinada en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y la actividad antiviral fue evaluada en pruebas de reducción del efecto citopático con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. VIRUS DE INFLUENZA

Los virus de influenza son un grupo de virus envueltos que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y contienen un genoma tipo ARN monocatenario de sentido negativo segmentado (Javanian *et al.*, 2021). En el ser humano, estos virus se transmiten por vía respiratoria y se replican principalmente en las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio. Su replicación alcanza el punto máximo a las 48 h después de entrar al organismo y disminuye lentamente a partir de entonces, con una mínima eliminación después de 6 a 8 días (Liang, 2023). Las enfermedades respiratorias infecciosas ocasionadas por estos virus son conocidas como influenza y su sintomatología va desde una infección leve del tracto respiratorio superior (caracterizada por fiebre, tos, dolor de garganta, secreción nasal, dolor de cabeza, dolor muscular y fatiga), hasta neumonía severa e incluso letal debida al propio virus o a una infección bacteriana secundaria del tracto respiratorio inferior. En algunos casos, la influenza puede originar una amplia variedad de complicaciones no respiratorias, afectando al sistema nervioso central, corazón y otros órganos (Krammer *et al.*, 2018).

La familia *Orthomyxoviridae* incluye cuatro géneros de virus de influenza, denominados A, B, C y D. A su vez, cada género está constituido por diversas cepas, cuyos nombres completos son asignados empleando el género, el hospedero de origen (si el hospedero fue un ser humano, se omite en el nombre; si el hospedero fue un animal, se coloca su nombre común en lugar del nombre científico; si el virus fue aislado de un material no vivo, como el agua de un lago, se especifica en lugar del hospedero), la ubicación geográfica de origen, el número secuencial de aislamiento (o número de cepa), el año de aislamiento (se pueden usar dos o cuatro dígitos) y el subtipo (este último solamente si se trata de un virus de influenza A; los subtipos se encuentran descritos más adelante). Por ejemplo, A/pato/Guangxi/53/2002 (H5N1) es el nombre correspondiente al virus de influenza A número 53, subtipo H5N1, aislado de patos en Guangxi en el año 2002 (Hutchinson y Yamauchi, 2018).

Los virus de influenza A tienen como reservorios principales a las aves silvestres y los murciélagos, aunque pueden infectar a los seres humanos, cerdos y caballos, generando infecciones de carácter zoonótico (Wille y Holmes, 2020). Por otro lado, los virus de influenza B

también afectan a la población humana, pero no disponen de un reservorio animal establecido y únicamente se ha informado sobre algunas cepas de influenza B humana encontradas en focas y cerdos (Dumm y Heaton, 2019). Respecto a los virus de influenza C, infectan primordialmente al ser humano, aunque hay estudios que indican que estos virus poseen la capacidad de infectar animales, como perros, cerdos y el ganado vacuno (Sederdahl y Williams, 2020). Finalmente, los virus de influenza D fueron aislados de cerdos en el 2011, pero mayormente circulan en el ganado vacuno. Igualmente, varias investigaciones han demostrado que pueden estar presentes en caballos, camellos y pequeños rumiantes (Oliva *et al.*, 2019).

Los virus de influenza A y B principalmente afectan al ser humano, siendo responsables de epidemias anuales estacionales. Por su parte, los virus de influenza C son los menos comunes y producen infecciones más leves en comparación con los virus de influenza A y B, mientras que actualmente no hay reportes de que los virus de influenza D infecten al ser humano (Seah *et al.*, 2023). Las infecciones causadas por los virus de influenza B son altamente contagiosas y en ocasiones derivan en enfermedad grave; las infecciones ocasionadas por los virus de influenza A son las más comunes y originan enfermedades leves a graves (Javanian *et al.*, 2021).

Los virus de influenza A tienen la capacidad de mutar rápidamente y de adaptarse a nuevos hospederos. Además, la completa erradicación de los virus de influenza A no es factible dado que su hospedero principal son las aves silvestres, por lo que la introducción de nuevos virus a partir de estos animales representa un riesgo constante. Entonces, aunado a que estos virus son difíciles de controlar debido a que poseen un vasto reservorio de vida silvestre, los virus de influenza A han sido considerados como los miembros más importantes de la familia *Orthomyxoviridae* (Suarez, 2017). A diferencia de los virus de influenza A, los virus de influenza B presentan mutaciones y reservorios animales limitados, lo que les confiere una estabilidad relativa. No obstante, siempre está latente la posibilidad de modificación genética y el aumento de su patogenicidad, con la consecuente generación de una cepa pandémica de influenza B (Sharma *et al.*, 2019).

1.2. ESTRUCTURA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Estructuralmente, los virus de influenza A y B son indistinguibles con microscopía electrónica; ambos poseen formas esféricas (con un diámetro aproximado de 100 nm) o filamentosas (alrededor de 300 nm de longitud). Asimismo, el genoma de estos virus está conformado por

ocho segmentos de ARN viral (ARNv) que codifican para las múltiples proteínas (Nuwarda *et al.*, 2021).

El genoma de los virus de influenza A está constituido por tres segmentos que codifican para la polimerasa básica 1 (PB1, segmento 2), polimerasa básica 2 (PB2, segmento 1) y polimerasa ácida (PA, segmento 3), al igual que para diferentes proteínas involucradas en la inducción de la apoptosis y la supresión del sistema inmune, como PB1-F2 y PA-X. El genoma contiene el segmento matriz (M, segmento 7) que codifica para la proteína matriz 1 (M1) y la proteína de canal iónico (M2), así como el segmento no estructural (NS, segmento 8) que codifica para la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP o NS2). Adicionalmente, el genoma incluye segmentos que codifican para la NP (segmento 5) y las glucoproteínas superficiales hemaglutinina (HA, segmento 4) y neuraminidasa (NA, segmento 6) (Chakraborty y Chauhan, 2023).

El genoma de los virus de influenza B es casi idéntico al genoma de influenza A, con la diferencia de que el segmento 6 también codifica para una cuarta glucoproteína transmembranal (NB, con funciones aún desconocidas), mientras que el segmento 7 codifica para M1 y la proteína de canal iónico BM2, con funciones idénticas a la M2 de influenza A. Además, el genoma de los virus de influenza B no codifica para las proteínas accesorias de influenza A, como PB1-F2 y PA-X (Wolff y Veit, 2021). Finalmente, cada uno de los segmentos de ARNv se encuentra empaquetado en una partícula de ribonucleoproteína viral (RNPv) compuesta por numerosas moléculas de NP y una ARN polimerasa heterotrimérica (complejo formado por las proteínas PB1, PB2 y PA) enlazada a los extremos 5' y 3' del segmento viral (Ferhadian *et al.*, 2018). La estructura de los virus de influenza A se encuentra representada en la Figura 1.1.

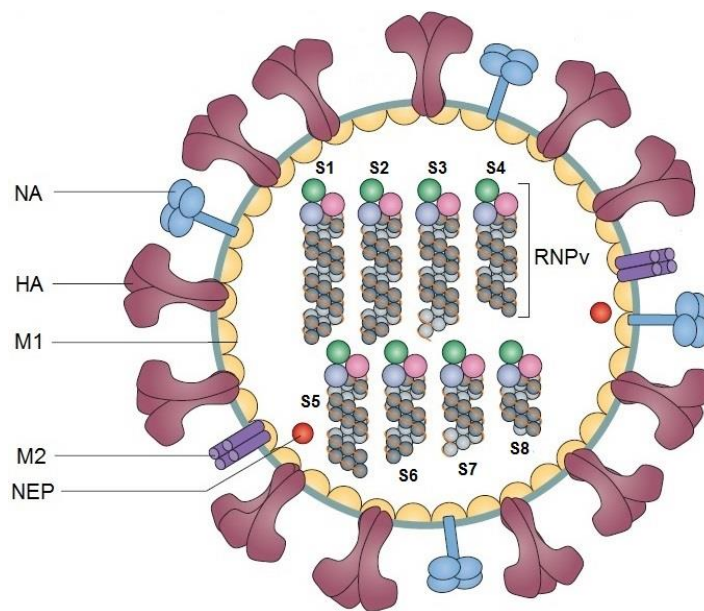


Figura 1.1. Estructura de los virus de influenza A (modificada de Petrova y Russell, 2018).

1.3. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Los virus de influenza A se clasifican de acuerdo a los subtipos de HA y NA en su superficie. En total, se han descrito 16 subtipos de HA (H1-16) y 9 subtipos de NA (N1-9) en las aves (Shao *et al.*, 2017). Recientemente, en los murciélagos se han identificado dos subtipos adicionales de HA (H17 y H18) y NA (N10 y N11) (Dou *et al.*, 2018). En cambio, los virus de influenza B se dividen en dos linajes genética y antigénicamente distintos (basados en HA), B/Yamagata/16/88 y B/Victoria/2/87 (comúnmente conocidos como B/Yamagata y B/Victoria, respectivamente) (Zaraket *et al.*, 2021). Sin embargo, desde el inicio de la pandemia de la enfermedad COVID-19 ocasionada por el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) a principios del año 2020, se produjeron cambios importantes en la circulación de los virus de influenza B alrededor del mundo. Esto incluyó la desaparición del linaje B/Yamagata (el cual no se detecta en humanos desde abril de 2020), siendo los virus de influenza B/Victoria los únicos en circulación (Paget *et al.*, 2022).

De todos los subtipos de HA y NA, en los seres humanos solamente han circulado H1, H2 y H3, así como N1 y N2, apareciendo entre la población como las cepas pandémicas H1N1, H2N2 y H3N2 (Nuwarda *et al.*, 2021). En el siglo pasado, estos subtipos de influenza A humana ocasionaron tres pandemias. La pandemia de influenza “española” de 1918 fue provocada por un virus subtipo H1N1 y ha sido la pandemia con la mayor tasa de mortalidad registrada hasta ahora, con aproximadamente 50 millones de decesos alrededor del mundo. De la misma forma,

en 1957, el virus subtipo H2N2 originó una pandemia de influenza “asiática” que causó el deceso de dos millones de personas. Por último, en 1968, el virus subtipo H3N2 “Hong Kong” reemplazó al virus H2N2 circulante y ocasionó cerca de un millón de víctimas en todo el planeta (Schrauwen y Fouchier, 2014).

En abril del año 2009, en distintas partes de México se reportaron diversos casos de personas que padecían de una enfermedad grave similar a la influenza. Dichos reportes coincidieron con un comunicado de infección por influenza en tres niños de Estados Unidos, la cual era causada por una cepa del virus subtipo H1N1 altamente relacionada con la influenza porcina. Se pudo corroborar que ninguno de los niños estuvo expuesto con anterioridad a cerdos infectados y la secuenciación del genoma viral confirmó que todos los casos de México fueron causados por el mismo virus. También se demostró que esta nueva cepa era capaz de transmitirse de persona a persona, por lo que se le denominó como virus de influenza H1N1 de origen porcino o virus de influenza porcina H1N1 adaptado a humanos (Lagacé-Wiens *et al.*, 2010). En junio de ese mismo año, la Organización Mundial de la Salud declaró una pandemia por el virus H1N1 después de que más de 70 países reportaron cerca de 30,000 casos de infecciones. De esta manera, durante un corto periodo de dos meses, se convirtió en la primera pandemia de influenza del siglo XXI, afectando a más de 214 países (Rewar *et al.*, 2015). En total, se estima que ocasionó alrededor de 201,200 decesos (Li y Cao, 2017).

Por otro lado, la influenza aviar ha permanecido como una amenaza para las aves de corral y los brotes infecciosos en las granjas avícolas generalmente derivan en grandes pérdidas económicas. Además, existen cepas virales de influenza aviar altamente patógenas con la capacidad de infectar a otros mamíferos, como cerdos y humanos, lo que representa una amenaza para la salud pública mundial debido al riesgo de una posible pandemia (Blagodatski *et al.*, 2021). Recientemente se han reportado varios brotes de influenza aviar en humanos, los cuales se han atribuido al contacto cercano con aves infectadas o a un ambiente contaminado, como mercados donde se venden aves vivas (Ma *et al.*, 2019). A escala mundial, desde 2003 la Organización Mundial de la Salud ha informado un total de 878 casos de infecciones en humanos y 458 decesos causados por el virus de influenza aviar A H5N1, mientras que desde 2013 se han reportado 1568 casos de infecciones humanas y 616 decesos relacionados con el virus de influenza aviar A H7N9 (Organización Mundial de la Salud, 2023a).

En la actualidad, las epidemias de influenza estacional son causadas por los virus de influenza A H1N1, A H3N2 y B. Alrededor del mundo, cada año se reportan aproximadamente de 3-5

millones de casos de infecciones graves debido a los virus de influenza estacional y un estimado de 290,000-650,000 decesos (Organización Mundial de la Salud, 2018). En México, datos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud indicaron que al término de la temporada de influenza estacional 2022-2023 se presentaron 9,877 casos confirmados de infecciones de influenza, con un predominio del virus de influenza A H3N2 (8,324), seguido de influenza B (913), influenza A no subtipificable (378) e influenza A H1N1 (262). Igualmente, de los 298 decesos registrados, el subtipo A H3N2 fue responsable de la mayoría (246), seguido del subtipo B (20), A no subtipificable (16) y A H1N1 (16). Finalmente, en Yucatán se reportaron 105 casos confirmados y 5 decesos, ocupando los lugares 21 y 20 entre todas las entidades del país, respectivamente (Dirección General de Epidemiología, 2023).

1.4. CICLO DE REPLICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B

La HA es la glucoproteína más abundante en la membrana de los virus de influenza y es un trímero compuesto por un sitio de unión al receptor (RBS) y dos subunidades (HA1 y HA2) unidas por un enlace disulfuro. La HA promueve el inicio de la entrada viral mediante su unión a la superficie de las células del hospedero (Wu y Wilson, 2020). Los restos de ácido siálico (AS) de las glucoproteínas de la membrana celular sirven como receptores de unión para el dominio HA1, por lo que la subunidad HA1 de los virus de influenza humana se une al AS enlazado a galactosa por una unión α -2,6, mientras que en las aves el AS unido a galactosa por un enlace α -2,3 es reconocido por la HA1 viral (Chlanda y Zimmerberg, 2016).

Después de unirse a su receptor, los virus entran a las células por endocitosis dependiente de clatrina o por macropinocitosis. En el endosoma, el pH ácido del medio produce un cambio conformacional en la HA que permite la exposición del extremo N-terminal de la subunidad HA2 (conocido también como péptido de fusión), de modo que se inserta en la membrana del endosoma y ocasiona la fusión de las membranas viral y endosómica. A su vez, la proteína M2 crea un canal iónico que acidifica aún más el interior de la partícula viral, causando la liberación de las RNPv (empaquetadas dentro de las proteínas M1) hacia el citoplasma. Luego, las secuencias de localización nuclear (NLS) contenidas en la superficie de las múltiples moléculas de NP de las RNPv citoplasmáticas se asocian a proteínas adaptadoras denominadas importina α (IMP α). Inmediatamente, las IMP α son reconocidas por receptores de transporte llamados importina β (IMP β) y forman complejos RNPv-IMP α -IMP β . Estas estructuras atraviesan el complejo del poro nuclear (NPC) y se internalizan en el núcleo (Dou *et al.*, 2018). El proceso de entrada de los virus de influenza se muestra en la Figura 1.2.

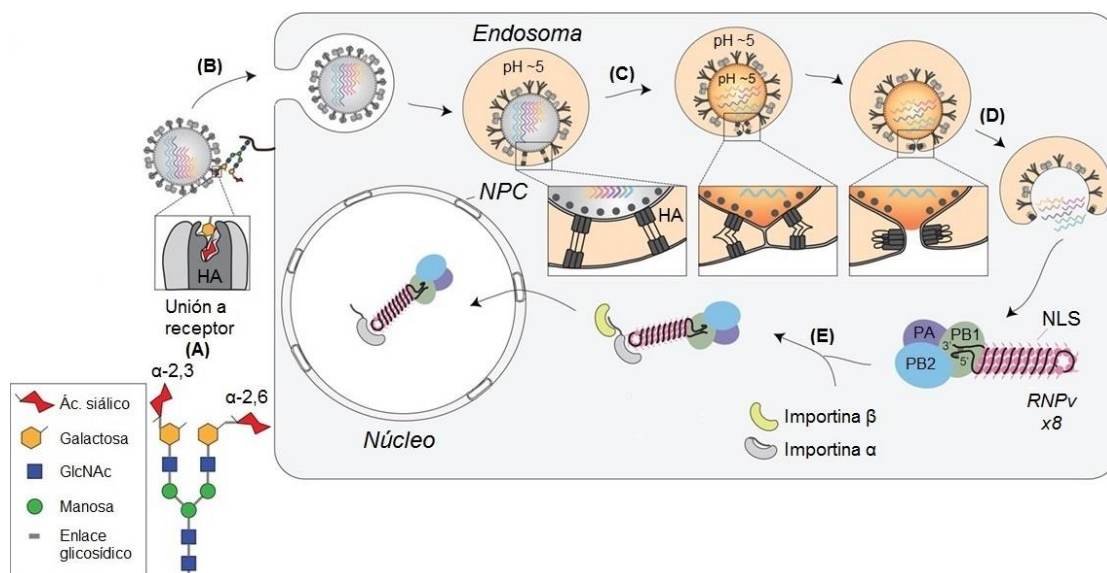


Figura 1.2. Entrada de los virus de influenza hacia la célula. **A)** Unión de HA a AS. **B)** Formación del endosoma. **C)** Fusión de membrana viral y endosómica. **D)** Liberación de las RNPv. **E)** Formación de complejos RNPv-IMPα-IMPβ y transporte al núcleo celular (modificada de Dou *et al.*, 2018).

Posteriormente, la ARN polimerasa viral lleva a cabo la transcripción de ARN mensajero (ARNm) a partir de los segmentos de ARNv de sentido negativo. La transcripción inicia cuando la subunidad PB2 de la ARN polimerasa se enlaza a una estructura caperuza en el extremo 5' del ARNm del hospedero. Después, el dominio endonucleasa de la subunidad PA escinde fragmentos de 10-14 nucleótidos corriente abajo de la caperuza 5'. El extremo 3' del cebador formado se inserta en el centro catalítico de la ARN polimerasa (subunidad PB1) y se empareja con una secuencia complementaria en el extremo 3' del ARNv. Entonces, la ARN polimerasa extiende el transcrito de ARNm utilizando el ARNv como plantilla. El proceso de transcripción concluye cuando el transcrito se poliadenila, es decir, cuando la ARN polimerasa encuentra una secuencia de residuos de uridina consecutivos en el extremo 5' de la plantilla de ARNv (Fodor y te Velthuis, 2020).

Como producto final de la transcripción se originan segmentos de ARNm de sentido positivo con una caperuza 5' y una cola de poli-A 3', los cuales son exportados fuera del núcleo para su traducción a las proteínas virales PB1, PB2, PA, NP, NS1, NEP y M1 por ribosomas citoplasmáticos. Después de su síntesis, estas proteínas virales son transportadas hacia el núcleo de la célula para el ensamblaje de RNPv y ribonucleoproteínas complementarias (RNPc). Por otra parte, la ARN polimerasa también realiza la replicación del ARNv, lo que implica la síntesis de segmentos de ARN complementario (ARNc) de sentido positivo mediante la correcta

complementación de ribonucleósidos trifosfato (rNTP) libres con el extremo 3' de los segmentos de ARNv (Te Velthuis y Fodor, 2016). Estos ARNc son recubiertos con partículas de NP y de las subunidades de la ARN polimerasa, conformando las RNPc que funcionan como plantillas para la generación de nuevas copias de ARNv y RNPv (Oymans y te Velthuis, 2018). Las etapas de transcripción y replicación viral se resumen en la Figura 1.3.

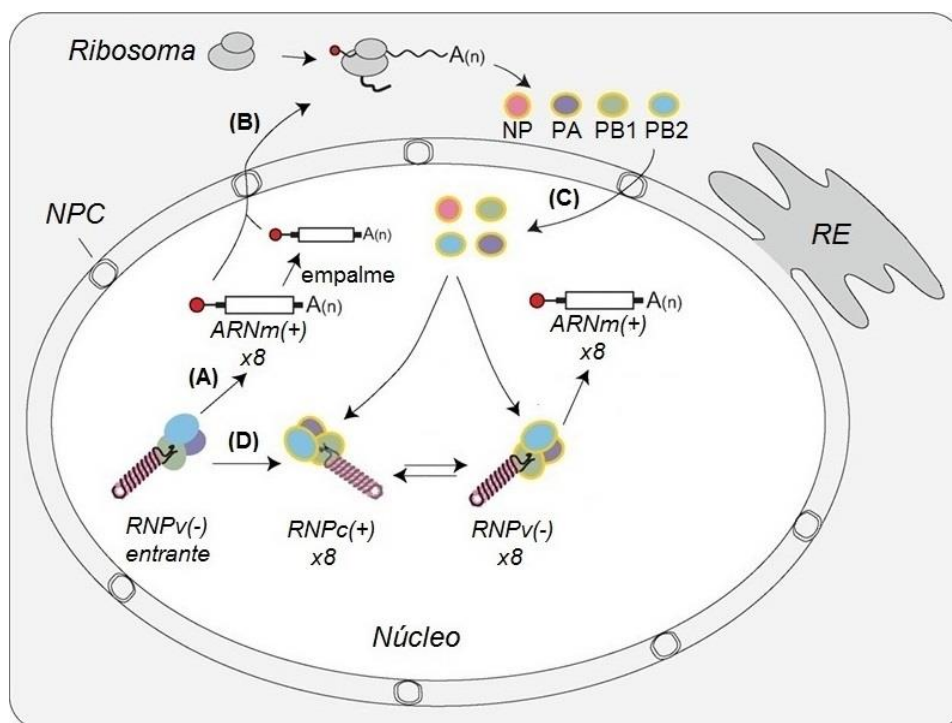


Figura 1.3. Transcripción y replicación de ARNv. **A)** Transcripción de ARNv. **B)** Transporte de ARNm. **C)** Transporte de proteínas virales y ensamblaje. **D)** Replicación de ARNv (modificada de Dou *et al.*, 2018).

Igualmente, varias copias de NP y de las subunidades de la ARN polimerasa recién sintetizadas se enlazan a segmentos de ARNv, logrando el ensamblaje de más partículas de RNPv. El complejo RNPv presenta forma de una doble hélice antiparalela, cuya estructura se mantiene mediante contactos entre los monómeros de NP, los cuales le confieren una alta estabilidad; por su parte, el ARNv forma un bucle en el extremo opuesto al extremo unido a la polimerasa (Te Velthuis y Fodor, 2016).

Seguidamente, las proteínas M1 se unen a las RNPv a través de interacciones con NP y a su vez, M1 es capaz de enlazarse a diversas NEP, formando complejos proteicos (Hutchinson y Fodor, 2013). Entonces, la NEP de los complejos RNPv-M1-NEP (conocidos como complejos en cadena tipo daisy) interactúa con la proteína de mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1) asociada a la proteína Ran guanósín trifosfato (RanGTP, una pequeña GTPasa) y

permite la translocación de los complejos hacia el citoplasma. Asimismo, se ha reportado que las moléculas de NP tienen otras funciones importantes relacionadas con el transporte, ya que pueden interactuar directamente con la proteína CRM1 y dar como resultado la exportación nuclear de las RNPv. Dado que las proteínas M1 interactúan principalmente con las RNPv, se ha descrito que las RNPc también podrían ser transportadas fuera del núcleo debido a secuencias de exportación nuclear (NES) presentes en las NP, expuestas únicamente en la superficie de las RNPc (Chaimayo *et al.*, 2017). El proceso de ensamblaje y transporte de las RNPv se encuentra representado en la Figura 1.4.

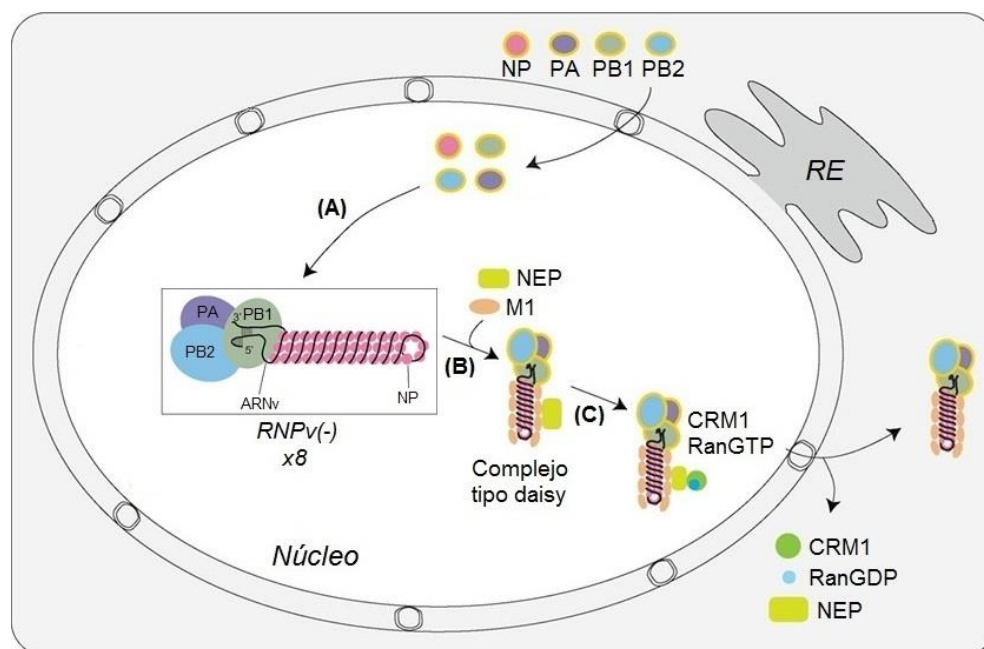


Figura 1.4. Ensamblaje y transporte de RNPv. **A)** Ensamblaje de RNPv. **B)** Formación de complejos tipo daisy. **C)** Translocación citoplásmica de RNPv (modificada de Dou *et al.*, 2018).

Después de su exportación, las RNPv se acumulan en el citoplasma, cerca del centro organizador de microtúbulos y el compartimento de reciclaje endosómico (ERC), uniéndose a vesículas de transporte propias del ERC. Estos endosomas de reciclaje son transportados a lo largo de los microtúbulos, hasta llegar a la membrana plasmática apical (Giese *et al.*, 2016). Recientemente, se ha sugerido que las RNPv también pueden ingresar a la membrana plasmática acoplándose a moléculas del retículo endoplásmico (RE). De la misma manera, las proteínas HA, NA, y M2 (previamente sintetizadas por ribosomas asociados al RE, partiendo de ARNm acoplados a ribosomas y partículas de reconocimiento de señales o SRP) son translocadas a la membrana plasmática (Dou *et al.*, 2018).

Entonces, las RNPv y las proteínas virales son ensambladas directamente en un amplio dominio membranal estabilizado, con la finalidad de formar las partículas de la progenie viral (Giese *et al.*, 2016). Dentro del viri3n, las ocho RNPv se organizan en un patr3n "7+1", con una RNPv en el centro rodeada por las siete restantes. La presencia de un genoma completamente ensamblado (compuesto por las ocho RNPv diferentes) es un requisito fundamental para que las nuevas part3culas virales sean infecciosas, puesto que la omisi3n de un segmento reduce o elimina la formaci3n de los viriones (Shafiuddin y Boon, 2019).

Por 3ltimo, la NA participa en la etapa final de la infecci3n viral. La NA es un tetr3mero compuesto por cuatro polip3ptidos id3nticos y su funci3n m3s importante es su actividad sialidasa a pH 3cido, ya que elimina los residuos de AS de las c3lulas del hospedero y de la HA y NA de los viriones reci3n sintetizados. De esta forma, la NA evita la uni3n de los virus a las c3lulas (por medio de la HA) y la agregaci3n viral, facilitando la liberaci3n de los viriones y la propagaci3n viral (McAuley *et al.*, 2019). La etapa de liberaci3n de los virus de influenza se ilustra en la Figura 1.5.

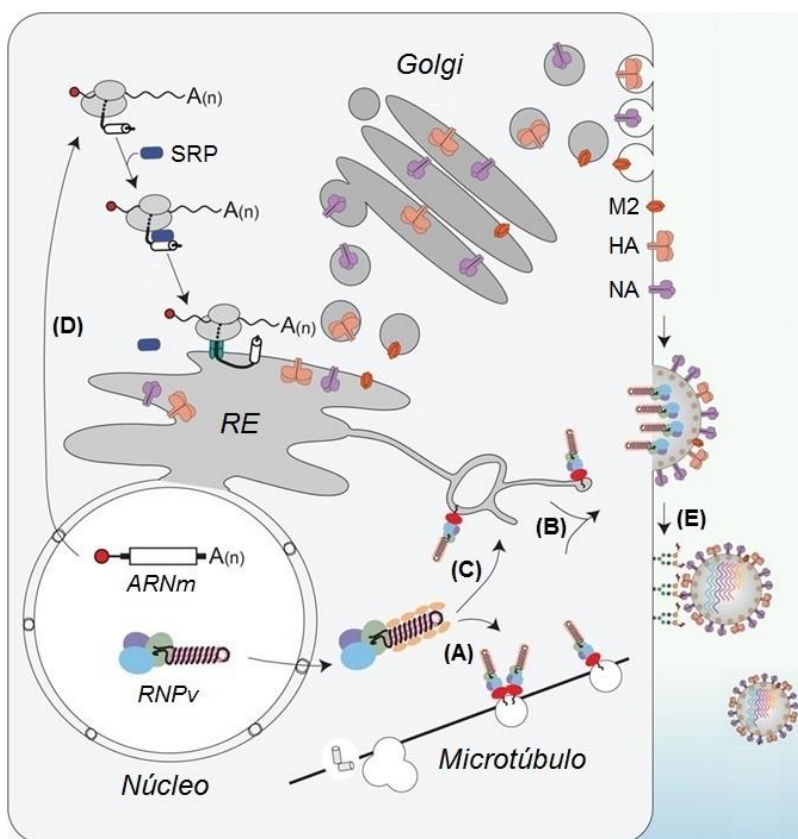


Figura 1.5. Liberaci3n de los virus de influenza. **A)** Uni3n de RNPv a ves3culas de transporte. **B)** Transporte de ves3culas a membrana plasm3tica. **C)** Transporte de RNPv por RE. **D)** S3ntesis y transporte de HA, NA, y M2. **E)** Liberaci3n de viriones (modificada de Dou *et al.*, 2018).

1.5. EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Los virus de influenza A y B mutan y evolucionan rápidamente bajo una fuerte selección positiva atribuida a la necesidad de evadir la inmunidad preexistente en la población (Valesano *et al.*, 2020). Estos cambios evolutivos están impulsados por diversos mecanismos, como son las mutaciones (deriva antigénica o antigenic drift), los reordenamientos (cambio antigénico o antigenic shift) y las recombinaciones (Shao *et al.*, 2017).

Las mutaciones en el genoma viral son el resultado de la nula capacidad de corrección de errores por parte de la ARN polimerasa de los virus de influenza. Estos errores originan dos mutaciones por cada genoma replicado, aproximadamente (White y Lowen, 2018). Aunque muchas mutaciones ocasionan cambios génicos menores o conducen al surgimiento de una progenie viral no viable, algunas se producen en regiones antigénicas de HA y NA. Las mutaciones que alteran la antigenicidad de HA y NA se denominan deriva antigénica y lideran el surgimiento de cepas virales que evaden la inmunidad preexistente. Estos virus circulan en la población por largos periodos de tiempo y causan epidemias de influenza estacional, hasta su remplazo por nuevas variantes virales (Kim *et al.*, 2018). Ambos virus de influenza (A y B) experimentan una deriva antigénica estacional; no obstante, los virus de influenza B evolucionan más lentamente que los virus de influenza A y tienen una menor tasa de deriva antigénica, aunque las razones de este fenómeno aún son poco conocidas (Valesano *et al.*, 2020).

Por otro lado, los reordenamientos son producto del intercambio de segmentos de ARN entre dos o más cepas virales durante la infección a una misma célula (Petrova y Russell, 2018). Considerando que el genoma viral consta de ocho segmentos, en una infección dual los genes pueden combinarse de 254 maneras posibles. El intercambio de segmentos génicos de HA y NA se conoce como cambio antigénico y es un proceso importante que solo ocurre entre los virus de influenza A debido a su vasto reservorio animal; los virus de influenza B no experimentan cambio antigénico puesto que no tienen un reservorio animal reconocido. En los seres humanos, los reordenamientos pueden dar lugar a un nuevo virus con un elevado potencial pandémico, dada la limitada inmunidad de la población hacia el mismo (Kim *et al.*, 2018).

En este sentido, las pandemias de influenza del siglo pasado aparecieron como consecuencia de reordenamientos génicos, ya que la pandemia de influenza “española” H1N1 de 1918 aparentemente derivó de un organismo aviar, mientras que las pandemias de influenza “asiática” H2N2 de 1957 y “Hong Kong” H3N2 de 1968 surgieron por reordenamientos entre cepas aviares

y humanas (Lu *et al.*, 2014). Asimismo, los mecanismos de reordenamiento desempeñaron un papel fundamental en la aparición de la pandemia de influenza H1N1 del 2009, puesto que la cepa viral responsable contenía segmentos génicos de cepas de origen aviar, porcino y humano (White y Lowen, 2018).

Por último, las recombinaciones homólogas y no homólogas de ARN no suceden de manera común en los virus de influenza. No obstante, en ocasiones, la recombinación no homóloga puede ocurrir en diferentes segmentos del genoma y producir una cepa altamente patógena (Szewczyk *et al.*, 2014). Los mecanismos de evasión se resumen en la Figura 1.6.

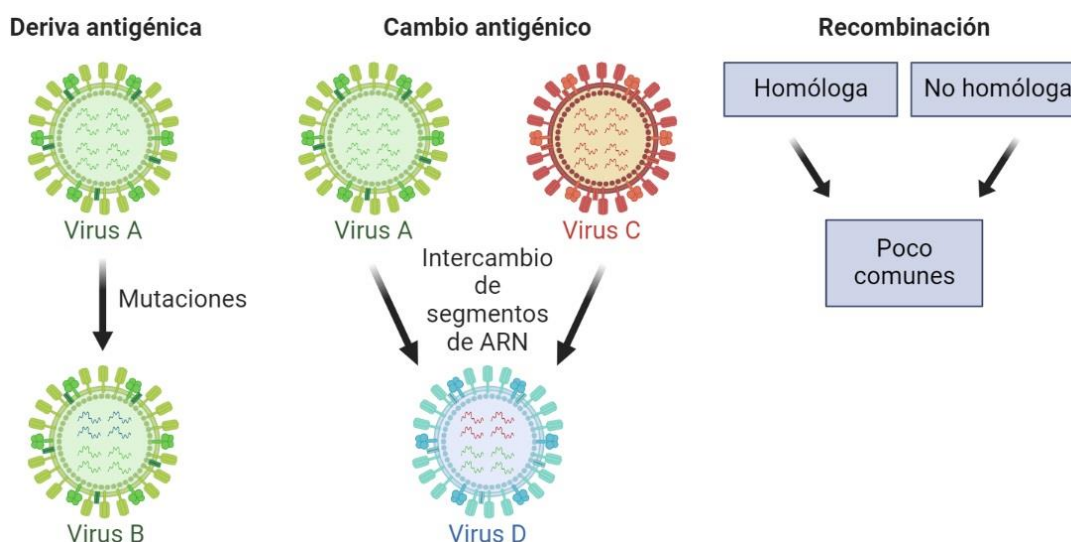


Figura 1.6. Mecanismos de evasión de los virus de influenza (creada con BioRender.com).

1.6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Hoy en día, la vacunación representa el método más efectivo para prevenir las infecciones por los virus de influenza. Diversas clases de vacunas se encuentran disponibles y la protección que confieren varía. Las vacunas tetravalentes otorgan inmunidad contra dos cepas de influenza A (H1N1 y H3N2) y dos linajes de influenza B (Victoria y Yamagata), mientras que las vacunas trivalentes brindan protección contra ambas cepas de influenza A y solamente un linaje de influenza B (Ruiz-Aragón *et al.*, 2020).

Anualmente, la Organización Mundial de la Salud recomienda cuales son las cepas específicas a incluir en las vacunas para las temporadas de influenza de los hemisferios norte y sur. En el caso del hemisferio norte, para las vacunas trivalentes producidas en huevo a usar en la temporada de influenza 2023-2024, se recomienda que estas contengan las cepas

A/Victoria/4897/2022 (H1N1) pdm09, A/Darwin/9/2021 (H3N2) y B/Austria/1359417/2021 (linaje Victoria), mientras que para las vacunas trivalentes recombinantes o producidas en cultivos celulares a utilizar en la misma temporada se sugiere que estas incluyan las cepas A/Wisconsin/67/2022 (H1N1) pdm09, A/Darwin/6/2021 (H3N2) y B/Austria/1359417/2021. De igual modo, para las vacunas tetravalentes (producidas en huevo, recombinantes o producidas en cultivos celulares) se recomiendan las cepas anteriores correspondientes más B/Phuket/3073/2013 (linaje Yamagata) (Organización Mundial de la Salud, 2023b).

Sin embargo, la deriva antigénica y una amplia variedad de potenciales virus zoonóticos y pandémicos obstaculizan la elección de las cepas adecuadas para la producción de vacunas, causando el denominado desajuste de vacunas. Este problema ocasiona una abrupta disminución en la efectividad de las vacunas y prolonga el tiempo de fabricación de las mismas en caso de nuevos virus pandémicos (Nachbagauer y Krammer, 2017). Por ende, los fármacos antivirales también desempeñan un papel importante en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por influenza, siendo los bloqueadores del canal iónico M2, los inhibidores de la NA y los inhibidores de la polimerasa viral las tres clases de antivirales disponibles actualmente, aunque su uso varía dependiendo de la región (Li *et al.*, 2023).

Los adamantanos, como la amantadina y rimantadina, fueron el primer tipo de compuestos aprobados para el tratamiento de la influenza y funcionan bloqueando los canales iónicos M2. No obstante, solo son efectivos contra los virus de influenza A y provocan efectos secundarios adversos. Además, los adamantanos han dado origen a virus resistentes, como los virus de influenza A H1N1 pdm09 y H3N2 con sustituciones S31N en la proteína M2 (Farrukee y Hurt, 2017). Esta sustitución aminoacídica también se ha observado en los virus de influenza aviar A H5N1 y H7N9, lo que les confiere resistencia a dichos fármacos (Takashita *et al.*, 2022). Por lo tanto, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos ya no recomiendan el uso de los adamantanos en la terapia contra esta enfermedad en este país, aunque estos fármacos se siguen utilizando en otras naciones (Li *et al.*, 2023).

Los inhibidores de la NA aptos para el tratamiento de las infecciones por influenza comprenden al oseltamivir (el cual permanece como el fármaco anti-influenza más empleado e inclusive se encuentra disponible como medicamento genérico), así como el zanamivir, peramivir y laninamivir (aprobado para su uso exclusivo en Japón) (Govorkova *et al.*, 2022). Aunque estos antivirales pueden inhibir todos los subtipos de NA de los virus de influenza mediante su unión

al sitio catalítico de la enzima, últimamente han emergido virus resistentes a esta clase de fármacos (Lina *et al.*, 2018). Por ejemplo, se ha observado la aparición de sustituciones de aminoácidos relacionadas con oseltamivir, zanamivir, peramivir y laninamivir, tanto para la NA de los virus de influenza A H1N1 pdm09 y H3N2 (H275Y, Q136K, N295S, E119G y S331R), como para la NA de los virus de influenza B/Victoria y B/Yamagata (E105K, G140R, T146P, N169S y H273Y) (Govorkova *et al.*, 2022). Con relación a la influenza aviar, también se han identificado sustituciones de aminoácidos en la NA de los virus que cuentan con el mayor número de casos de infecciones en humanos y decesos (H5N1 y H7N9, descritos previamente), siendo estas H274Y (H5N1) y R292K (H7N9), las cuales están relacionadas con oseltamivir, peramivir y zanamivir (Smyk *et al.*, 2022).

Los inhibidores de la polimerasa viral han aparecido como compuestos novedosos en la terapia contra la influenza e incluso, algunas investigaciones han mostrado que estos antivirales tienen una mayor eficacia clínica en comparación con los inhibidores de la NA (Mifsud *et al.*, 2019). Los inhibidores de la polimerasa incluyen al baloxavir marboxil (fármaco dirigido contra PA; aprobado para su uso en Estados Unidos y en pacientes con influenza aguda sin complicaciones) y pimodivir (fármaco dirigido contra PB2; únicamente posee efecto sobre los virus de influenza A y ha sido discontinuado en fase de ensayos clínicos) (Chakraborty y Chauhan, 2023). Sin embargo, recientemente se ha evidenciado que el baloxavir marboxil y el pimodivir estarían asociados con el surgimiento de nuevas variantes virales poco susceptibles a estas moléculas. Para el pimodivir, se han detectado varias sustituciones de aminoácidos (F325L, S337P, T378S y N510T) en la subunidad PB2 de los virus de influenza A (Zaraket *et al.*, 2021). En el caso del baloxavir marboxil, se ha reportado la presencia de sustituciones en la subunidad PA de los virus de influenza A H1N1 pdm09 (I38T, I38S, E23G, E23K y E199G) y H3N2 (I38T, I38M, I38L, K34R y L28P), al igual que en influenza B/Victoria (I38V y M34I) (Govorkova *et al.*, 2022).

Entonces, la cantidad relativamente reducida de fármacos antivirales aprobados para el tratamiento de la influenza, el número limitado de blancos virales hacia los cuales están orientados y la aparición de cepas con mutaciones de resistencia hacia dichos compuestos han ocasionado la necesidad de ampliar el espectro de opciones terapéuticas. Algunas de las estrategias empleadas implican la búsqueda de fármacos dirigidos contra la célula del hospedero u otros objetivos virales, como el ARN, la HA, la NP viral u otros elementos del complejo en cadena tipo daisy (Terrier y Slama-Schwok, 2021). En este sentido, las plantas medicinales están proporcionando una alternativa terapéutica para el tratamiento de las infecciones por los virus de

influenza, ya que constituyen una valiosa fuente de moléculas con estructuras diversas y con potencial actividad contra nuevas dianas virales (Zhang *et al.*, 2020).

1.7. PLANTAS MEDICINALES Y PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Las plantas medicinales se han utilizado desde hace miles de años para tratar y prevenir diversas enfermedades. Incluso, hoy en día, las plantas medicinales siguen siendo de gran importancia para la salud individual y comunitaria, ya que alrededor del 80% de las personas en el mundo (especialmente personas de comunidades rurales) aún dependen de la medicina tradicional para atender sus necesidades básicas de salud (Bamola *et al.*, 2018). Respecto a la influenza, existen reportes de varias plantas empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de este padecimiento. Entre estas se encuentran *Ambrosia peruviana* (infusión de hojas y tallos), *Borago officinalis* (infusión de la planta entera), *Mangifera indica* (infusión de las hojas secas), *Persea americana* (infusión de las hojas), *Solanum americanum* (jugo del fruto triturado), entre otras (Ruíz Santillán y Mejía Coico, 2020). Como se puede notar, casi todas las partes de una planta tienen propiedades medicinales. Dichas propiedades han sido atribuidas a los distintos tipos de metabolitos secundarios presentes en las plantas (Bamola *et al.*, 2018).

Los metabolitos secundarios han sido definidos como compuestos orgánicos que no están directamente involucrados en el crecimiento o desarrollo de un organismo. Aunque son una clase de productos naturales (moléculas producidas naturalmente por cualquier organismo, incluyendo metabolitos primarios), los términos “metabolito secundario” y “producto natural” generalmente se utilizan de manera indistinta (Baltz, 2019).

Actualmente, la química de productos naturales desempeña un rol fundamental en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, ya que el 37.7% (713) de los fármacos aprobados en el periodo comprendido entre 1981-2019 (1,881) provienen de dichos metabolitos o son derivados de los mismos (Newman y Cragg, 2020). No obstante, solamente el 6% de las especies vegetales descritas hasta ahora han sido evaluadas en ensayos farmacológicos y únicamente el 15% cuentan con estudios fitoquímicos. Aunque estos porcentajes podrían ser más altos debido a las investigaciones en curso, es muy probable que exista un enorme número de metabolitos que aún no han sido analizados (Minho *et al.*, 2020). Por lo tanto, el conocimiento empírico basado en los beneficios etnomédicos de las plantas, así como el conjunto de bioensayos y técnicas disponibles para el aislamiento de productos naturales, están siendo empleados para la

identificación de nuevos compuestos con actividad antiviral que podrían servir en la terapia contra la influenza (Rajasekaran *et al.*, 2013).

Varias investigaciones han demostrado que la amplia gama de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas medicinales pueden inhibir la actividad de los virus de influenza y bloquear las diferentes etapas del ciclo de replicación (Moradi *et al.*, 2018). Por ejemplo, Nile *et al.* (2020) aislaron el flavonoide quercetin 3-glucósido (**5**) de las hojas de *Dianthus superbus* y evidenciaron que inhibió la actividad de los virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1), A/Victoria/3/75 (H3N2), B/Maryland/1/59 y B/Lee/40, con valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 4.93-9.94 $\mu\text{g/mL}$. El compuesto **5** también redujo el efecto citopático inducido en células MDCK infectadas con todas las cepas virales y no presentó toxicidad significativa en dicha línea celular, con una concentración citotóxica media (CC_{50}) $>100 \mu\text{g/mL}$. Ensayos de tiempos de adición con el virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1) indicaron que **5** bloquea la actividad viral en las etapas tempranas de la infección y simulaciones de acoplamiento molecular mostraron este flavonoide que puede unirse a los sitios activos de la subunidad PB2 de los virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), A/Hong Kong/1/68 (H3N2), A/Victoria/3/75 (H3N2), A/Beijing/39/75 (H3N2), A/duck/Shantou/4610/2003 (H5N1) y B/Jiangxi/BV/2006.

Song *et al.* (2005) reportaron que el (-)-galato de epigallocatequina (**6**; polifenol presente en las hojas de *Camellia sinensis*) actúa a distintos niveles, ya que inhibió la actividad formadora de placas en células MDCK infectadas con los virus de influenza A/Chile/1/83 (H1N1), A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yamagata/16/88, con valores de concentración efectiva media (EC_{50}) de 22.8-28.4 μM . Además, este compuesto no presentó toxicidad significativa en células MDCK ($CC_{50} = 275.4 \mu\text{M}$) e inhibió la capacidad de hemaglutinación de los tres virus evaluados, al igual que la actividad de la NA y la síntesis de ARNm que codifica para la NP viral.

Por otra parte, Zhang *et al.* (2018) mostraron que la brevilinea A (**7**), una lactona sesquiterpénica obtenida de *Centipeda minima*, inhibió la replicación del virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1) en células MDCK, con un IC_{50} de 1.8 μM y un CC_{50} de 23.6 μM . Asimismo, ensayos de tiempos de adición evidenciaron que este metabolito ejerció su actividad antiviral después de la entrada del virus a las células y los resultados del Western Blot exhibieron que **7** ocasionó un decremento en la expresión de las proteínas NP, M1 y M2.

Chen *et al.* (2020) describieron que el metil brevifolincarboxilato (**8**), un compuesto heterocíclico extraído del fruto de *Canarium album*, ejerció un efecto inhibitorio de manera dependiente de la

concentración sobre la actividad de los virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1) y A/Aichi/2/68 (H3N2), con IC_{50} de 27.16 y 33.41 μ M, respectivamente. A su vez, **8** no presentó toxicidad significativa en células MDCK ($CC_{50} > 1,000 \mu$ M), redujo los niveles de expresión del ARNm que codifica para la HA y la expresión de la NP (por Western Blot e inmunofluorescencia indirecta o IFI) en la cepa viral A/PR/8/34 (H1N1), así como la actividad de las RNPv a través de la unión a la subunidad PB2 de la ARN polimerasa (*in silico* e *in vitro*).

Wang *et al.* (2021) reportaron que la puerarina (**9**), una isoflavona presente en la raíz de la planta medicinal *Pueraria lobata*, inhibió la actividad del virus de influenza A/FM/1/1947 (H1N1) en células MDCK infectadas, con una EC_{50} de 52.06 μ M. Igualmente, este compuesto no mostró toxicidad significativa en las células MDCK ($CC_{50} > 1,086.99 \mu$ M) e inhibió la actividad de la NA viral ($IC_{50} = 15.7 \mu$ M); incluso, estudios de acoplamiento molecular demostraron que **9** interactuó con el sitio activo de esta proteína, lo que inhibiría su actividad sialidasa. De la misma manera, **9** suprimió la expresión del gen que codifica para las proteínas M1 y M2 y por IFI, los autores observaron que **9** causó un decremento en la expresión de la NP y además retuvo esta proteína en el núcleo celular. Las estructuras de los productos naturales provenientes de plantas medicinales y con actividad contra virus de influenza A y B se muestran en la Figura 1.7.

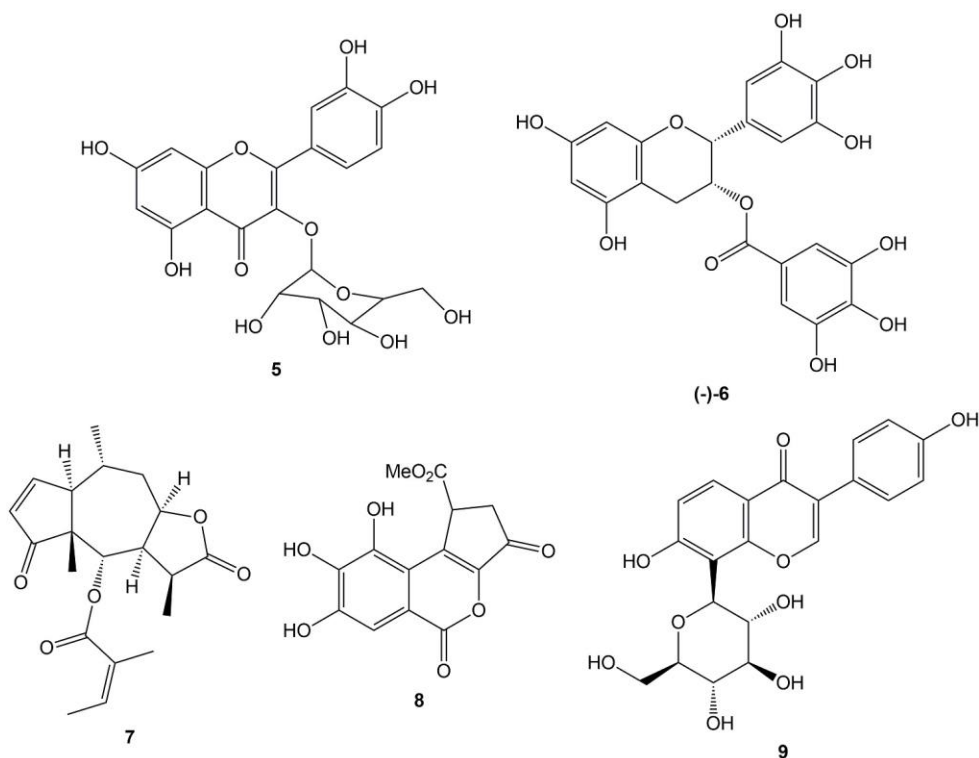


Figura 1.7. Metabolitos secundarios con actividad contra virus de influenza.

Como se pudo observar, la búsqueda de plantas y moléculas de origen vegetal con actividad contra la influenza es prometedora. Sin embargo, a pesar de que las plantas medicinales son un recurso relativamente ilimitado, están disminuyendo rápidamente debido a múltiples factores (Rajasekaran *et al.*, 2013). Entre estos se encuentran el impacto ambiental, la deforestación, los desastres naturales, el excesivo crecimiento de la población y el desarrollo de tierras para la agricultura, los cuales han amenazado a más del 20% de las especies de plantas medicinales reportadas alrededor del mundo (Atanasov *et al.*, 2015). Aunado a esto, muchos productos naturales se encuentran disponibles en cantidades muy bajas (principalmente aquellos provenientes de plantas), lo que dificulta escalar las actividades biológicas de estos compuestos hacia aplicaciones prácticas (Li *et al.*, 2018). Además, muchas especies vegetales son de crecimiento lento y su composición química depende de la estación, lo que condiciona el tiempo de recolección. Por lo tanto, se están explorando estrategias adicionales para la obtención de compuestos bioactivos, siendo la síntesis de productos naturales una alternativa considerable (Atanasov *et al.*, 2015).

1.8. SÍNTESIS BIOMIMÉTICA DE PRODUCTOS NATURALES

La síntesis química de los productos naturales marcó el inicio de la química orgánica. En 1828, la síntesis de urea a partir de cianato de amonio inorgánico mostró que los productos naturales pueden ser preparados en el laboratorio. Con este antecedente, se delimitó el rumbo para la primera síntesis dirigida de un producto natural, el ácido acético (AcOH), la cual requirió el conocimiento inequívoco de la constitución estructural del metabolito (Hoffmann, 2013). Desde esos momentos y a lo largo de casi 200 años, se han sintetizado una inmensa cantidad de productos naturales, muchos de ellos procedentes de plantas. Incluso, cada uno de los metabolitos secundarios de origen vegetal aprobados con fines terapéuticos en los últimos cuarenta años tiene, al menos, un mecanismo de síntesis total, como son la artemisinina (**10**), capsaicina (**11**), colchicina (**12**), galantamina (**13**), entre otros (Figura 1.8) (Atanasov *et al.*, 2015).

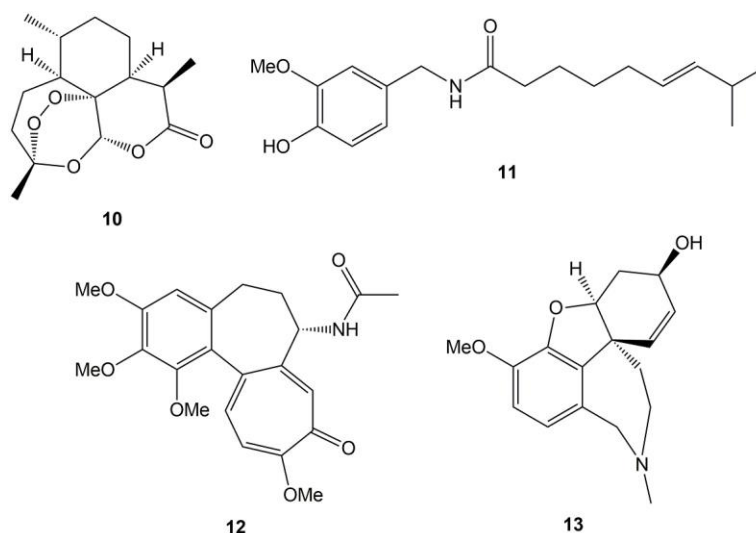


Figura 1.8. Productos naturales derivados de plantas y aprobados para uso terapéutico.

Los productos naturales poseen características únicas en términos de diversidad y complejidad, ya que generalmente tienen un peso molecular elevado, muchos centros estereogénicos, varios átomos de oxígeno, pocos enlaces rotativos, pocos átomos de nitrógeno, azufre o halógenos y varios anillos fusionados, puenteados o tipo espiro. Esta complejidad estructural ha incrementado la dificultad en la síntesis de dichos compuestos (Wang *et al.*, 2019). No obstante, la biosíntesis de los productos naturales proporciona información continuamente para el diseño de estrategias sintéticas eficientes y estimula el desarrollo de nuevos métodos de síntesis (Ma y Chen, 2018). En este sentido, la síntesis biomimética de productos naturales ha aparecido como una herramienta importante para la generación de estas moléculas y sus derivados de una manera concisa y eficiente (Bao *et al.*, 2021).

La síntesis biomimética o bioinspirada puede ser definida como la construcción de un producto natural utilizando una ruta biosintética establecida o hipotética (Poupon y Nay, 2011). Del mismo modo, la síntesis biomimética puede emplear solamente una serie de etapas, un paso o un intermediario clave en lugar de todo el esquema biosintético (Huang, 2018). Por consiguiente, es fundamental conocer las características de la biosíntesis en la naturaleza, como el uso de bloques de construcción estructuralmente sencillos que sirven como precursores para la generación de compuestos más complejos. Otro factor a tomar en cuenta son las reacciones en cascada, en las cuales los productos generados son empleados como material de partida en una reacción posterior (Hugelshofer y Magauer, 2017). Asimismo, la síntesis en fase acuosa, la catálisis enzimática, la síntesis divergente, la elevada selectividad, la síntesis libre de grupos

protectores, la síntesis en pequeñas cantidades y las oligomerizaciones son otras propiedades típicas a considerar en la biosíntesis en plantas (Huang, 2018).

La síntesis biomimética combina los desafíos propios de la síntesis orgánica con la dificultad adicional que implica el tratar de imitar los procesos que sigue la naturaleza en la biosíntesis de productos naturales (Bulger *et al.*, 2008). No obstante, los beneficios del enfoque biomimético son numerosos, como el desarrollo de reacciones en cascada para la formación de compuestos con complejidad molecular (Day *et al.*, 2020). Esto engloba la formación de productos naturales poco comunes en la naturaleza, como los racematos; incluso, la síntesis biomimética de mezclas racémicas ha generado evidencia que respalda la biosíntesis propuesta para estas moléculas, ya que se ha sugerido que podrían ser el resultado de reacciones espontáneas no enzimáticas (Zask y Ellestad, 2018). Entonces, la búsqueda de mecanismos de síntesis biomimética también promueve el desarrollo de nuevas reacciones que podrían probar o refutar una propuesta biosintética, así como ayudar en la comprensión de un esquema biosintético hipotético. Igualmente, la síntesis biomimética podría conducir a la construcción e identificación de nuevos productos naturales (Razzak y De Brabander, 2011). Además, la creación de una estrategia biomimética basada en una propuesta biosintética podría ayudar a establecer los vínculos entre metabolitos ampliamente relacionados, especialmente si éstos se encuentran en un mismo organismo. Finalmente, si bien es cierto que la síntesis biomimética se fundamenta en las rutas de biosíntesis, las reacciones que simulan se pueden llevar a cabo usando materiales y condiciones que no se encuentran disponibles en la naturaleza (Hugelshofer y Magauer, 2017).

1.9. PRODUCTOS NATURALES OBTENIDOS POR SÍNTESIS BIOMIMÉTICA CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B

En los últimos años, el número de estudios en el campo de la síntesis biomimética ha aumentado, obteniéndose diversos compuestos con actividad antiviral (Poupon y Nay, 2011). Por ejemplo, Albertson y Lumb (2015) generaron el furanolignano ($\pm$)-pinoresinol (**14**) en tres pasos, empleando un diéster *meso*-ciclobutano como precursor y la síntesis de un intermediario biosintético meturo de *p*-quinona. Recientemente, el trabajo de Azman *et al.* (2018) demostró que ($\pm$)-**14** aislado de la planta medicinal *Chilocarpus costatus* posee actividad contra el virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), con un IC₅₀ de 30.4 μ M; este compuesto presentó valores de CC₅₀ >27.9 μ M y 182.4 μ g/mL en células MRC-5 (pulmón humano) y MDCK, respectivamente.

Song *et al.* (2014) sintetizaron espirooliganonas A (**15**) y B (**16**) en doce pasos, partiendo del ácido 2,6-dihidroxibenzoico y reacciones en cascada que involucraron rearrreglos aromáticos de Claisen y cicloadiciones de Diels-Alder, al igual que desaromatizaciones oxidativas y espirociclaciones. Ma *et al.* (2013) aislaron con anterioridad estos diastereómeros de las raíces de *Illicium oligandrum* y reportaron la toxicidad (en células MDCK) y actividad de ambos productos naturales contra el virus de influenza A/Hanfang/359/95 (H3N2), obteniendo valores de concentración tóxica media (TC₅₀) de 57.74 (**15**) y 23.11 µM (**16**), así como IC₅₀ de 3.70 (**15**) y 5.05 µM (**16**).

Por su parte, Wang *et al.* (2013) lograron sintetizar los dos enantiómeros de la katsumadaina A (**17**) por medio de tres reacciones que consistieron en adiciones enantioselectivas y organocatalíticas de estiril-2-piranona y cinamaldehído, seguida de adiciones de Horner-Wadsworth-Emmons y de Michael en tándem. Previamente, Grienke *et al.* (2010) obtuvieron (**±**)-**17** de las semillas de *Alpinia katsumadai* y demostraron en ensayos *in vitro* que este diarilheptanoide inhibió la NA de cinco cepas de virus de influenza A H1N1, cuatro cepas de origen porcino (A/Potsdam/15/81, A/Belzig/2/01, A/Horneburg/IDT7489/08 y A/Brest/IDT7490/08) y una cepa de origen humano (A/PR/8/34), con valores de IC₅₀ de 0.59-1.64 µM. Además, (**±**)-**17** mostró moderada citotoxicidad en células MDCK (CC₅₀ = 66.9 µM) e inhibió la actividad del virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), con un IC₅₀ de 11.75 µM. Análisis de acoplamiento molecular indicaron que (**±**)-**17** también interactuó con el sitio activo de la NA.

Matsuo *et al.* (2017) obtuvieron teaflavina (**18**) y teaflavin-3-galato (**19**; ambos polifenoles generados durante el proceso de manufactura del té negro de las hojas de *C. sinensis*) en tres pasos, a partir de la oxidación de diversas catequinas con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). A su vez, Yang *et al.* (2014) evidenciaron que **18** ejerció un efecto antiviral en los virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1) y B/Lee/40, con IC₅₀ de 16.21 y 49.72 µg/mL, respectivamente; **18** no mostró toxicidad significativa en células MDCK (TC₅₀ = 136.94 µg/mL).

De la misma manera, Zu *et al.* (2012) mostraron que **19** no tuvo citotoxicidad significativa en células A549 (carcinoma humano de pulmón) y MDCK (CC₅₀ = 172.9 y 177.1 µg/mL) e inhibió la actividad del virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), con un IC₅₀ de 6.89 µg/mL. El compuesto **19** inhibió la NA de las cepas A/PR/8/34 (H1N1), A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Jiangsu/10/2003 (IC₅₀ = 13.29-49.60 µM) y la HA de estos virus, con valores de concentración efectiva mínima (MEC) de 3.125-25.00 µg/mL. Finalmente, **19** presentó un efecto inhibitorio en el gen que codifica para la HA y un decremento en la localización nuclear de la RNPv del virus de influenza A H1N1

evaluado. Las estructuras químicas de estas moléculas se encuentran representadas en la Figura 1.9.

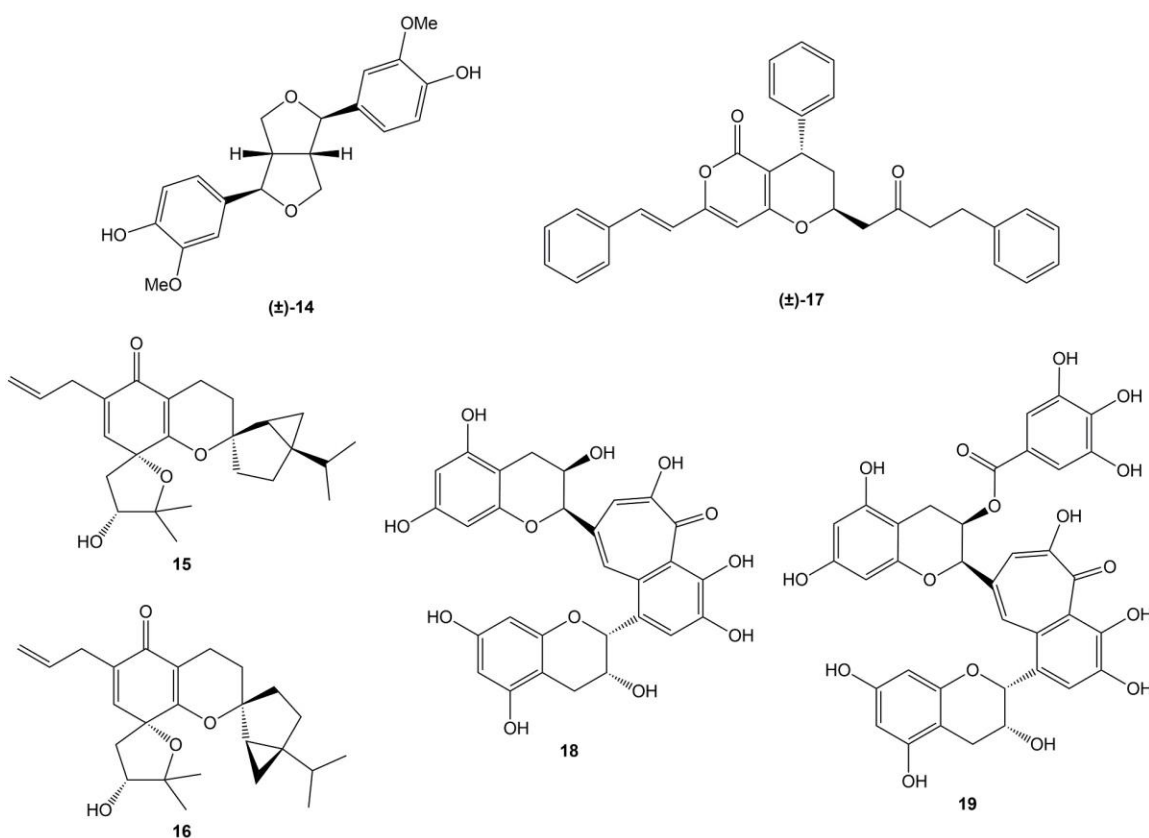


Figura 1.9. Metabolitos secundarios obtenidos por síntesis biomimética y con actividad contra virus de influenza.

De igual forma, se ha descrito la síntesis de algunas 1,4-naftoquinonas, metabolitos secundarios que también han exhibido actividad antiviral, incluyendo contra los virus de influenza (Dar *et al.*, 2021).

1.10. GENERALIDADES SOBRE LAS 1,4-NAFTOQUINONAS

Las 1,4-naftoquinonas son un grupo diverso de moléculas relacionadas estructuralmente con el naftaleno. Están constituidas por un anillo de benceno (anillo A) ligado a una dicetona cíclica conjugada (anillo B), cuyos grupos carbonilo están orientados en la posición *para* (Figura 1.10) (Meyer *et al.*, 2021).

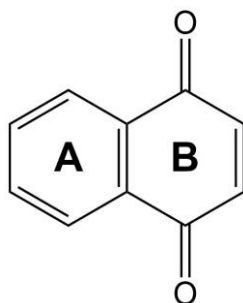


Figura 1.10. Estructura química de 1,4-naftoquinona.

La estructura de las 1,4-naftoquinonas contiene un sistema de dobles enlaces conjugados con los grupos carbonilo, por lo que estos compuestos son susceptibles a procesos de reducción, oxidación y adición de nucleófilos que poseen átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (Aminin y Polonik, 2020). En los seres vivos, la estructura base de una 1,4-naftoquinona generalmente está enlazada a uno o más grupos metilo, hidroxilo o metoxilo y en algunos casos, a una cadena lateral liposoluble. De acuerdo a estudios, la mayor variedad de estos productos naturales se localiza en las plantas, donde son sintetizados a través de distintas rutas biosintéticas: la vía del *o*-succinilbenzoato (OSB), la vía del homogentisato (HGA)/ácido mevalónico (MVA), la vía del ácido 4-hidroxibenzoico (4HBA)/geranil difosfato (GPP) y la vía del acetato/malonato (Widhalm y Rhodes, 2016).

Diversas investigaciones han evidenciado que la ruta del acetato/malonato (igualmente conocida como ruta de los policétidos) es la responsable de la producción de ciertas naftoquinonas monoméricas mediante la condensación de una unidad de acetil-coenzima A (acetil-CoA; **20**) con múltiples unidades de malonil-CoA (**21**) (Widhalm y Rhodes, 2016). En estas reacciones, la enzima policétido sintasa (PKS) cataliza la formación de enlaces C-C en un solo sitio activo por medio de una serie de etapas de descarboxilación, condensación y ciclación entre el sustrato **20** y los elongadores **21** (Flores-Sanchez y Verpoorte, 2009).

Posteriormente, el intermediario de tipo naftaleno postulado (**22**) sería oxidado para generar plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona; **1a**) o 7-metiljuglona (5-hidroxi-7-metil-1,4-naftoquinona; **23**). A su vez, **1a** podría ser oxidada para producir droserona (3,5-dihidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona; **24**), la cual sería metilada en uno de sus grupos hidroxilo para dar origen a 5-O-metildroserona (**25**). Sin embargo, aunque se ha propuesto que estas moléculas serían generadas de esta forma, aún no existe evidencia genética que compruebe cual es el mecanismo enzimático o que enzimas están implicadas en estos pasos (Widhalm y Rhodes, 2016). Las

reacciones involucradas en la biosíntesis propuesta para dichas naftoquinonas monoméricas se resumen en la Figura 1.11.

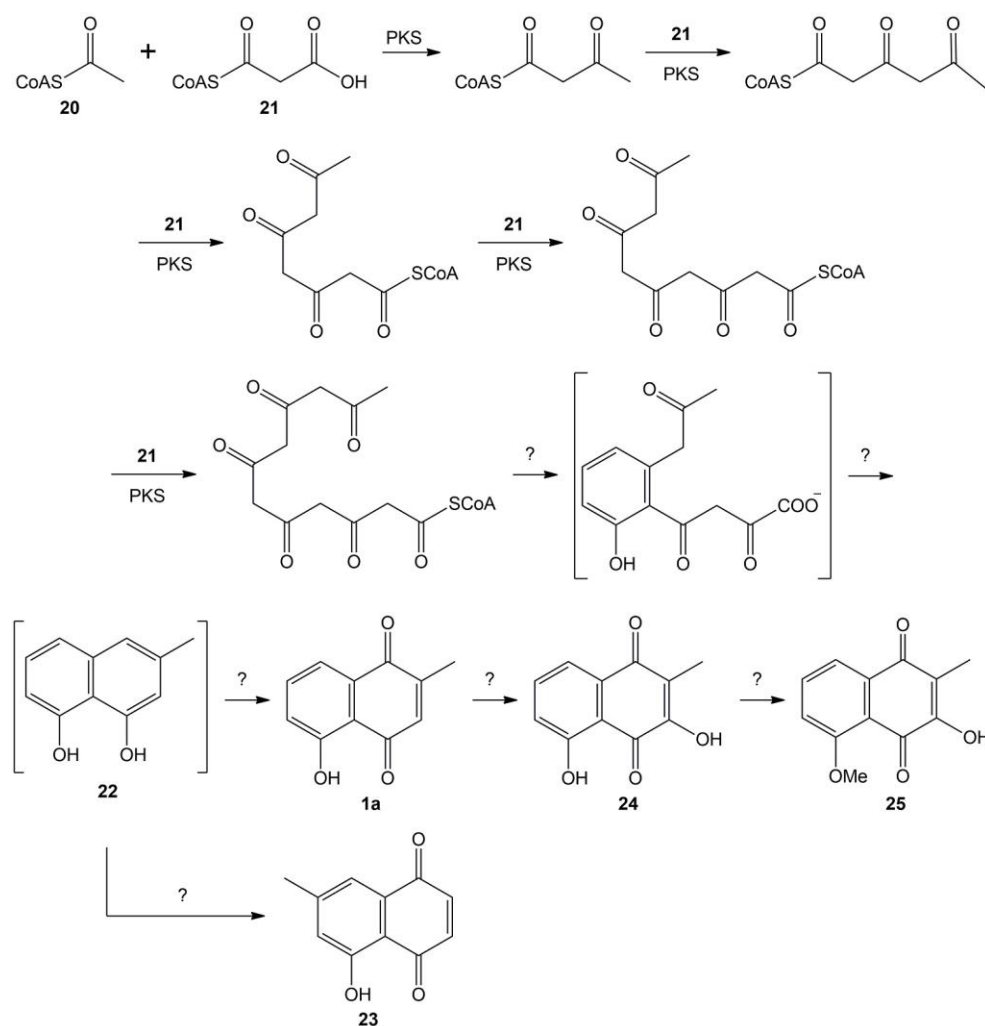


Figura 1.11. Reacciones químicas implicadas en la ruta de biosíntesis propuesta para naftoquinonas monoméricas (ruta del acetato/malonato; los signos de interrogación sobre las flechas negras indican que no se han descrito los mecanismos enzimáticos involucrados en estas reacciones).

Por otro lado, las 1,4-naftoquinonas pueden actuar como electrófilos en reacciones de adición de Michael debido a que poseen un doble enlace altamente deficiente en electrones en sus estructuras (Skrzyńska *et al.*, 2018). Además, las formas tautoméricas de las 1,4-naftoquinonas, denominadas 1,4-naftohidroquinonas o 1,4-dihidroxi-naftalenos, pueden actuar como nucleófilos y acoplarse con sus naftoquinonas correspondientes, produciendo dímeros (Kamo *et al.*, 2018a). Considerando esto, se ha propuesto que dicha ruta biosintética también podría dar origen a naftoquinonas diméricas tales como el epóxido de zeylanona (**1**) y la zeylanona (**2**); estas

moléculas serían producidas a partir de la dimerización de unidades de **1a** con sus respectivas formas tautoméricas mediante adiciones secuenciales de Michael intermoleculares e intramoleculares, seguidas por reacciones de oxidación en las hidroquinonas resultantes (Figura 1.12) (Maruo *et al.*, 2013).

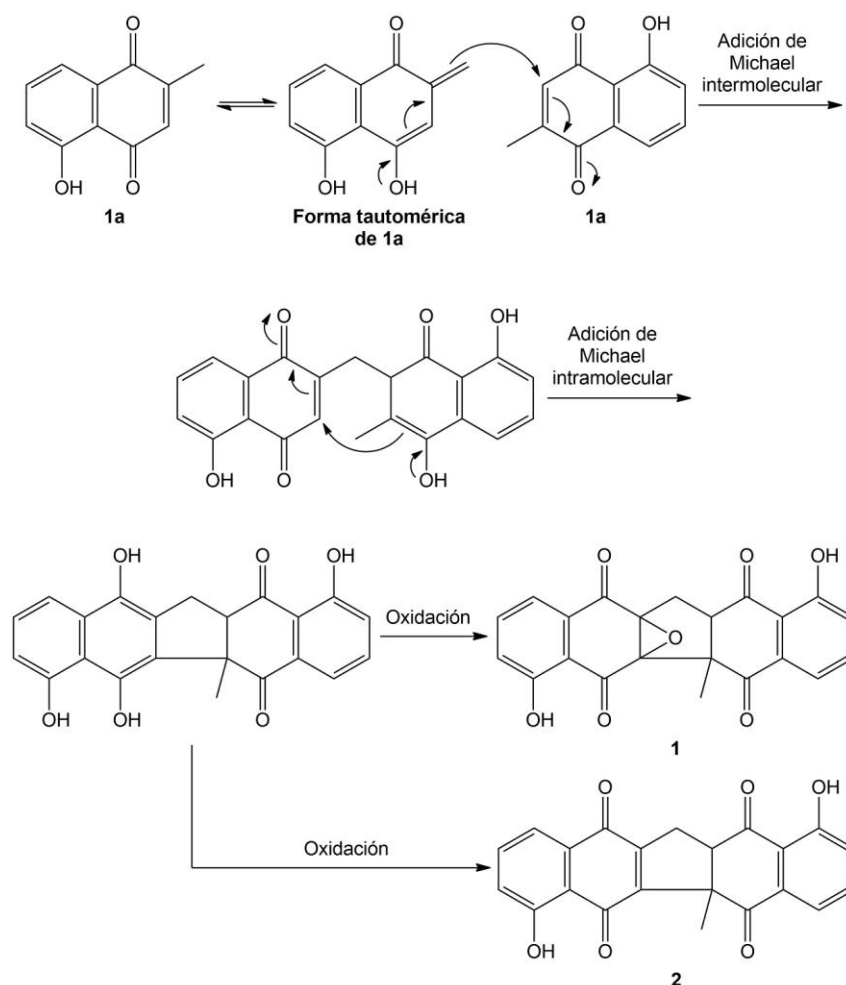


Figura 1.12. Reacciones químicas implicadas en la ruta de biosíntesis propuesta para las naftoquinonas diméricas de interés **1** (epóxido de zeylanona) y **2** (zeylanona).

1.11. SÍNTESIS BIOMIMÉTICA DE NAFTOQUINONAS

Las naftoquinonas se encuentran entre las estructuras carbocíclicas privilegiadas de la química orgánica. El potencial de funcionalización que presentan debido al grupo carbonilo y al doble enlace en sus estructuras les otorga una elevada utilidad sintética. Por lo tanto, el desarrollo de métodos para la construcción eficiente de estas moléculas constituye actualmente un objetivo de gran importancia en la química orgánica (Skrzyńska *et al.*, 2018).

En la síntesis de 1,4-naftoquinonas, se ha descrito que la naftazarina (5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona; **27**) puede ser preparada en grandes cantidades con un mecanismo de síntesis que consta de tres pasos, comenzando con una doble acilación de Friedel-Crafts entre 1,4-dimetoxibenceno (**3a**) y anhídrido dicloromaleico (**26**). Seguidamente, una reacción de decoloración reductiva y una oxidación básica de la leuconaftazarina obtenida lidera la generación del producto de interés **27** (Dessolin *et al.*, 2001).

En otro estudio, Novikov *et al.* (2016) obtuvieron las cloronaftazarinas 2,3,6-tricloro-5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (**30**) y 2,3,6,7-tetracloro-5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (**31**) por medio de reacciones de doble acilación de Friedel-Crafts entre el anhídrido **26** y 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno (**28**) o 2,3-dicloro-1,4-dimetoxibenceno (**29**) como precursores. De igual forma, Schroeder *et al.* (2019) sintetizaron los derivados metilados 5,8-dihidroxi-6-metil-1,4-naftoquinona (**34**) y 5,8-dihidroxi-2,7-dimetil-1,4-naftoquinona (**35**) a partir de anhídrido maleico (**33**) o su análogo anhídrido 2-metilmaleico (**4**) con 2-metil-1,4-dimetoxibenceno (**32**).

Por último, también se ha reportado la síntesis de la naftoquinona 2-metilnaftazarina (5,8-dihidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona; **3b**), un producto natural conocido como ramentona y presente en *Diospyros lycioides* (Rauf *et al.*, 2017). Schroeder *et al.* (2016) sintetizaron esta molécula a través de una doble acilación de Friedel-Crafts, partiendo del anhídrido **4** y el compuesto **3a** en presencia de cloruro de sodio (NaCl) y AlCl_3 a altas temperaturas, seguido de una reacción de demetilación con ácido clorhídrico (HCl) a 0°C . Las estructuras químicas de estas naftoquinonas sintetizadas por reacciones de doble acilación de Friedel-Crafts y sus precursores se encuentran representadas en la Figura 1.13.

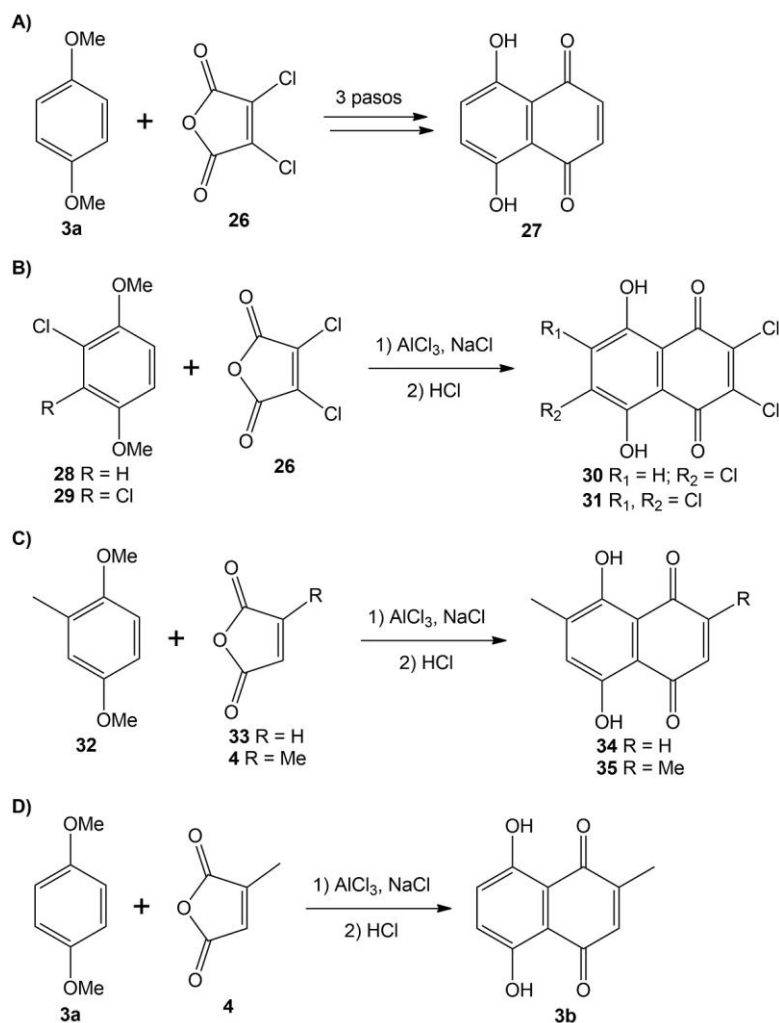


Figura 1.13. Naftoquinonas monoméricas sintetizadas por medio de reacciones de doble acilación de Friedel-Crafts. **A)** Síntesis de **27** (naftazarina). **B)** Síntesis de cloronaftazarinas **30** y **31**. **C)** Síntesis de derivados metilados **34** y **35**. **D)** Síntesis de **3b** (ramentona).

Como se mencionó anteriormente, las 1,4-naftoquinonas pueden dar lugar a productos diméricos. No obstante, estas moléculas se dimerizan de varias maneras, dependiendo de sus estructuras y otras condiciones. Esto hace que los productos de las dimerizaciones sean difíciles de pronosticar o controlar, por lo que se han descrito pocos métodos de síntesis eficaces y selectivos para naftoquinonas diméricas (Kamo *et al.*, 2018a). Diversos estudios han reportado la síntesis de dímeros aprovechando que las 1,4-naftoquinonas actúan como electrófilos en adiciones de Michael debido al doble enlace deficiente en electrones en su estructura (Skrzyńska *et al.*, 2018).

En este sentido, Kamo *et al.* (2018b) lograron la síntesis biomimética de la juglorubina (**37**) en cuatro etapas. Esta naftoquinona (previamente aislada de cultivos de *Streptomyces* sp. 3094, 815 y GW4184) fue producida por medio de adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares de juglomycin C (**36**), seguidas de reacciones de oxidación, transformación estructural (en una solución tampón de fosfatos) y deshidratación del alcohol secundario producido.

Del mismo modo, Kamo *et al.* (2016) emplearon el compuesto **39** (un derivado de **36** con un sustituyente *tert*-butildimetilsilil éter u OTBS y grupos hidroxilo protegidos como metoximetil éter o MOMO) para la síntesis de jugloresceína (**40**) y los tautómeros juglocombina A (**41**) y juglocombina B (**42**), metabolitos también encontrados en *Streptomyces* sp. 815 y GW4184. Considerando que el análogo **39** fue generado en tres pasos a partir del bromuro de alilo **38**, la síntesis de la naftoquinona **40** se llevó a cabo en nueve pasos, mientras que se requirieron doce pasos para la síntesis de **41** y **42** (obtenidos como una mezcla tautomérica en equilibrio), con reacciones de dimerización intermedias compuestas por adiciones de Michael secuenciales.

Finalmente, en otra investigación realizada por Kamo *et al.* (2019), se reportó la síntesis de los estereoisómeros de las juglocombina **41** y **42** (compuestos **43** y **44**, respectivamente), en un total de nueve pasos. Los productos fueron obtenidos partiendo de la dimerización del análogo **39**, así como diversas reacciones de reducción, metilación, oxidación y desprotección. Las estructuras de estas naftoquinonas sintetizadas por adiciones de Michael y sus precursores se resumen en la Figura 1.14.

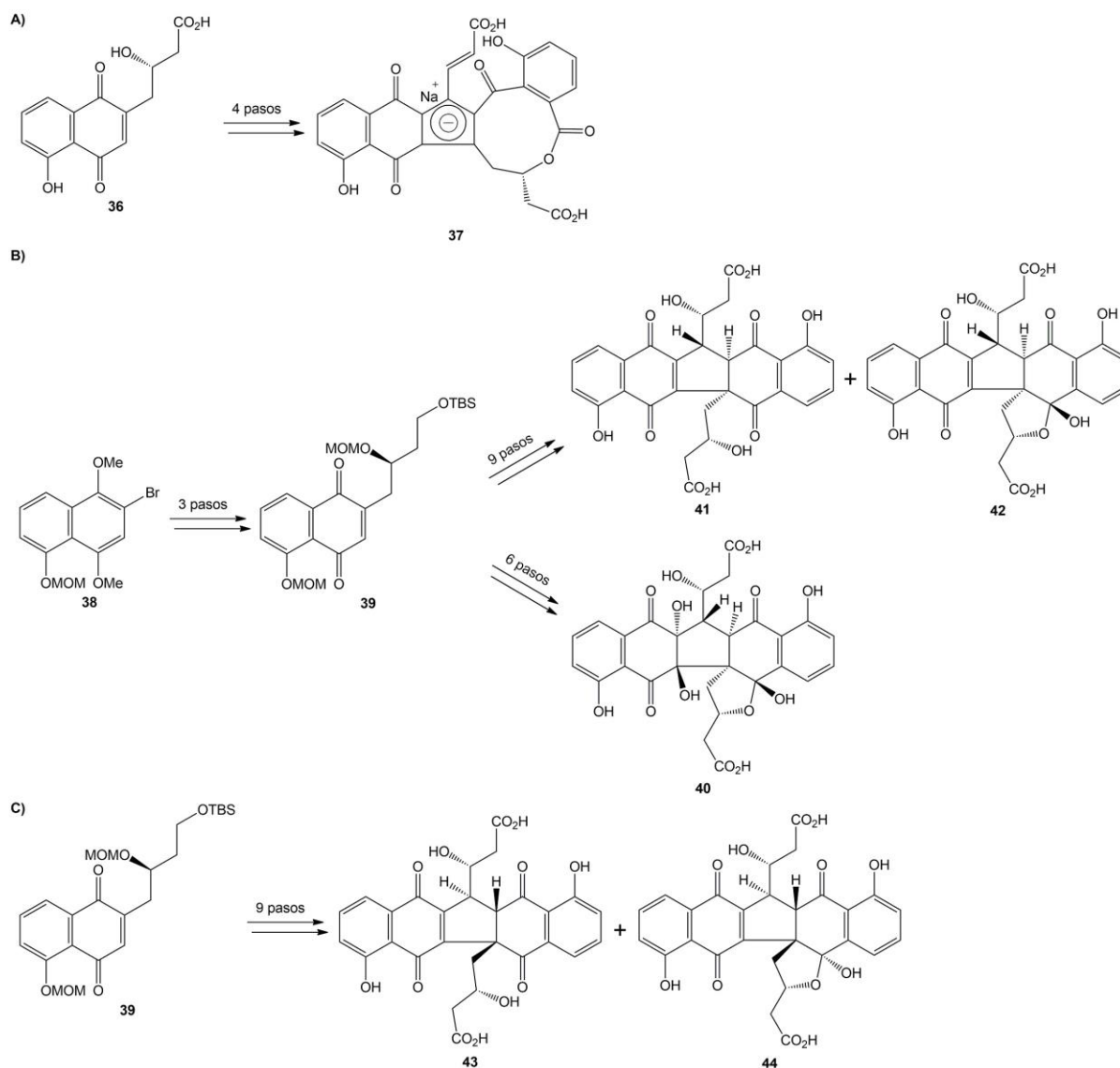


Figura 1.14. Naftoquinonas diméricas obtenidas a través de adiciones de Michael secuenciales. **A)** Síntesis de **37** (juglorubina). **B)** Síntesis de **40** (jugloresceína), **41** (juglocombina A) y **42** (juglocombina B). **C)** Síntesis de estereoisómeros **43** y **44**.

1.12. NAFTOQUINONAS CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Aunado a sus propiedades químicas, diversas investigaciones han demostrado que las 1,4-naftoquinonas poseen propiedades antivirales interesantes. A nivel *in vitro*, se ha reportado que las rinacantinas C (**45**), D (**46**), N (**47**) y Q (**48**) obtenidas de las raíces de *Rhinacanthus nasutus* por Ngoc *et al.* (2019) inhibieron la actividad del virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), con valores de IC₅₀ de 0.3-23.7 μ M. Previamente, estas moléculas no mostraron toxicidad significativa en células Vero (CC₅₀ = 25.89 y >50 μ M). Pang *et al.* (2021) obtuvieron el compuesto

poligodoquinona A (**49**) de las raíces de *Polygonatum odoratum* y determinaron que esta naftoquinona enlazada a una antraquinona posee actividad contra el virus de influenza A/WSN/33 (H1N1), con IC_{50} de 11.4 μ M. Por otra parte, Uddin *et al.* (2016) aislaron 2-metoxi-6-acetil-7-metiljuglona (**50**) de las raíces de *Polygonum cuspidatum* y mostraron que este metabolito inhibió la actividad de la NA de *Clostridium perfringens* (IC_{50} = 8.9 μ M).

En otro trabajo, Yang *et al.* (2015) evaluaron la actividad de las shikometabolinas E (**51**) y F (**52**) de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon* contra la NA de *C. perfringens* y demostraron que estas naftoquinonas también inhibieron las funciones de la enzima (IC_{50} = 1.91 y 2.79 μ g/mL). Kim *et al.* (2012) obtuvieron las 1,4-naftoquinonas shikonina (**53**), acetilshikonina (**54**), isobutilshikonina (**55**), β,β -dimetilacrilshikonina (**56**), β -hidroxiisovalerilshikonina (**57**) y deoxishikonina (**58**) de las raíces de *L. erythrorhizon* y determinaron que son capaces de inhibir la actividad de la NA de *C. perfringens* y del virus de influenza A/Bervig_Mission/1/18 (H1N1). Todos los productos naturales exhibieron actividad inhibidora en las proteínas bacteriana (IC_{50} = 1.9-53.8 μ M) y viral (IC_{50} = 34.1-63.4 μ M). Las estructuras de estas 1,4-naftoquinonas se encuentran representadas en la Figura 1.15.

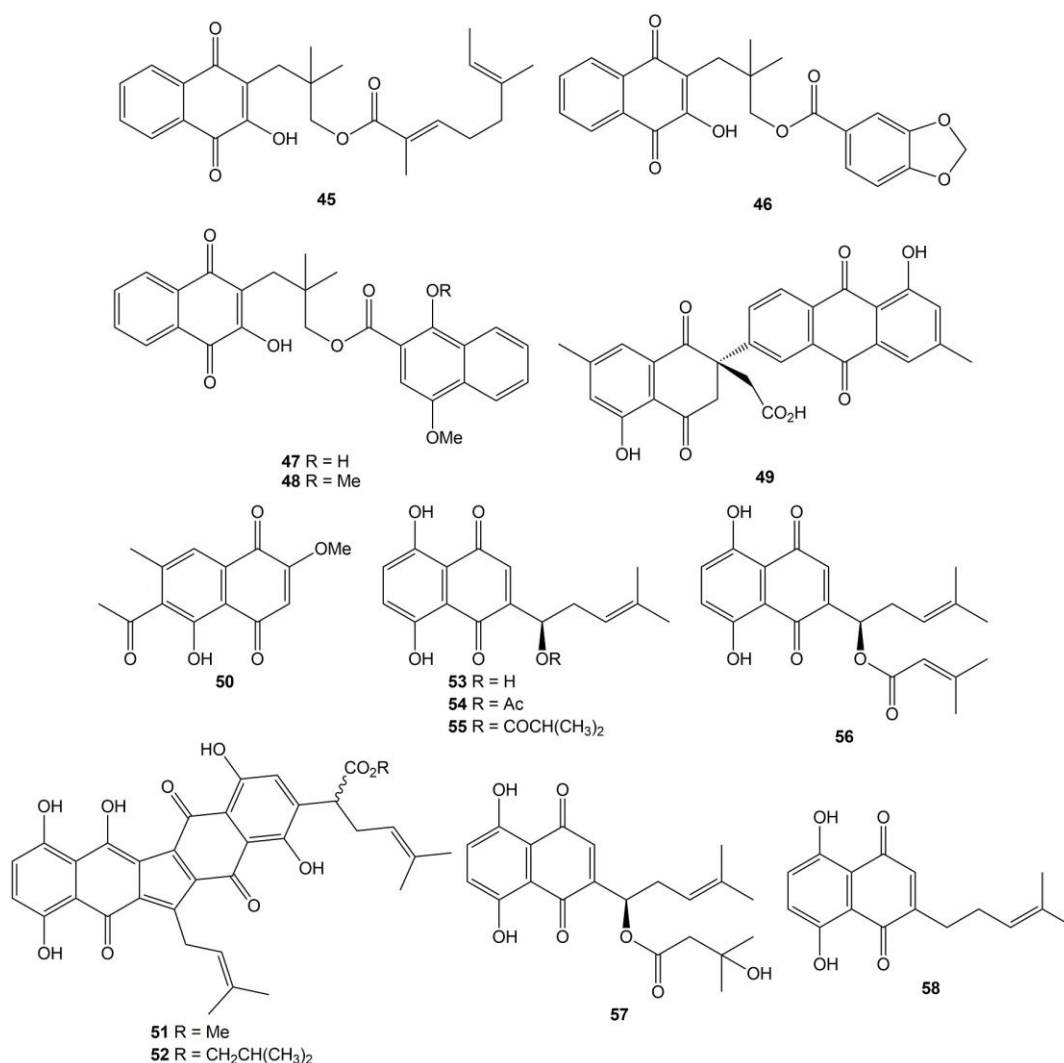


Figura 1.15. Naftoquinonas aisladas de fuentes vegetales con actividad contra virus de influenza.

No obstante, aún con los antecedentes previos, las investigaciones con naftoquinonas sintéticas y con actividad antiviral son limitadas. En uno de dichos estudios, Tandon *et al.* (2004) sintetizaron ácido 3-((5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinon-2-il)tio)propanoico (**59**) y 2-hidroxi-3-feniltio-1,4-naftoquinona (**60**). Para el compuesto **59**, partieron de la naftazarina **27**, en una reacción con ácido 3-mercaptopropanoico y etanol (EtOH), mientras que para la síntesis de **60** emplearon lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) con bencenotiol y EtOH. Estos autores demostraron que los derivados sintéticos **59** y **60** inhibieron una cepa viral de influenza A, con 52 y 50% de inhibición, respectivamente.

Asimismo, Yamashita *et al.* (2021) obtuvieron diversas furanonaftoquinonas por medio de reacciones de síntesis y evaluaron la actividad antiviral del compuesto 2-(1-fluoroetil)-5-hidroxi[2,3-*b*]furan-4,9-naftoquinona (**61**). Este derivado fluorado fue sintetizado a partir de (-)-5-

hidroxi-2-(1'-hidroxietil)-[2,3-*b*]furan-4,9-naftoquinona, una molécula presente en *Tabebuia avellanedae*, en una reacción con diclorometano (CH_2Cl_2) y Deoxo Fluor® a 0°C. Asimismo, **61** mostró actividad contra el virus de influenza A/Iowa/15/30 (H1N1) de origen porcino, con un 35% de inhibición.

Sharma *et al.* (2018) generaron análogos de 3,3'-(arilmetilen)bis(2-hidroxi-1,4-naftoquinona) (**62**) a partir de lawsona, aldehídos aromáticos sustituidos y cloruro de litio (LiCl), en agitación constante durante 12 h. Estos derivados diméricos fueron evaluados en ensayos *in vitro* contra la NA de *C. perfringens* y los resultados evidenciaron que las moléculas inhibieron las funciones de la proteína, con porcentajes de inhibición de 70.9-96.6%. Entonces, se seleccionaron los diez análogos con los porcentajes de inhibición >80% y se analizó su actividad contra la NA de un virus de influenza A H5N1; los derivados **62a** y **62b** exhibieron los valores de IC_{50} más bajos (29 y 26.5 μM , respectivamente). Posteriormente, simulaciones de acoplamiento molecular mostraron que **62b** interactuó con aminoácidos del sitio activo de la NA del virus de influenza A H5N1.

Finalmente, Wang *et al.* (2014) reportaron la síntesis de (R)-1-(5,8-dihidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftoquinon-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il-3-(1H-indol-3-il) propanoato (**63**), un análogo esterificado del producto natural **53**. El derivado **63** se sintetizó partiendo de la shikonina **53** y ácido 3-(1H-indol-3-il)propanoico, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en CH_2Cl_2 , en agitación constante por 12 h. Luego, Zhang *et al.* (2017) mostraron que la naftoquinona **63** promovió la viabilidad celular en células A549 y MDCK infectadas con el virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1), con CC_{50} de 316 y 730 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A su vez, el derivado sintético provocó una reducción en el rendimiento viral e inhibió la replicación de la cepa viral de una manera dependiente de la concentración. Los autores evaluaron el efecto de **63** sobre otros objetivos virales y encontraron que inhibió la actividad de la NA (análisis *in silico* mostraron que **63** puede unirse de forma específica a los sitios activos de esta proteína), así como un decremento en los niveles de expresión de la NP viral. Las estructuras químicas de estos compuestos se ilustran en la Figura 1.16.

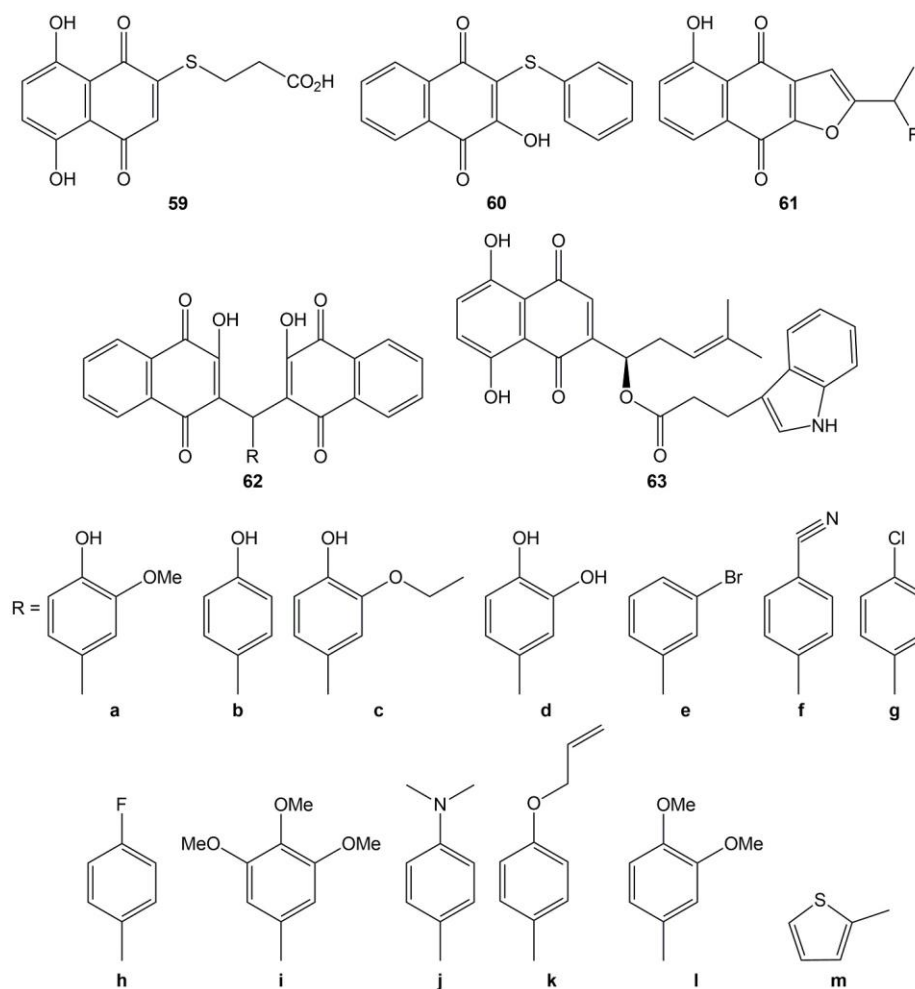


Figura 1.16. Naftoquinonas sintéticas con actividad contra virus de influenza.

También se ha descrito el mecanismo de síntesis biomimética de la naftoquinona dimérica **1** y su análogo **2** (Maruo *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que el epóxido **1** aislado de *D. anisandra* posee actividad contra virus de influenza A y B (Cetina-Montejo *et al.*, 2019).

1.13. GENERALIDADES SOBRE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (**1**) Y ZEYLANONA (**2**)

El epóxido **1** fue aislado por primera vez de la corteza del tallo de *D. anisandra*, planta perteneciente a la familia Ebenaceae y endémica de la Península de Yucatán, utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de granos e inflamación. Este compuesto forma parte de la composición química de *D. anisandra* junto con otras quinonas tales como *cis*-isoshinanolona (**64**), quitranona (**65**), 3,3'-biplumbagina (**66**), eliptinona (**67**), **24** y **1a** (Figura 1.17) (Uc-Cachón *et al.*, 2013). Con respecto al rendimiento, se ha reportado que de 951 g de la corteza del tallo de *D. anisandra* se obtuvieron 4.3 mg de **1** (Cetina-Montejo *et al.*, 2019).

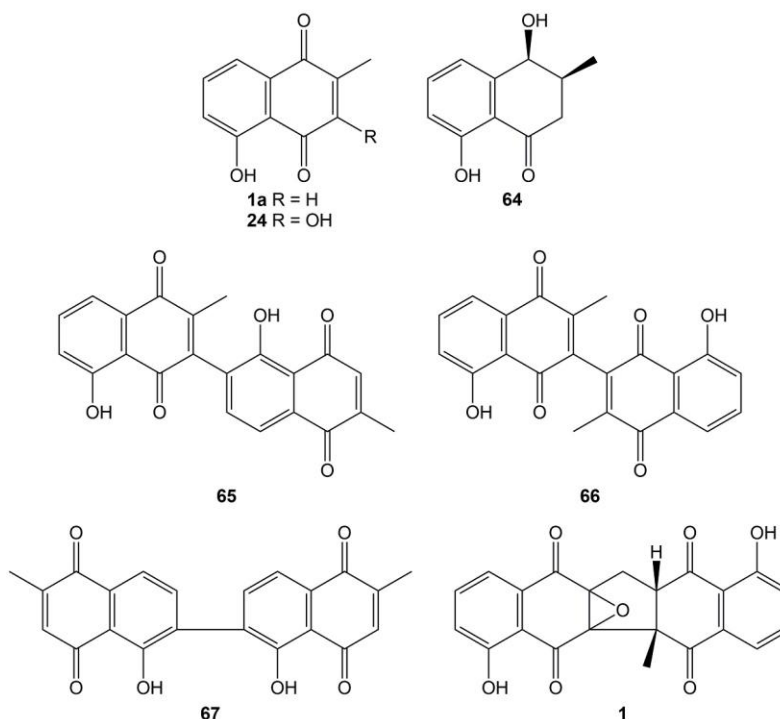


Figura 1.17. Naftoquinonas presentes en *D. anisandra*.

Por otro lado, la naftoquinona dimérica **2** fue identificada en la corteza de *Diospyros maritima*, otra especie de la familia Ebenaceae y autóctona del sureste asiático, usada tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades reumáticas. El rendimiento para este compuesto fue de 3.4 mg, partiendo de 892 g de la corteza de *D. maritima* (Gu *et al.*, 2004). De igual forma, **1** y **2** también se encontraron en la raíz de *Plumbago zeylanica*, una planta de la familia Plumbaginaceae empleada en la medicina tradicional de África y Asia; en total, se aislaron 2.8 mg de **1** y 4.2 mg de **2** a partir de 656 g de la raíz de especie vegetal (Ito *et al.*, 2018).

Respecto a la estereoquímica de estos compuestos, Gu *et al.* (2004) realizaron análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) para confirmar la estructura de **2**; no obstante, las configuraciones relativas del grupo metilo en la posición C-11 y el protón H-3 no se pudieron corroborar (Figura 1.18). Previamente, Sankaram *et al.* (1979) determinaron los valores de rotación óptica de **2** obtenido de manera natural y describieron que fue aislado como mezcla racémica. En el caso del epóxido **1**, Uc-Cachón *et al.* (2013) definieron su estructura mediante diversos análisis de RMN y establecieron la relación *sin* entre el grupo metilo en C-11 y el protón H-3 por medio de espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (NOESY). Por el contrario, la relación estereoquímica existente entre el metilo en C-11 y H-3 con el anillo epóxido no se pudo corroborar.

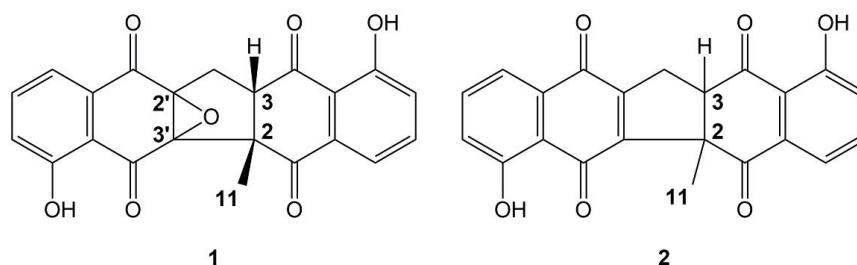


Figura 1.18. Configuraciones relativas de **1** (epóxido de zeylanona) y **2** (zeylanona).

Tomando en cuenta lo anterior, recientemente se ha planteado un esquema de síntesis biomimética para **1** y **2**, considerando la ruta de biosíntesis propuesta para dichas naftoquinonas diméricas (Maruo *et al.*, 2013).

1.14. SÍNTESIS BIOMIMÉTICA DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (**1**) Y DERIVADOS

La síntesis del epóxido **1** y su análogo **2** ha sido reportada por Maruo *et al.* (2013). Esta consistió en la protección del grupo hidroxilo de **1a** con cloruro de metoximetilo (MOMCl), ya que los autores comprobaron que **1a** es susceptible de descomposición bajo las condiciones básicas de dimerización (Figura 1.19). Primero se disolvió **1a** en N,N-dimetilformamida (DMF) anhidra y se mantuvo en agitación constante a 0°C, en presencia de una base fuerte como hidruro de sodio (NaH) al 60% en aceite de parafina; posteriormente, se adicionó MOMCl y se mantuvo en agitación a la misma temperatura. El derivado 5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**1b**) obtenido fue sometido a un proceso de dimerización con hidróxido de potasio (KOH) en metanol (MeOH) y CH₂Cl₂, bajo atmósfera de oxígeno molecular (O₂) y a 0°C. Finalmente, la desprotección de los grupos metoximetilo en (**±**)-**1c** con AcOH a 100°C dio como resultado (**±**)-**1**, mientras que (**±**)-**2** fue sintetizado después de tratar (**±**)-**1c** con yoduro de potasio (KI) en AcOH bajo una atmósfera de nitrógeno molecular (N₂) y a 100°C, seguido de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (*p*-TsOH·H₂O) en tolueno y a 70°C. El compuesto (**±**)-**1** se obtuvo en tres pasos (0.12 g, 54% de rendimiento) y (**±**)-**2** en cuatro etapas (0.22 g, 59% de rendimiento), partiendo de 0.52 g de **1a**.

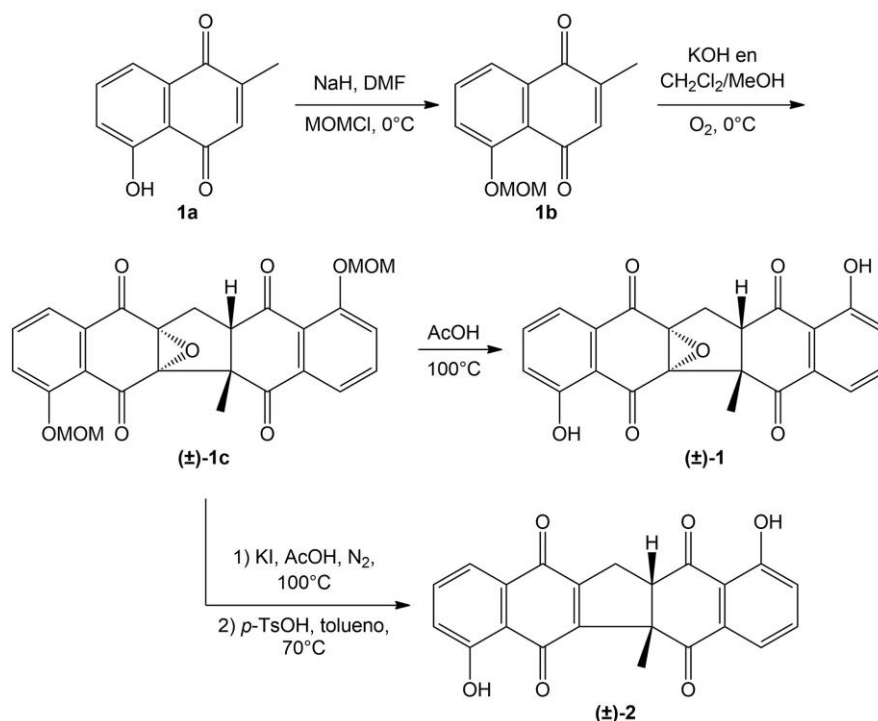


Figura 1.19. Síntesis biomimética de **(±)-1** (epóxido de zeilanona) y **(±)-2** (zeilanona) a partir de **1a** (plumbagina).

En este mismo estudio, Maruo *et al.* (2013) obtuvieron por cristalografía de rayos X la estructura de un derivado de **(±)-1** (compuesto **(±)-69**), el cual fue sintetizado en una reacción de dimerización con vitamina K₃ (2-metil-1,4-naftoquinona; **68**), en presencia de hidróxido de sodio (NaOH) 5 M en EtOH, bajo una atmósfera aeróbica y a -78°C (Figura 1.20). A partir de **(±)-69** se comprobó la estereoquímica de **(±)-1c**, **(±)-1** y **(±)-2**, observando una relación *sin* entre el grupo metilo en C-11 con H-3, así como una relación *anti* entre éstos con el grupo epóxido (posiciones 2' y 3') en **(±)-1c** y **(±)-1**. Estos investigadores también verificaron que la estrategia de síntesis biomimética empleada dio como resultado mezclas racémicas para cada uno de los productos, mediante la separación de los dos enantiómeros de **(±)-2** y la determinación de su configuración absoluta por dicroísmo circular. El compuesto **(±)-2** fue esterificado con el agente quiral cloruro (1*S*,4*R*)-canfánico en presencia de trietilamina (Et₃N). Los diastereómeros resultantes fueron separados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), disueltos en 1,4-dioxano y sometidos a una hidrólisis ácida, dando como resultado los enantiómeros **(+)-2** y **(-)-2**.

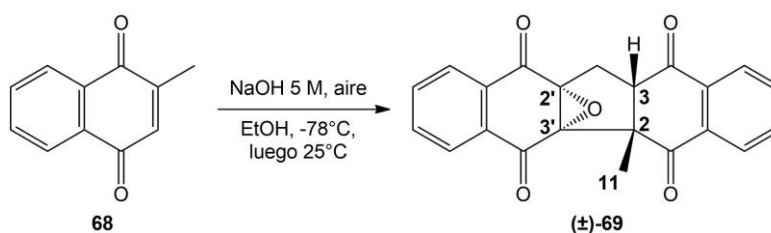


Figura 1.20. Síntesis de compuesto (±)-69.

Teniendo en consideración los antecedentes previos, para lograr la síntesis de una de las moléculas evaluadas en esta investigación primero se sintetizó el intermediario **3b** por medio de una doble acilación de Friedel-Crafts. En la acilación de Friedel-Crafts típica, un cloruro de acilo reacciona con benceno (o un derivado activado de éste) en presencia de AlCl_3 y da como resultado una fenilcetona o acilbenceno (Wade, 2004). En la síntesis de **3b** se empleó la reacción de Haworth, que consiste en una primera acilación de Friedel-Crafts intermolecular entre anhídrido succínico o un derivado del mismo (la reactividad de estos anhídridos es similar a la de un cloruro de acilo) con un compuesto aromático y AlCl_3 ; seguidamente, una segunda acilación de Friedel-Crafts intramolecular genera el producto de interés (Li, 2013).

El mecanismo inicia con una reacción entre el anhídrido **4** y AlCl_3 , generándose un complejo que sufre un rearrreglo y da lugar a un ion acilo (**70**). En la primera acilación de Friedel-Crafts, el ion **70** sufre un ataque nucleofílico por el precursor aromático **3a** y se forma el catión **71**, estabilizado por resonancia; la aromaticidad del anillo se recupera debido a una desprotonación. Entonces, una serie de rearrreglos da origen a otro ion acilo (**72**), en el cual se lleva a cabo la segunda acilación de Friedel-Crafts; la aromaticidad del anillo del catión obtenido (**73**) se recupera de nueva cuenta por desprotonación (De, 2021). Por último, **3b** se obtuvo a través de una demetilación en el intermediario **74** con HCl a 0°C (Schroeder *et al.*, 2016). El mecanismo de reacción implicado en la doble acilación de Friedel-Crafts para la síntesis de **3b** se resume en la Figura 1.21.

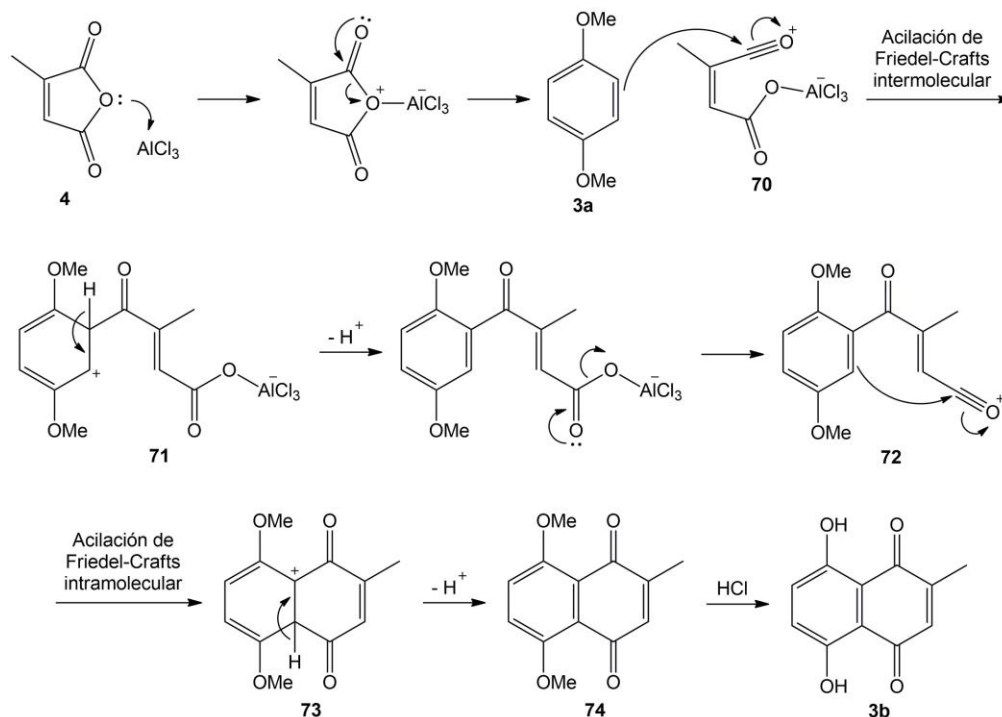


Figura 1.21. Doble acilación de Friedel-Crafts en la síntesis de **3b** (ramentona).

Posteriormente se procedió con la síntesis de **1**, **2** y el derivado **3**. Se protegieron los grupos hidroxilo de las naftoquinonas monoméricas **1a** y **3b** con MOMCl, obteniéndose los compuestos **1b** y 5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**3c**), respectivamente. Luego se realizaron las reacciones de dimerización a partir de dichas moléculas, las cuales involucraron adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares producidas de manera secuencial (Maruo *et al.*, 2013). Estas reacciones comprenden el ataque de un nucleófilo al carbono β de un compuesto carbonílico α,β -insaturado (adición 1,4), derivando en la adición del nucleófilo y de un átomo de hidrógeno al doble enlace conjugado con el grupo carbonilo (Wade, 2004).

Aunque Maruo *et al.* (2013) no lo resaltan, se ha demostrado que los centros estereogénicos de otras naftoquinonas diméricas son generados en un solo paso, como producto de las adiciones de Michael (Kamo *et al.*, 2016). Por lo tanto, es probable que los cuatro centros quirales en ($\pm$)-**1c** y ($\pm$)-**3d** sean resultado de dicho mecanismo; la formación del primer centro estereogénico (C-3) se da en la adición de Michael intermolecular, mientras que los otros tres centros quirales (C-2, 2' y 3') se generan en la adición de Michael intramolecular. Esta última adición se produce tomando en cuenta el primer estereocentro, quedando una conformación *sin* entre H-3 y el grupo metilo en C-11, así como una relación *anti* entre éstos con el grupo epóxido en 2' y 3' (R. Marrero-Carballo, comunicación personal, 30 de enero de 2020). La epoxidación es producto de la

oxidación de las hidroquinonas resultantes bajo atmósfera de O_2 y ocurre desde el lado estéricamente menos impedido en la molécula (Kamo *et al.*, 2019). Finalmente, los grupos metoximetilo presentes en los anillos aromáticos de los dímeros **(±)-1c** y **(±)-3d** se desprotegeron con AcOH, obteniendo **(±)-1** y su derivado **(±)-3**. A su vez, **(±)-1c** fue tratado con KI en medio ácido (AcOH) y bajo atmósfera de N_2 para la desprotección de los grupos metoximetilo; el alcohol generado se mantuvo en agitación constante con *p*-TsOH·H₂O y tolueno (condiciones que favorecen la apertura del anillo epóxido y la formación de un doble enlace), dando como resultado **(±)-2** en dos pasos (Maruo *et al.*, 2013). Los mecanismos involucrados en las adiciones de Michael para la síntesis del epóxido **(±)-1** y sus análogos **(±)-2** y **(±)-3** se representan en la Figura 1.22.

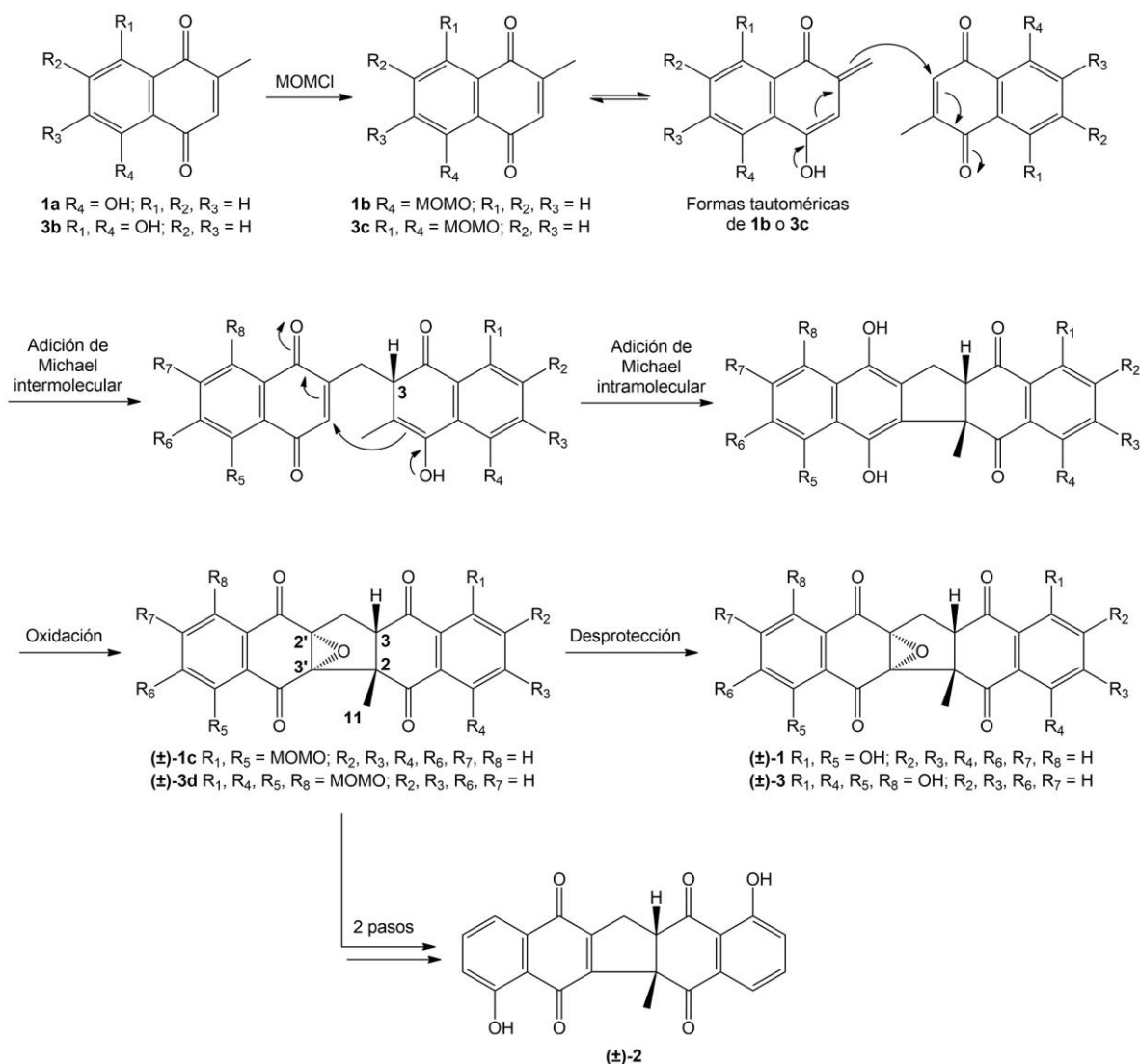


Figura 1.22. Adiciones de Michael en la síntesis de **(±)-1** (epóxido de zeylanona), **(±)-2** (zeylanona) y el derivado **(±)-3**.

1.15. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (1) Y ZEYLANONA (2)

Diversos estudios han reportado la actividad de estas naftoquinonas en varios modelos biológicos. Respecto a **2**, Gu *et al.* (2004) aislaron este compuesto de la corteza de *D. maritima* y comprobaron que fue citotóxico en las líneas celulares KB (carcinoma epidermoide oral humano), LNCaP (cáncer de próstata hormonodependiente humano) y Lu1 (cáncer de pulmón humano), con valores de EC₅₀ de 2.1-14.5 µg/mL. Asimismo, estos autores determinaron que **2** posee actividad antimicrobiana de amplio espectro, ya que inhibió el crecimiento de *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium avium*, *M. smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 3-200 µg/mL.

Por otra parte, Ito *et al.* (2018) demostraron que **2** obtenido de la raíz de *P. zeylanica* tuvo actividad citotóxica en otras líneas celulares de cáncer, como NALM-6 (leucemia de células B humanas), Colo205 (adenocarcinoma humano colorrectal) y A549, con valores de IC₅₀ de 0.88-11.44 µM. En esta investigación se observó que el epóxido **1** aislado de la misma planta también fue citotóxico sobre las células NALM-6 (IC₅₀ = 3.75 µM). Igualmente, Uc-Cachón *et al.* (2014) reportaron que **1** aislado de la corteza del tallo de *D. anisandra* presentó propiedades antimicrobianas, puesto que inhibió el crecimiento de dos cepas de *M. tuberculosis*, H37Rv susceptible a antibióticos (MIC = 25 µg/mL) y CIBIN/UMF15:99 resistente a antibióticos (MIC = 12.50 µg/mL).

Además, **1** ha evidenciado ser una molécula privilegiada ya que su bioactividad se ha visto reflejada en otros modelos biológicos de importancia, razón por la cual se ha patentado su uso. Esta naftoquinona mostró efectos neuroprotectores en modelos de Parkinson con células SH-SY5Y (neuroblastoma) y de esclerosis lateral amiotrófica con células NSC-34 (células híbridas neuronales). El compuesto **1** tampoco presentó hepatotoxicidad en células Fa2N4 (hepatocitos humanos) y HepG2 (carcinoma hepático), cardiotoxicidad en células HEK293 (riñón humano) y efectos inhibitorios sobre las isoformas enzimáticas CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9 del citocromo P450 (Ayora Talavera *et al.*, 2017, patente número MX/a/2017/000486). Este último resultado es fundamental puesto que las enzimas del citocromo P450 son responsables del metabolismo de numerosos xenobióticos y se ha observado que sus funciones pueden incrementar o disminuir debido a muchos fármacos. La inhibición de las enzimas del citocromo P450 es una de las causas de toxicidad inducida por medicamentos a través de interacciones entre los mismos y por ende, en la industria farmacéutica se han incluido a los ensayos de inhibición del citocromo P450 como

herramientas clave en el esquema para la detección y selección de compuestos candidatos a fármacos (Lee y Kim, 2013).

Finalmente, hay estudios que indican que tanto **1** como **2** poseen potencial actividad antiviral. Para **2**, los trabajos se limitan a experimentos *in silico* de Olubiyi *et al.* (2020), Bhuia *et al.* (2021) y Semenov y Krivdin (2022), quienes mostraron mediante análisis de acoplamiento molecular que **2** es capaz de interactuar con las proteínas proteasa similar a 3-quimotripsina o 3CL^{pro} (conocida también como proteasa principal o M^{pro}), proteasa similar a papaína (PL^{pro}) y ARN polimerasa del virus SARS-CoV-2. Igualmente, una investigación reciente llevada a cabo por Cetina-Montejo *et al.* (2019) mostró que el epóxido **1** inhibió la replicación de los virus de influenza A y B, como se detalla a continuación.

1.16. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA (**1**)

Como se describió anteriormente, Cetina-Montejo *et al.* (2019) determinaron la actividad citotóxica y antiviral de **1** obtenido del extracto hexánico de la corteza del tallo de *D. anisandra*. Esta molécula no ejerció efectos citotóxicos significativos en células MDCK a bajas concentraciones (CC₅₀ = 21.70 µM) e inhibió la replicación de los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1-H275Y) pdm (cepa resistente a oseltamivir), A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria), con valores de IC₅₀ de 0.65, 2.77, 1.6 y 2.22 µM, respectivamente.

Mediante ensayos de tiempos de adición, los autores determinaron en que pasos del ciclo de replicación actuó el metabolito **1**. En ensayos de un solo ciclo replicativo, notaron que **1** (a una concentración de 12.5 µM) redujo de manera significativa el rendimiento de los virus de influenza A y B; aunque se observó un mayor efecto entre 0-6 h después de la infección, la actividad inhibitoria máxima se notó durante las primeras 4 h, lo que sugirió que podría actuar ya sea en etapas tempranas (internalización o fusión) o intermedias (transporte nuclear o replicación).

Por otro lado, los experimentos con múltiples ciclos de replicación demostraron que el epóxido (a la misma concentración evaluada) ejerció un efecto inhibitorio proporcional al tiempo en el cual estuvo en contacto con el virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, alcanzando el 100% de inhibición cuando el virus fue tratado con el compuesto antes de la infección y cuando se adicionó el compuesto después de la infección viral. Por ende, los resultados de estos ensayos sugirieron que **1** podría actuar ya sea a través de una unión directa con el virus o bloqueando

alguna etapa después de la adsorción viral (procesos de transporte nuclear de las RNPv, replicación, entre otros).

Por último, esta naftoquinona no causó un efecto en la actividad de las proteínas HA y NA, pero si ocasionó una disminución en la cantidad de copias del segmento génico que codifica para la NP viral, con una inhibición mayor al 90%. Por lo tanto, por medio de ensayos de IFI, en este mismo estudio se evaluó el efecto de **1** sobre la distribución intracelular de la NP viral, a las 4, 6 y 8 h después de la infección con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm y A/Sydney/5/97 (H3N2). Estas pruebas demostraron que la NP permaneció en el núcleo de las células infectadas; no obstante, el número de células infectadas fue menor en la infección con los virus de influenza A H1N1 que en los virus H3N2.

Tomando en consideración que el componente proteico mayoritario de las RNPv es la NP, los autores resaltaron que es probable la inhibición de la formación de los complejos tipo daisy por parte de **1**, interrumpiendo la exportación de las RNPv hacia el citoplasma, a reserva de pruebas que establezcan la interacción directa de dicha naftoquinona con los complejos. En resumen, los resultados obtenidos por Cetina-Montejo *et al.* (2019) indicaron que el compuesto **1** podría afectar el transporte de la NP viral durante las etapas intermedias y tardías del ciclo de replicación, lo que alteraría la población de células infectadas y provocaría un decremento en el número de partículas virales.

Sin embargo, en su trabajo de tesis, Cetina Montejo (2016) demostró con antelación que el derivado (**±**)-**1c**, cuyos grupos hidroxilo fueron protegidos como MOMO, no presentó actividad contra los virus de influenza (Figura 1.23). Entonces, se concluyó que los grupos hidroxilo en la estructura del epóxido **1** podrían ser los responsables del efecto antiviral.

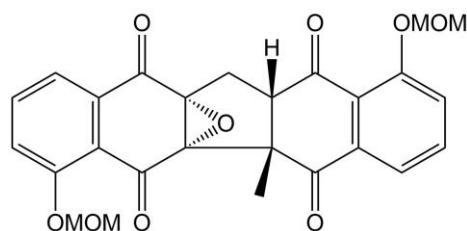


Figura 1.23. Compuesto (**±**)-**1c**.

1.17. DERIVADOS HIDROXILADOS DE PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A Y B

Varias investigaciones han destacado la importancia de los grupos hidroxilo en la estructura de diversos productos naturales y han mostrado que un mayor número de estos sustituyentes potencia su efecto antiviral (Guo *et al.*, 2022). Esto incluye las propiedades anti-influenza de ciertos metabolitos, como demostraron Yang *et al.* (2014), quienes evaluaron la actividad de las catequinas (polifenoles presentes en las hojas de *C. sinensis*) (-)-epigallocatequina (**75**), (-)-epicatequina (**76**) y (±)-catequina (**77**) contra los virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1) y B/Lee/40. Los resultados indicaron que un aumento en la cantidad de grupos hidroxilo incrementa el efecto inhibitorio de estas catequinas sobre la cepa viral H1N1, como **75**, cuya IC₅₀ (30.94 µg/mL) fue menor que la IC₅₀ de sus análogos **76** (>145.09 µg/mL) y **77** (>144.56 µg/mL). El mismo efecto se observó para el virus de influenza B (IC₅₀ = 13.47, >145.09 y >144.56 µg/mL para (-)-**75**, (-)-**76** y (±)-**77**). Todos los compuestos no presentaron citotoxicidad significativa en células MDCK (TC₅₀ = 38.11-145.09 µg/mL).

En otro estudio, Jeong *et al.* (2009) mostraron que el kaempferol (**78**) y la herbacetina (**79**) aislados de las raíces de *Rhodiola rosea*, así como la gossypetina (**80**), inhiben la NA de *C. perfringens* y del virus de influenza A/Bervig_Mission/1/18 (H1N1). El análisis de la relación estructura-actividad de estos tres derivados evidenció que el efecto inhibitorio es dependiente de los sustituyentes hidroxilo en sus estructuras. Para la NA de *C. perfringens*, la IC₅₀ de **80** fue de 0.8 µM, mientras que los valores de IC₅₀ de **79** y **78** fueron de 1.4 y 8.0 µM. En el caso de la NA viral, se obtuvieron valores de IC₅₀ de 2.6, 8.9 y 11.2 µM para **80**, **79** y **78**, respectivamente. Similar a otros metabolitos, estos análogos no ejercieron toxicidad significativa en células MDCK (CC₅₀ = 283.0->300.0 µM).

Por último, Swaminathan *et al.* (2014) también observaron el efecto de la pelargonidina (**81**) y delfinidina (**82**), antocianinas distribuidas en diferentes flores y frutos (particularmente bayas), contra la NA del virus de influenza A/California/04/2009 (H1N1) y compararon su efecto con la cianidina (**83**). El compuesto **82** mostró una IC₅₀ de 64.41 µM, la cual fue menor que las IC₅₀ de **83** (74.87 µM) y **81** (91.54 µM). Además, mediante análisis *in silico* de acoplamiento molecular, los autores confirmaron que **82** y **83** se unen fuertemente a la NA, ya que interactúan con una alta cantidad de residuos de la enzima debido a que poseen un mayor número de sustituyentes hidroxilo en sus estructuras.

A diferencia de otros productos naturales, no hay evidencia de que un incremento en la cantidad de grupos hidroxilo en las quinonas potencie su probable actividad contra los virus de influenza. Únicamente Furuta *et al.* (2015) demostraron que un aumento en el número de estos grupos funcionales en unos derivados hidroxiantraquinona ocasiona una mayor inhibición en la actividad de la proteína no estructural 3 (NS3), una helicasa del virus de la hepatitis C. Los valores de IC₅₀ en esta investigación fueron >200 µM para 1,2-dihidroxiantraquinona (**84**), 1,5-dihidroxiantraquinona (**85**) y 1,8-dihidroxiantraquinona (**86**), mientras que para 1,4-dihidroxiantraquinona (**87**), 1,2,3-trihidroxiantraquinona (**88**), 1,2,4-trihidroxiantraquinona (**89**) y 1,4,5,8-tetrahidroxiantraquinona (**90**) se obtuvieron IC₅₀ de 54, 18, 11 y 6 µM, respectivamente. Las estructuras de los compuestos anteriores se ilustran en la Figura 1.24.

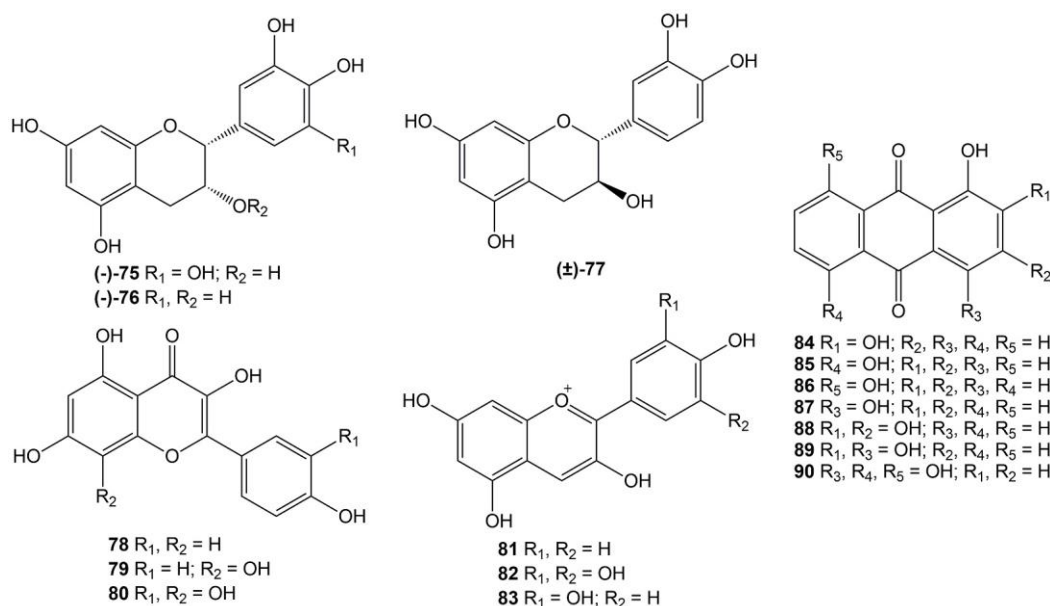


Figura 1.24. Metabolitos secundarios y sus derivados hidroxilados con actividad antiviral.

JUSTIFICACIÓN

Los virus de influenza representan un problema de salud pública mundial debido a su capacidad de mutar rápidamente, lo que provoca epidemias estacionales e incluso, ha ocasionado algunas pandemias a lo largo de la historia. Asimismo, la deriva antigénica obstaculiza la elección de las cepas a incluir en las vacunas y disminuye su efectividad. Aunque los fármacos antivirales comprenden un método eficaz para la prevención y el tratamiento de las infecciones por influenza, han sido asociados con la aparición de resistencia viral (incluyendo fármacos de nueva generación, como los inhibidores de la polimerasa viral). Por consiguiente, diversos grupos de investigación se encuentran estudiando el efecto de compuestos de distintas fuentes hacia otros blancos virales. En este sentido, los productos naturales están emergiendo como una opción importante en la búsqueda de nuevas moléculas antivirales y la síntesis biomimética ha surgido como una herramienta para la generación de dichos metabolitos y sus derivados.

Como ya se mencionó, existen reportes de productos naturales obtenidos por síntesis biomimética y con actividad contra los virus de influenza A y B, entre los cuales se encuentran las naftoquinonas. Aunque son pocos los estudios que han evidenciado el efecto de naftoquinonas sintéticas contra los virus de influenza, estas han demostrado propiedades interesantes a distintos niveles. Uno de estos compuestos es el epóxido de zeylanona (**1**), el cual ha mostrado un efecto antiviral importante a nivel de la NP. Incluso, otros ensayos sustentan el hecho de que **1** podría ser una alternativa promisorio para el futuro tratamiento de la influenza.

No obstante, hay que considerar diversos factores. En primera instancia, se ha determinado la actividad anti-influenza de **1** aislado de la corteza del tallo de *D. anisandra*. Asimismo, este metabolito secundario afectó el transporte extranuclear de la NP viral, por lo que se ha propuesto la hipótesis de que **1** podría ocasionar una disminución en la replicación de los virus de influenza mediante la inhibición de la formación de los complejos tipo daisy, evitando la exportación de las RNPv hacia el citoplasma celular; sin embargo, se observó que el número de células infectadas por los virus de influenza A H3N2 fue mayor que en la infección con los virus H1N1.

Adicionalmente, el compuesto **1** es un producto natural cuya actividad antiviral aparentemente depende de sus grupos hidroxilo. En este sentido, otras investigaciones han apoyado que el número de sustituyentes hidroxilo es fundamental para el efecto antiviral de diversos productos naturales, por lo que aumentar la cantidad de estos grupos funcionales en la estructura de dichas

moléculas ha cobrado un interés particular. Por otro lado, aunque la zeylanona (**2**) es un análogo de **1**, hasta la fecha no se ha reportado si posee propiedades contra la influenza.

Tomando en cuenta que se ha reportado la ruta de síntesis biomimética para **1** y **2** (obteniéndose como **(±)-1** y **(±)-2**), en este trabajo de investigación se planteó la síntesis de estas naftoquinonas haciendo uso de la estrategia de síntesis biomimética establecida, así como de un derivado (compuesto **(±)-3**) siguiendo dicho esquema. Además, por medio de ensayos de reducción del efecto citopático en células MDCK infectadas con cepas virales de influenza A y B, se determinó si estos compuestos poseen actividad antiviral como el producto natural **1** aislado de *D. anisandra*.

HIPÓTESIS

El epóxido de zeylanona y sus análogos obtenidos por síntesis biomimética presentarán actividad contra los virus de influenza A y B.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar el epóxido de zeilanona y derivados y evaluar su actividad contra virus de influenza.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar la síntesis del epóxido de zeilanona y sus derivados mediante reacciones biomiméticas.

Caracterizar las estructuras de los compuestos por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Determinar el efecto citotóxico *in vitro* de los compuestos en células MDCK.

Determinar el efecto antiviral *in vitro* de los compuestos en virus de influenza A y B.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El esquema con la planificación experimental empleada para el cumplimiento de los objetivos planteados se representa en la Figura 1.25.

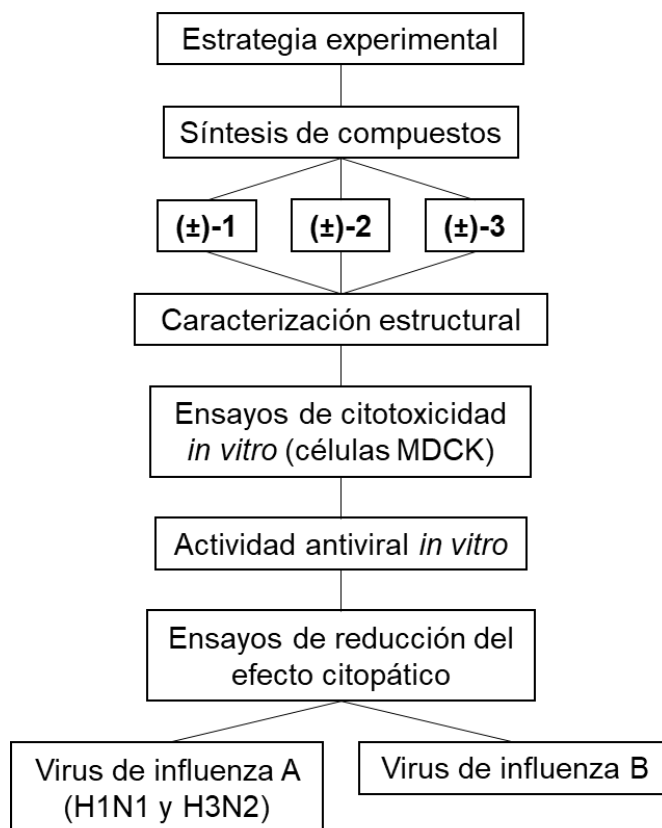


Figura 1.25. Esquema experimental planteado.

CAPÍTULO II

SÍNTESIS BIOMIMÉTICA Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA Y DERIVADOS

2.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los productos naturales desempeñan un papel importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Incluso, de los 1,881 fármacos aprobados entre 1981-2019, un total de 713 (37.7%) proceden de dichos metabolitos o son derivados de los mismos (Newman y Cragg, 2020). Durante milenios, las plantas medicinales han sido una valiosa fuente de estos agentes terapéuticos, aunque diversos factores (deforestación, densidad poblacional, composición química dependiente de la estación, etc.) han afectado su crecimiento y la producción de sus metabolitos (Atanasov *et al.*, 2015).

Para la generación de productos naturales, en los últimos años se han desarrollado un número importante de estrategias de síntesis que emulan las rutas biosintéticas en plantas (Li *et al.*, 2018). Este enfoque, conocido como síntesis biomimética, ha sido aplicado en la síntesis del epóxido de zeylanona (**1**) y su análogo zeylanona (**2**), naftoquinonas diméricas presentes en distintas fuentes vegetales pero producidas en poca cantidad por las mismas. Para **1**, Cetina-Montejo *et al.* (2019) obtuvieron 4.3 mg de esta naftoquinona a partir de 951 g de la corteza del tallo de *D. anisandra*, mientras que para **2**, Gu *et al.* (2004) aislaron 3.4 mg partiendo de 892 g de la corteza de *D. maritima*; ambos compuestos también fueron aislados de la raíz de *P. zeylanica* (656 g) por Ito *et al.* (2018), obteniendo 2.8 mg de **1** y 4.2 mg de **2**. Maruo *et al.* (2013) sintetizaron estas moléculas de acuerdo a lo descrito en su vía de biosíntesis propuesta, mediante reacciones de Michael intermoleculares e intramoleculares y empleando la naftoquinona monomérica natural plumbagina (**1a**); estos compuestos fueron producidos como (**±**)-**1** (0.12 g) y (**±**)-**2** (0.22 g) a partir de 0.52 g de **1a**.

Por otro lado, se ha mostrado que el metabolito **1** aislado de *D. anisandra* presenta actividad contra los virus de influenza A y B (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). Igualmente, se ha hipotetizado que el efecto antiviral podría ser dependiente de los grupos hidroxilo en la estructura de la molécula (Cetina Montejo, 2016). Otros trabajos han evidenciado que las propiedades antivirales de algunos metabolitos incrementan con un mayor número de grupos hidroxilo en sus estructuras, incluyendo las quinonas (Guo *et al.*, 2022).

Por consiguiente, en este capítulo se abordó la síntesis biomimética de los compuestos **(±)-1**, **(±)-2** y el derivado **(±)-3**, empleando los procedimientos reportados por Dessolin *et al.* (2001), Schroeder *et al.* (2016) y Maruo *et al.* (2013). Para el análogo **(±)-3**, el primer paso en su obtención implicó la síntesis de la naftoquinona ramentona (**3b**) mediante una reacción de doble acilación de Friedel-Crafts entre los precursores 1,4-dimetoxibenceno (**3a**) y anhídrido 2-metilmaleico (**4**). Posteriormente, **1a** y **3b** fueron sometidos a reacciones de protección, dimerización (adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares secuenciales) y desprotección, resultando en la síntesis de los productos de interés.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Materiales y equipos empleados en la síntesis de los compuestos

Para la síntesis y purificación de los compuestos se usaron disolventes purificados por destilación en el laboratorio, grado industrial y grado analítico. Para el secado de las muestras obtenidas se utilizó un rotavapor® BÜCHI RE-111 con un baño de agua BÜCHI 461 (a 40°C) y un recirculador de agua fría y vacío PVK 700 (BÜCHI, Flawil, Suiza). Para el análisis de las muestras por cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon placas cromatográficas con soporte de aluminio, impregnadas con gel de sílice 60F₂₅₄ de 0.20 mm de espesor (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Los componentes separados mediante CCD fueron visualizados bajo luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) en una cabina de visualización Chromato-Vue® C-75 (Analytik Jena GmbH, Jena, Alemania). Igualmente, los componentes separados por CCD fueron visualizados después de ponerse en contacto con dos reveladores químicos, un revelador general constituido por ácido fosfomolibdico (20.0 g) y sulfato de cerio (IV) (2.5 g) en 500 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 5%, así como uno específico para naftoquinonas compuesto por KOH al 5% en EtOH (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos).

Para la cromatografía líquida al vacío (CLV) y la cromatografía flash se empleó gel de sílice 60 de un tamaño de malla de 200-400. En la cromatografía de permeación en gel se utilizó Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos). También se emplearon placas preparativas de 20 x 20 cm con soporte de vidrio, impregnadas con gel de sílice 60F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para las reacciones de síntesis se utilizaron jeringas NORM-JET® de 3 mL (Henke-Sass Wolf, Tuttlingen, Alemania) y los compuestos comerciales **1a** de *Plumbago indica*, **3a** y **4**, así como NaH al 60% en aceite de parafina, DMF anhidra, AlCl₃, MOMCl, CH₂Cl₂ anhidro, KI y *p*-TsOH·H₂O (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos). También se emplearon AcOH y tolueno (Fermont, Nuevo León, México), al igual que sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro, NaCl y HCl (CTR Scientific, Nuevo León, México).

2.2.2. Materiales y equipos empleados en la caracterización de los compuestos

Los análisis de cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7840A acoplado a un detector de masas Agilent Technologies 5975C, con una columna Agilent Technologies 19091S-433HP-5MS (5% fenil- y 95% metilpolisiloxano) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de espesor (Agilent Technologies, California, Estados Unidos). Las muestras fueron disueltas en CH₂Cl₂ y se inyectaron 1.5 µL (dado que las muestras se disolvieron en su totalidad en el disolvente y considerando que el equipo contiene un inlet liner o revestimiento de entrada que permite la retención de cualquier partícula no disuelta o volátil, las muestras no se filtraron con un acrodisco de membrana). La programación de la temperatura se realizó de la siguiente manera: temperatura inicial de 80°C por 5 min, luego se incrementó 10°C/min hasta 110°C por 1 min y 6°C/min hasta 270°C por 15 min, con helio (He) de ultra alta pureza como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min. Los espectros de masas fueron analizados con los programas MestReNova® versión 14.2.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España) y OpenChrom® versión 1.5.0 (Lablicate GmbH, Hamburgo, Alemania). Asimismo, los patrones de fragmentación de los espectros de masas fueron comparados con los reportados en la base de datos NIST 11 (Standard Reference Data, Maryland, Estados Unidos).

Los análisis de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) acoplada a MS se realizaron en un equipo para UHPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas por transformada de Fourier (FTMS) Thermo Scientific LTQ Orbitrap equipado con una sonda de ionización por electropulverización (HESI-II). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ de 100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro y 3 µm de tamaño de partícula (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Las muestras fueron disueltas en metanol con 0.1% de ácido fórmico, se filtraron a través de un acrodisco de membrana de 0.45 µm y se inyectaron 2 µL. Se utilizó un flujo de 0.2 mL/min, con disolventes grado MS conformados por 0.1% de ácido fórmico

en agua (disolvente A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (disolvente B); el gradiente empleado consistió en lo siguiente: 5% B a 0 min, 20% B en 1 min, 100% B en 10 min (manteniéndose por 0.5 min) y 10% B en 1 min (manteniéndose por 11.7 min). Los espectros de masas se obtuvieron y analizaron con los programas Xcalibur® y MassFrontier® (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Los análisis de RMN de protón (^1H) y carbono (^{13}C) se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian/Agilent 600 MHz AR PremiumCOMPACT, con un campo magnético de 14.1 T y una sonda de triple resonancia de 5 mm, a frecuencias de 600 y 151 MHz (Varian-Agilent, California, Estados Unidos). Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. Los datos fueron expresados como desplazamientos químicos (δ), multiplicidad y constantes de acoplamiento (J ; Hz). Los valores δ fueron expresados en partes por millón (ppm), con la resonancia del disolvente deuterado como estándar interno (δ 7.26 para RMN- ^1H y δ 77.20 para RMN- ^{13}C). Los resultados fueron procesados en el programa MestReNova® versión 14.2.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España).

2.2.3. Síntesis biomimética de epóxido de zeylanona (1) y derivados (2 y 3)

2.2.3.1. Síntesis de 5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (1b)

El primer paso en la síntesis de las naftoquinonas diméricas ($\pm$)-1 y ($\pm$)-2 fue realizado conforme a lo descrito por Maruo *et al.* (2013), en una reacción que implicó la protección del grupo hidroxilo presente en el anillo aromático de **1a** (Figura 2.1).

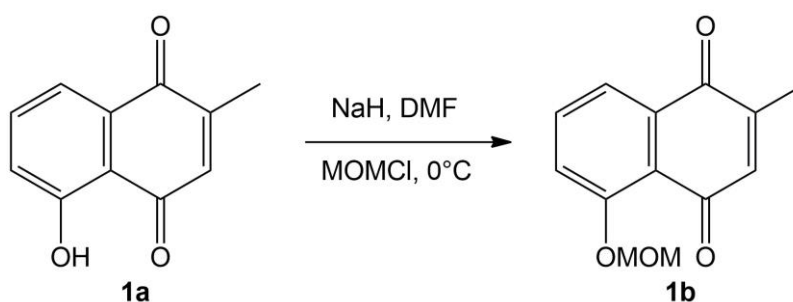


Figura 2.1. Protección del grupo hidroxilo de **1a** (plumbagina).

En un matraz balón se preparó una mezcla de NaH al 60% en aceite de parafina (0.17 g, 4.2 mmol) con DMF anhidra (5.0 mL). Luego, con ayuda de una jeringa se adicionó el producto **1a** (0.52 g, 2.8 mmol) disuelto en DMF anhidra (20 mL). La mezcla resultante se agitó por 5 min a 0°C. Seguidamente, se añadió a la mezcla por goteo el reactivo MOMCl (0.30 mL, 4.0 mmol) y

se dejó en agitación constante a 0°C durante 1 h y 50 min. Al finalizar este tiempo, se adicionó agua (25 mL) para detener la reacción y la mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (AcOEt; 50 mL, 3 veces). Las fases orgánicas se recuperaron, se combinaron, se lavaron con una solución de NaCl al 5% (100 mL, 4 veces), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron con papel filtro y se concentraron a presión reducida.

El sólido crudo concentrado se sometió a una etapa de purificación por cromatografía flash (columna de 2.5 cm de diámetro y 40 cm de alto), empleando un sistema de elución en forma isocrática con hexano (Hx)/AcOEt 6:1. Se recolectaron 93 fracciones, las cuales se aplicaron en placas para CCD con Hx/AcOEt en proporción 3:1 como eluyente y compuesto **1a** como estándar. Las fracciones 60-93 (que presentaron la molécula **1b**) se juntaron y se purificaron por cromatografía flash a las condiciones descritas. Se colectaron cuatro fracciones y se compararon en placas para CCD (Hx/AcOEt 3:1 y **1a** como referencia). El producto **1b** se observó en las fracciones 3 y 4 como un sólido color amarillo (0.54 g, 85% de rendimiento), soluble en CH₂Cl₂ y con un valor de factor de retención (R_f) de 0.350 (Hx/AcOEt 3:1).

- Compuesto **1b** (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona). RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-8), 7.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.72 (q, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-3), 5.34 (s, 2H, H-12), 3.53 (s, 3H, H-13), 2.13 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, H-11). GC-MS: [M]⁺ *m/z* 232.1, 201, 189, 172, 144, 131, 115, 103, 77, 63, 51, 45, 29, 15.

2.2.3.2. Síntesis de (±)-12,12a-dihidro-1,7-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5H-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5a*H*)-tetrona (**1c**)

El compuesto **1b** sintetizado previamente se utilizó para la generación de (±)-**1c** considerando lo reportado por Maruo *et al.* (2013), mediante reacciones de dimerización que consistieron en adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares producidas de manera secuencial (Figura 2.2).

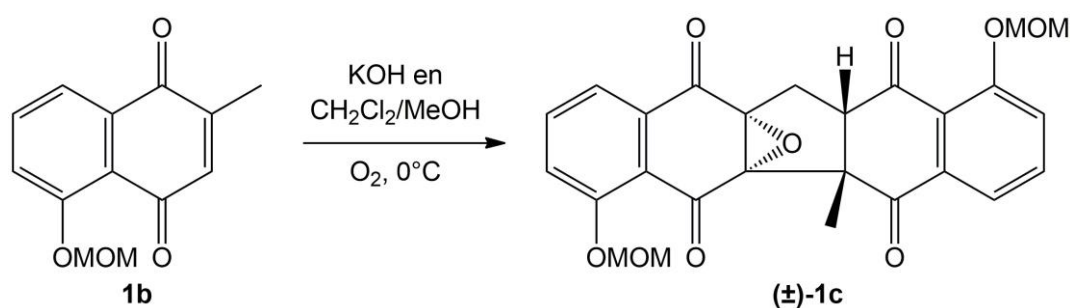


Figura 2.2. Reacción de dimerización para la síntesis de (±)-**1c**.

En un matraz balón, bajo atmósfera de O₂ y a 0°C, se preparó una mezcla compuesta por KOH 1 M en MeOH (4.4 mL) y una solución de CH₂Cl₂ anhidro/MeOH 1:1 (25 mL). Enseguida, se agregó por goteo el producto de síntesis **1b** (0.20 g, 0.86 mmol) disuelto con anticipación en CH₂Cl₂ anhidro (10 mL). La mezcla se agitó durante 26 h (0°C y atmósfera de O₂). La reacción se detuvo con agua (40 mL) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (80 mL, 7 veces). Las fases orgánicas fueron recuperadas y juntadas. Las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con una solución de NaCl al 5% (100 mL, 5 veces), secadas con Na₂SO₄ anhidro, filtradas con papel filtro y concentradas a presión reducida.

El sólido crudo concentrado se comparó en placas para CCD con Hx/AcOEt 1:1 como eluyente y compuesto **1b** como estándar, observándose una banda fluorescente con un valor de R_f distinto al del estándar. De acuerdo a Maruo *et al.* (2013), **(±)-1c** es un sólido color blanco obtenido después de purificar por cromatografía en columna con Hx/AcOEt 3:1-1:1 como sistema de elución en gradiente. Sin embargo, en ensayos previos realizados en el laboratorio se observó que el rendimiento de **(±)-1c** disminuía drásticamente después de una etapa de purificación, por lo que el concentrado crudo de la reacción se lavó con acetona (An) para eliminar las impurezas. El producto **(±)-1c** se obtuvo como un sólido color blanco (62.7 mg, 15% de rendimiento), visible bajo luz UV a 254 nm y al revelador de KOH al 5% en EtOH, con un valor de R_f de 0.375 (Hx/AcOEt 1:1) y soluble en CH₂Cl₂.

- Compuesto **(±)-1c** (12,12a-dihidro-1,7-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5*H*-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5*aH*)-tetrona). RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 7.79 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H-9), 7.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.55 (dd, *J* = 11.6, 7.7 Hz, 1H, H-8'), 7.54 (s, 1H, H-9'), 7.47 (m, 2H, H-7, 7'), 5.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-12'b), 5.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-12'a), 5.22 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-12b), 5.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-12a), 3.51 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, H-11'b), 3.49 (s, 3H, H-13'), 3.46 (s, 3H, H-13), 2.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 2.75 (dd, *J* = 14.8, 7.9 Hz, 1H, H-11'a), 1.68 (s, 3H, H-11).

2.2.3.3. Síntesis de (±)-epóxido de zeylanona (1)

El último paso en la síntesis de **(±)-1** se llevó a cabo acorde a lo descrito por Maruo *et al.* (2013), por medio de la desprotección de los grupos MOMO presentes en los anillos aromáticos del dímero **(±)-1c** (Figura 2.3).

Para la eliminación de los grupos MOMO, el sólido correspondiente a **(±)-1c** (0.13 g, 0.27 mmol) se disolvió en AcOH (10.7 mL) en un matraz balón y se agitó constantemente por 5 h a 100°C. Luego, se adicionó agua (10 mL) y la mezcla resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL, 2 veces). Las fases orgánicas extraídas se juntaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron con papel filtro y se concentraron a presión reducida.

El producto se purificó por cromatografía flash (columna de 1.5 cm de diámetro y 25 cm de alto) y un sistema de elución en gradiente con Hx/AcOEt 5:1, 4:1 y 3:1. Se recolectaron 35 fracciones y se compararon empleando placas para CCD con Hx/An 7:3 como eluyente y el metabolito **1** aislado de *D. anisandra* como referencia (Cetina Montejó, 2016). El compuesto (**±**)-**1** se observó en las fracciones 18-34, las cuales se juntaron y se sometieron a una separación mediante cromatografía en placa preparativa con Hx/An 7:3 como sistema de elución. Los componentes separados se recuperaron usando CH₂Cl₂ al 100% y se observó la formación de un precipitado en el disolvente. El disolvente se descartó, mientras que el precipitado se recuperó y se analizó en placas para CCD (Hx/An 7:3 y **1** como estándar). El precipitado correspondió al compuesto de interés y presentó las siguientes características: sólido color amarillo pálido (14.8 mg, 14% de rendimiento), R_f de 0.275 (Hx/An 7:3), visible bajo luz UV a 254 y 365 nm, soluble en An, CH₂Cl₂ y cloroformo (CHCl₃).

58

2.2.3.4. Síntesis de (±)-zeylanona (2)

La síntesis de (±)-2 se realizó de acuerdo a Maruo *et al.* (2013), en dos pasos que consistieron en el tratamiento de (±)-1c con KI en medio ácido (AcOH) y bajo atmósfera de N₂ para la desprotección de los grupos MOMO, seguido de *p*-TsOH·H₂O y tolueno para favorecer la apertura del anillo epóxido y la formación del doble enlace en la estructura del dímero de interés (Figura 2.4).

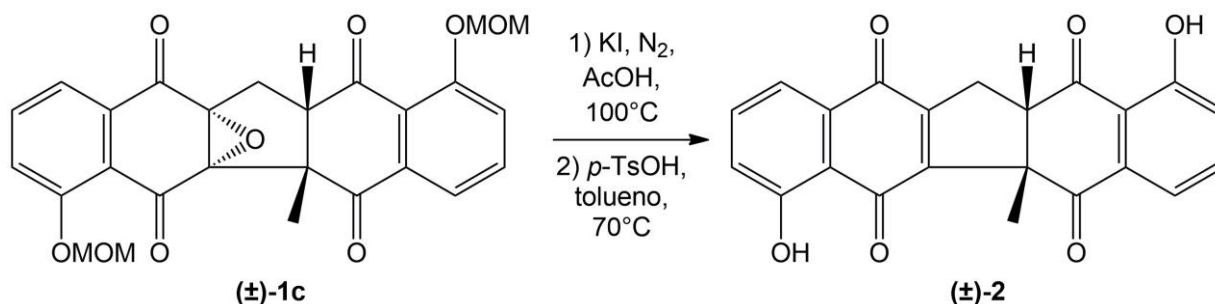


Figura 2.4. Síntesis de (±)-2 (zeylanona).

En un matraz balón se preparó una solución conformada por el producto (±)-1c (0.16 g, 0.33 mmol) en AcOH (17 mL). Luego, bajo atmósfera de N₂ y a temperatura ambiente, se adicionó KI (0.27 g, 1.6 mmol) a dicha solución; la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 1 h (100°C y atmósfera de N₂) y se concentró a presión reducida. Se obtuvo un sólido crudo color naranja, el cual se disolvió en tolueno (46 mL). A esta solución se le agregó *p*-TsOH·H₂O (0.10 g, 0.57 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción resultante se agitó constantemente por 20 h a 70°C. La reacción se detuvo con agua (45 mL) y las fases se separaron. La fase orgánica colectada se lavó con una solución de NaCl al 5% (45 mL, 10 veces) y se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró con papel filtro y se concentró a presión reducida.

El producto se purificó usando cromatografía flash (columna de 1.5 cm de diámetro y 30 cm de alto) y un sistema de elución isocrática con Hx/AcOEt 5:1. Se recolectaron 93 fracciones y se compararon empleando placas para CCD con Hx/AcOEt 5:1 como eluyente y compuesto (±)-2 como estándar. Se identificó el producto en las fracciones 19-39, con las siguientes características: polvo color naranja (30.7 mg, 25% de rendimiento después de dos pasos), R_f de 0.325 (Hx/AcOEt 5:1), soluble en An y CH₂Cl₂.

- Compuesto (±)-2 (12,12a-dihidro-1,7-dihidroxi-5a-metil-5*H*-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5a*H*)-tetrona; zeylanona). RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 12.16 (s, 1H, OH-6), 12.05 (s, 1H, OH-6'), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 1H, H-8), 7.59 (m, 2H, H-8', 9'), 7.54 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H-9), 7.28 (m,

2H, H-7, 7'), 3.45 (m, 2H, H-3, 11'b), 3.09 (dd, $J = 17.3, 7.2$ Hz, 1H, H-11'a), 1.83 (s, 3H, H-11). UHPLC-FTMS: $[M+H]^+$ m/z 375.08, 357, 339, 329, 311, 301, 283, 273, 255, 237, 227, 213, 181, 163, 149, 121.

2.2.3.5. Síntesis de ramentona (3b)

Para sintetizar el derivado hidroxilado ($\pm$)-**3**, primero se llevó a cabo la síntesis de la naftoquinona monomérica **3b**, por medio de una reacción de doble acilación de Friedel-Crafts descrita en las metodologías de Dessolin *et al.* (2001) y Schroeder *et al.* (2016) (Figura 2.5).

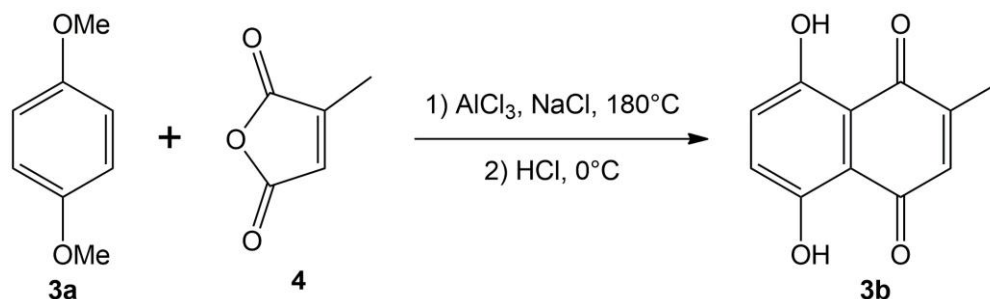


Figura 2.5. Síntesis de **3b** (ramentona).

En un matraz balón se preparó una mezcla con AlCl_3 (6.0 g, 45.0 mmol) y NaCl (1.3 g, 22.0 mmol), la cual se calentó a 180°C bajo una atmósfera de N_2 hasta la fundición del AlCl_3 (15 min). Posteriormente, a la mezcla de reacción se le adicionó por goteo una solución de **3a** (0.69 g, 5.0 mmol) y **4** (1.9 g, 16.9 mmol), previamente preparada bajo atmósfera de N_2 . Se ajustó la temperatura a 190°C y la mezcla de reacción se mantuvo en calentamiento durante 5 min (190 - 200°C y atmósfera de N_2), hasta que cesó la liberación de gas; entonces, se dejó reposar 1 h a 100°C y se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla resultante se le añadió una solución fría (0°C) de HCl al 10% (200 mL) y se mantuvo en agitación constante durante 18 h. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla obtenida se extrajo con CH_2Cl_2 (100 mL, 2 veces) y las fases orgánicas se recuperaron. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron con papel filtro y se concentraron a presión reducida.

El sólido crudo concentrado se sometió a una CLV (columna de 4.5 cm de diámetro y 7.0 cm de alto) y un sistema de elución en forma isocrática con Hx/AcOEt 9:1. Las tres fracciones recolectadas se compararon en placas para CCD con Hx/AcOEt 9:1 como eluyente y compuestos **3a** y **4** como estándares. Se seleccionó la fracción 2 para una nueva purificación por medio de cromatografía flash (columna de 1.5 cm de diámetro y 25 cm de alto) con Hx/AcOEt 9:1 como sistema de elución en forma isocrática. Se recolectaron cinco fracciones y se compararon

mediante placas para CCD (Hx/AcOEt 9:1, **3a** y **4** como referencias). Las fracciones 1 y 2 fueron lavadas con Hx y después de su análisis en placas para CCD (Hx/AcOEt 9:1, **3a** y **4** como estándares), se observó el compuesto **3b** como un sólido color rojo (0.14 g, 14% de rendimiento), soluble en CH₂Cl₂ y con un valor de R_f de 0.525 (Hx/AcOEt 9:1).

- Compuesto **3b** (5,8-dihidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona; ramentona). RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 12.56 (s, 1H, OH-5), 12.44 (s, 1H, OH-8), 7.21 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-6), 7.19 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-7), 6.90 (q, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-3), 2.24 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H, H-11). GC-MS: [M]⁺ *m/z* 204.1, 189, 176, 161, 147, 122, 108, 102, 91, 77, 65, 53, 39, 29, 18.

2.2.3.6. Síntesis de 5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**3c**)

La siguiente etapa en la síntesis de (**±**)-**3** consistió en una reacción de protección de los grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático del producto **3b**. Similar a la obtención de **1b**, la síntesis de **3c** se realizó de acuerdo a lo reportado por Maruo *et al.* (2013), con las modificaciones pertinentes para generar el derivado doblemente protegido (Figura 2.6).

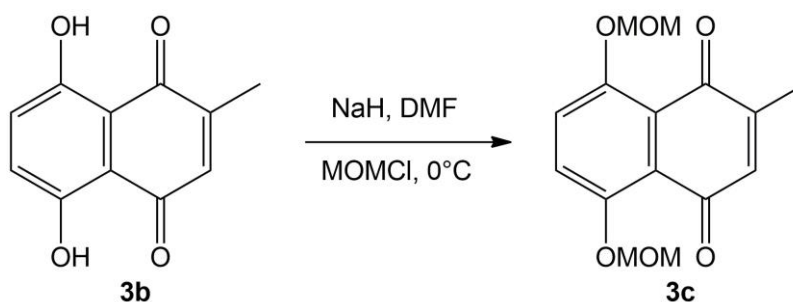


Figura 2.6. Protección de grupos hidroxilo de **3b** (ramentona).

La reacción se llevó a cabo en un tubo Schlenk, donde se preparó una mezcla de NaH al 60% en aceite de parafina (83.8 mg, 2.1 mmol) con DMF anhidra (4.9 mL). Con ayuda de una jeringa, se adicionó el producto **3b** (0.10 g, 0.49 mmol) en DMF anhidra (7.8 mL) y la mezcla resultante se agitó por 5 min a 0°C. Luego se añadió el reactivo MOMCl (0.15 mL, 2.0 mmol) por goteo y se mantuvo en agitación constante por 3 h a 0°C. Se agregó agua (72 mL) para parar la reacción y la mezcla obtenida se extrajo con AcOEt (85 mL, 2 veces). Las fases orgánicas se recuperaron y juntaron, se lavaron con una solución de NaCl al 5% (85 mL, 2 veces), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron con papel filtro y se concentraron a presión reducida.

El sólido crudo se purificó por cromatografía flash (columna de 1.5 cm de diámetro y 25 cm de alto) con un sistema de elución en forma isocrática con Hx/AcOEt 6:4. En total se colectaron 29

fracciones y se aplicaron en placas para CCD con Hx/AcOEt 6:4 como eluyente y **3b** como compuesto de referencia. Las fracciones 14-24 presentaron el producto **3c** como un sólido color naranja (74.4 mg, 52% de rendimiento), con un R_f de 0.400 (Hx/AcOEt 6:4) y soluble en CH_2Cl_2 .

- Compuesto **3c** (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona). RMN- ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 7.47 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-6), 7.45 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-7), 6.67 (q, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-3), 5.27 (s, 2H, H-14), 5.26 (s, 2H, H-12), 3.55 (s, 3H, H-15), 3.54 (s, 3H, H-13), 2.11 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, H-11). RMN- ^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ 185.2 (C-4), 184.4 (C-1), 152.2 (C-8), 151.8 (C-5), 147.4 (C-2), 135.7 (C-3), 125.1 (C-10), 124.8 (C-9), 122.7 (C-6), 122.6 (C-7), 96.1 (C-14), 96.0 (C-12), 56.6 (C-15), 56.5 (C-13), 16.1 (C-11). GC-MS: $[\text{M}]^+$ m/z 292.1, 261, 245, 216, 186, 172, 160, 144, 102, 90, 77, 62, 45, 39, 29, 15.

2.2.3.7. Síntesis de ($\pm$)-12,12a-dihidro-1,4,7,10-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5H-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5aH)-tetrona (**3d**)

La naftoquinona ($\pm$)-**3d** se sintetizó por medio de reacciones de dimerización a partir de la molécula **3c** y siguiendo el procedimiento descrito por Maruo *et al.* (2013), con las modificaciones necesarias para sintetizar el análogo de ($\pm$)-**1c** (Figura 2.7).

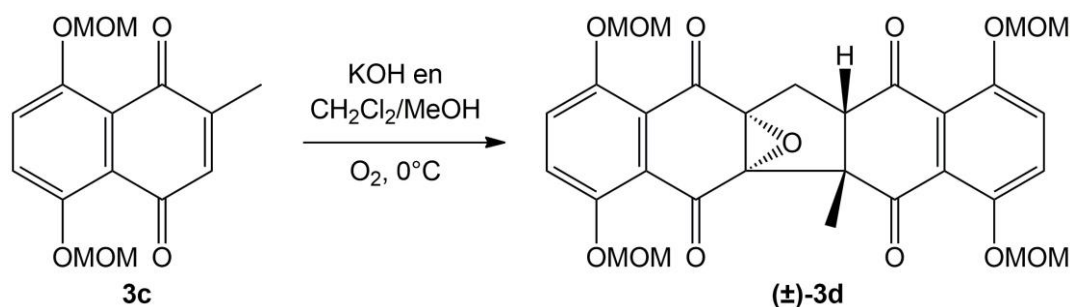


Figura 2.7. Reacción de dimerización para la síntesis de ($\pm$)-**3d**.

En un tubo Schlenk se preparó una mezcla constituida por KOH 1 M en MeOH (2.0 mL) y una solución de CH_2Cl_2 anhidro/MeOH 1:1 (8 mL), bajo atmósfera de O_2 y a 0°C . Luego, el producto **3c** (45.0 mg, 0.15 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 anhidro (5.0 mL) se adicionó por goteo a la mezcla de reacción y se agitó constantemente por 26 h (0°C y atmósfera de O_2). Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo con agua (15 mL), la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (30 mL, 5 veces) y las fases orgánicas se recuperaron. Estas fueron combinadas, lavadas con una solución de NaCl al 5% (50 mL, 2 veces), secadas con Na_2SO_4 anhidro, filtradas con papel filtro y concentradas a presión reducida.

El sólido crudo obtenido se aplicó en placas para CCD con Hx/AcOEt en proporción 1:1 como eluyente y **3c** como compuesto de referencia. Se observó un producto fluorescente con un valor de R_f diferente al estándar, por lo que al igual que **(±)-1c**, se probó lavar con An para eliminar las impurezas visualizadas (considerando que en experimentos previos llevados a cabo en el laboratorio se notó una disminución en el rendimiento de **(±)-1c** después de purificar por cromatografía en columna). Sin embargo, el compuesto no se pudo separar de las impurezas, por lo que el sólido crudo color café con **(±)-3d** (42.2 mg, 46% de rendimiento), visible bajo luz UV (254 y 365 nm) y al revelador de KOH al 5% en EtOH, con un valor de R_f de 0.600 (Hx/AcOEt 1:1) y soluble en CH_2Cl_2 se utilizó directamente en la reacción de desprotección.

- Compuesto **(±)-3d** (12,12a-dihidro-1,4,7,10-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5H-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5a*H*)-tetrona). RMN- ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 7.41 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-8'), 7.39 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-7'), 6.96 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-7), 6.81 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-8), 5.22 (m, 8H, H-12, 12', 14, 14'), 3.77 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H, H-11'b), 3.52 (m, 2H, H-3, 11'a), 3.47 (s, 3H, H-15'), 3.47 (s, 3H, H-13'), 3.46 (s, 3H, H-13), 3.46 (s, 3H, H-15), 1.69 (s, 3H, H-11).

2.2.3.8. Síntesis de derivado hidroxilado (±)-3

La síntesis del dímero **(±)-3** se realizó considerando el protocolo reportado por Maruo *et al.* (2013), con las modificaciones pertinentes para desproteger los grupos MOMO de **(±)-3d** y generar el derivado de interés (Figura 2.8).

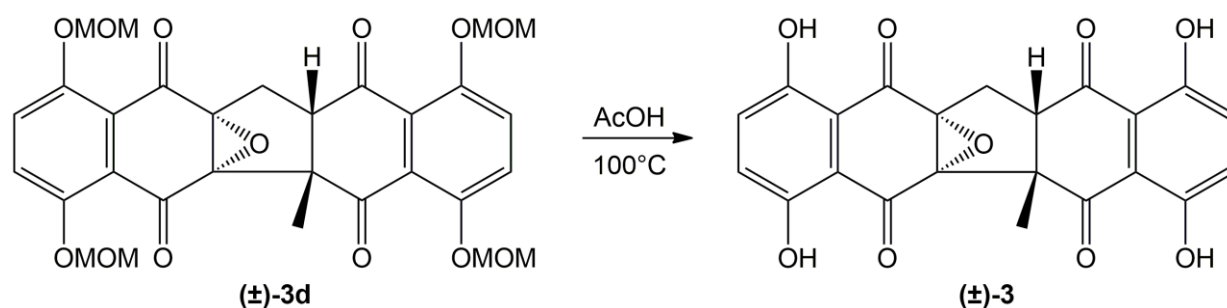


Figura 2.8. Síntesis de **(±)-3**.

En un matraz balón, el sólido crudo con **(±)-3d** (55.0 mg, 0.09 mmol) de la reacción previa se disolvió en AcOH (10 mL) y se mantuvo en agitación constante durante 5 h a 100°C. Se agregó agua (10 mL) y la mezcla obtenida se extrajo con CH_2Cl_2 (20 mL, 2 veces). Las fases orgánicas extraídas se combinaron y se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron con papel filtro y se concentraron a presión reducida.

El producto se purificó mediante cromatografía flash (columna de 1.5 cm de diámetro y 25 cm de alto) y un sistema de elución isocrática con Hx/AcOEt 5:1. En total se colectaron 40 fracciones, las cuales se compararon en placas para CCD con Hx/An 7:3 como eluyente y compuesto **(±)-3** como estándar. La molécula de interés se observó en las fracciones 35-40, cuyas características fueron: sólido color naranja (2.0 mg, 5% de rendimiento), R_f de 0.550 (Hx/An 7:3), visible bajo luz UV a 254 y 365 nm, soluble en An, CHCl₃ y CH₂Cl₂.

- Compuesto **(±)-3** (12,12a-dihidro-1,4,7,10-tetrahidroxi-5a-metil-5b,11a-epoxi-11*H*-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5a*H*)-tetrona). RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 11.19 (s, 1H, OH-9'), 11.19 (s, 1H, OH-6'), 10.96 (s, 1H, OH-6), 10.96 (s, 1H, OH-9), 7.50 (m, 2H, H-7', 8'), 7.18 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-7), 7.17 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-8), 5.17 (m, 1H, H-11'b), 3.51 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-3), 3.46 (m, 1H, H-11'a), 1.70 (s, 3H, H-11). RMN-¹³C (151 MHz, CDCl₃): δ 195.6 (C-1'), 195.6 (C-4'), 195.1 (C-4), 195.1 (C-1), 156.9 (C-9'), 156.9 (C-6'), 156.5 (C-6), 156.5 (C-9), 129.4 (C-10'), 129.4 (C-5'), 129.1 (C-5), 129.1 (C-10), 112.5 (C-8), 111.4 (C-7), 110.9 (C-7'), 110.0 (C-8'), 65.8 (C-2'), 61.5 (C-3'), 31.9 (C-3), 29.7 (C-2), 15.2 (C-11'), 14.4 (C-11).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Síntesis de 5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**1b**)

Para la obtención de los compuestos **(±)-1** y **(±)-2**, se procedió primero con la síntesis de **1b** empleando la metodología descrita por Maruo *et al.* (2013); esta molécula se sintetizó mediante la protección del grupo hidroxilo de **1a** como MOMO. Los éteres se encuentran entre los grupos protectores más usados en síntesis orgánica, ya que se pueden formar y eliminar usando una gran variedad de condiciones. Éstos comprenden desde el éter más simple hasta éteres sustituidos. En este sentido, un agente ampliamente utilizado en la protección de grupos hidroxilo es MOMCl, ya que es un reactivo fácil de introducir por medio de una amplia gama de condiciones, a diferencia de otros agentes protectores como los metiltiometil éteres (MTMO), benciloximetil éteres (BOMO) o derivados, que son difíciles de insertar o que requieren condiciones específicas para este fin (Wuts y Greene, 2007).

En su investigación, Maruo *et al.* (2013) sintetizaron **1b** a partir de 0.52 g de **1a** y 0.30 mL de MOMCl, obteniendo un rendimiento del 94% (0.58 g). En la síntesis de **1b** llevada a cabo en este proyecto se obtuvo un rendimiento del 85% (0.54 g) partiendo de las mismas cantidades de **1a** y MOMCl, en una reacción efectuada a las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se notó una ligera variación en los rendimientos de ambas reacciones, la cual se atribuyó a la etapa de

purificación adicional (se requirieron dos pasos de purificación por cromatografía flash para la obtención del producto de síntesis).

Con respecto al análisis de GC-MS, el cromatograma mostró un pico abundante correspondiente a un compuesto con un tiempo de retención (T_r) de 22.8 min y un ion molecular $[M]^+$ a m/z 232 (Figura 2.9). El espectro de masas se comparó con lo reportado en la base de datos NIST 11 y el patrón de fragmentación coincidió con el producto esperado **1b**, que posee una fórmula molecular $C_{13}H_{12}O_4$ y un peso molecular de 232 Da. En el espectro de masas se observó la pérdida de un fragmento metoxilo (31 Da) a m/z 201 por parte del ion molecular $[M]^+$, lo que generaría un radical iónico $C_{12}H_9O_3^+$. De igual forma, al tratarse de un derivado de tipo naftoquinona, la pérdida de fragmentos de tipo -CHO (29 Da) a m/z 172 y 115 fueron evidentes, dando como resultado los iones $C_{11}H_8O_2^+$ y $C_9H_7^+$, respectivamente. También fue notable la pérdida de moléculas de monóxido de carbono (28 Da) a m/z 144, obteniéndose un radical iónico intermedio $C_{10}H_8O^+$ (Vessecchi *et al.*, 2012). Asimismo, se notó la presencia de un pico relacionado a una molécula con un T_r de 17.0 min, el cual correspondería a residuos del compuesto **1a** (formula molecular $C_{11}H_8O_3$ y peso molecular de 188 Da) que no reaccionaron.

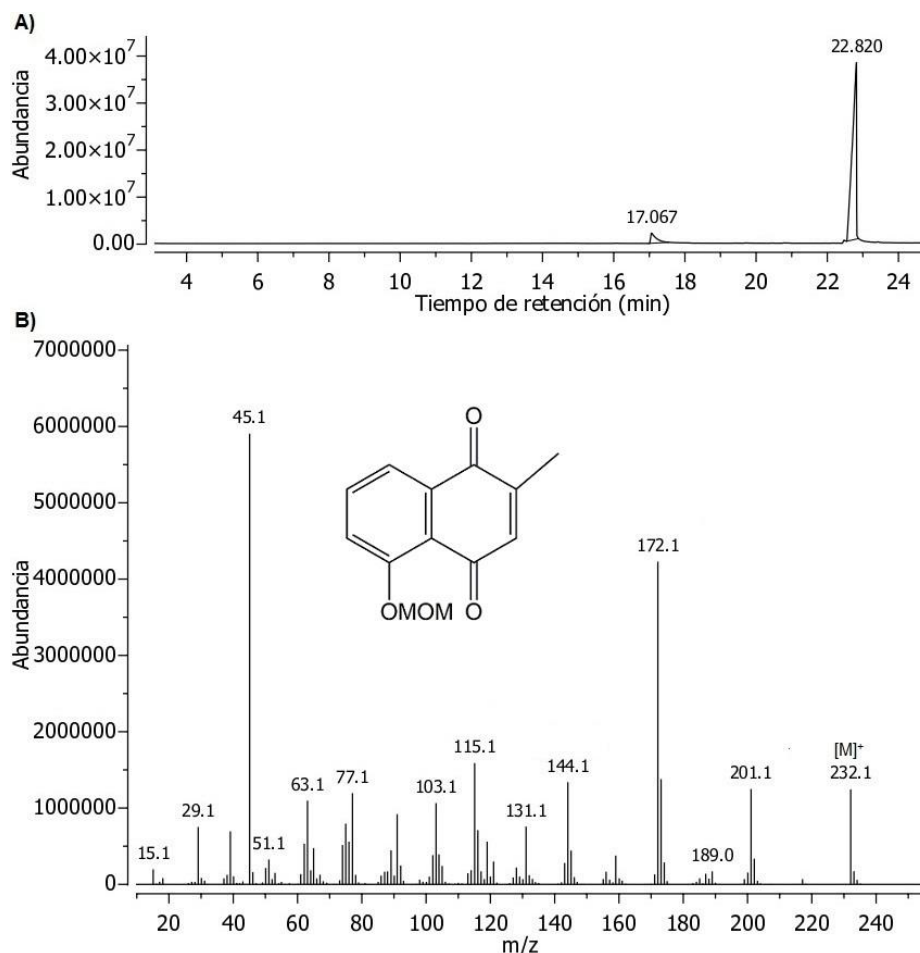


Figura 2.9. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) de **1b** (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona, fórmula molecular $C_{13}H_{12}O_4$, $T_r = 22.8$ min, $[M]^+$ m/z 232.1, masa exacta: 232.0736).

Los resultados de la espectroscopía por RMN- 1H confirmaron la estructura del compuesto **1b** (Figura 2.10). A campo alto se observó la señal típica de los tres protones H-11 del grupo metilo unido a un doble enlace (δ 2.13, d, $J = 1.3$ Hz, 3H). Además, a δ 6.72 (q, $J = 1.3$ Hz, 1H) se pudo notar la señal relacionada al protón H-3 enlazado al carbono sp^2 de dicho doble enlace. El valor de las J en H-3 y H-11 establece que se trata de un acoplamiento a larga distancia, mientras que la similitud entre las J confirma un acoplamiento de tipo alílico. Por otro lado, a δ 5.24 (s, 2H) se observó la señal correspondiente a los protones H-12 del metileno, mientras que a δ 3.53 (s, 3H) se observó la señal de los tres protones H-13 del grupo metoxilo. En la región de protones aromáticos se identificaron las señales características de H-6, H-7 y H-8, a δ 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H) y 7.81 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), respectivamente. Las J permitieron establecer que los tres protones están acoplados entre sí y que se encuentran en las posiciones *orto* uno respecto al otro.

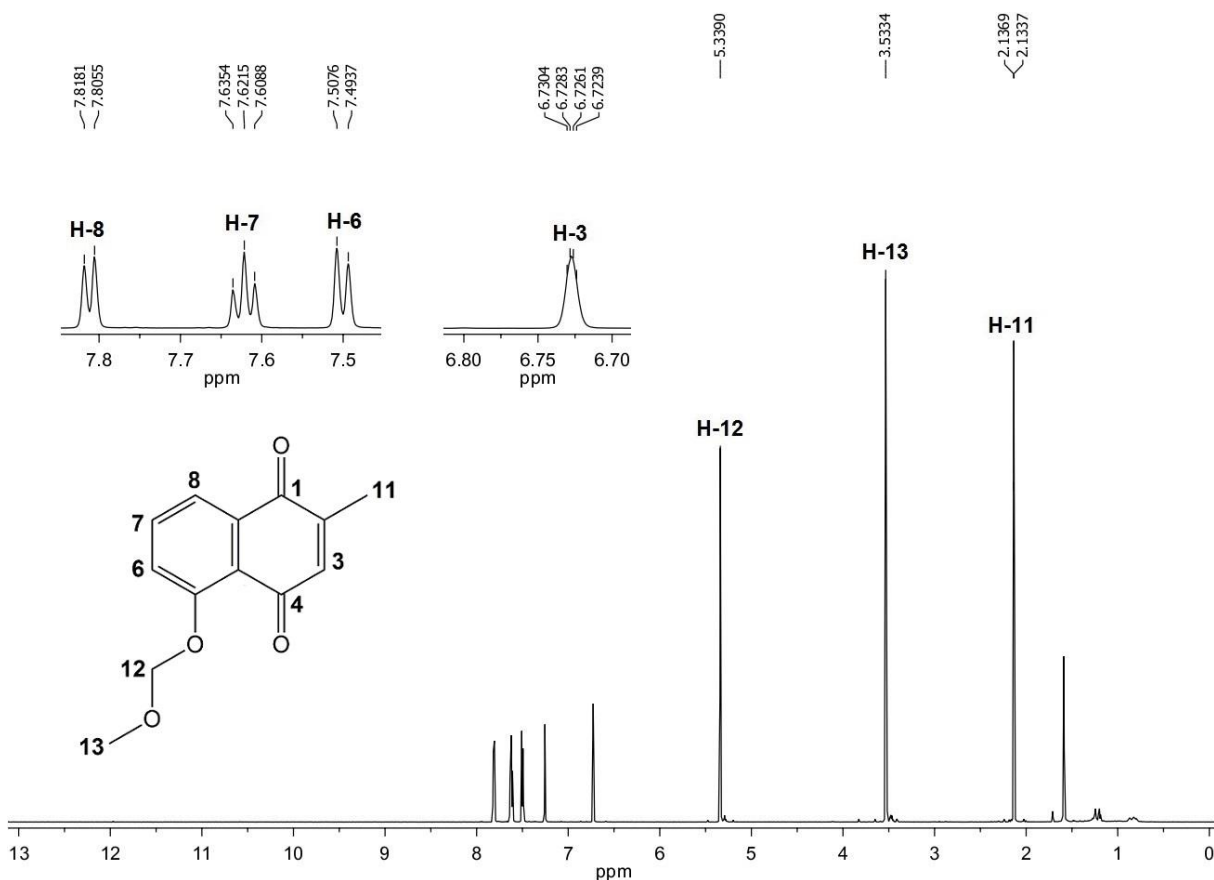


Figura 2.10. Espectro de RMN- ^1H de **1b** (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

Aunque todos los desplazamientos concordaron con lo descrito por Maruo *et al.* (2013), no se pudo apreciar la multiplicidad (dd) y las J (1-3 Hz aproximadamente) que pudiesen corroborar el acoplamiento a larga distancia entre H-6 y H-8, lo cual se atribuye a la diferencia en la potencia de los equipos empleados para los análisis (Tabla 2.1). Asimismo, en el cromatograma se observó un pico ($T_r = 17.0$ min) correspondiente a restos del precursor **1a**; sin embargo, en el espectro de RMN- ^1H no se apreciaron las señales típicas de esta molécula, confirmando que se encontraba en mínima cantidad. Entonces, se continuaron con las reacciones de dimerización y desprotección para la obtención de los productos diméricos.

Tabla 2.1. Datos de RMN-¹H obtenidos para el compuesto **1b** (5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) y su comparación con los valores reportados por Maruo *et al.* (2013).

Posición	Compuesto 1b	Maruo <i>et al.</i> (2013)
	600 MHz, CDCl ₃ δ _H en ppm (m, J = Hz, H)	400 MHz, CDCl ₃ δ _H en ppm (m, J = Hz, H)
3	6.72 (q, J = 1.3, 1H)	6.73 (q, J = 1.6, 1H)
6	7.50 (d, J = 8.3, 1H)	7.51 (dd, J = 8.4, 1.2, 1H)
7	7.62 (t, J = 8.0, 1H)	7.63 (dd, J = 8.4, 7.6, 1H)
8	7.81 (d, J = 7.6, 1H)	7.81 (dd, J = 7.6, 1.2, 1H)
11	2.13 (d, J = 1.3, 3H)	2.14 (d, J = 1.6, 3H)
12	5.34 (s, 2H)	5.35 (s, 2H)
13	3.53 (s, 3H)	3.54 (s, 3H)

2.3.2. Síntesis de (±)-12,12a-dihidro-1,7-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5H-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5aH)-tetrona (**1c**)

La molécula (±)-**1c** (un análogo de (±)-**1** con sus grupos hidroxilo protegidos como MOMO) se sintetizó siguiendo el procedimiento reportado por Maruo *et al.* (2013), quienes sintetizaron esta naftoquinona como una mezcla de enantiómeros a partir del monómero **1b** y a través de reacciones de dimerización que consistieron en adiciones de Michael intermoleculares e intramoleculares producidas de manera secuencial, aprovechando que los tautómeros de las 1,4-naftoquinonas son buenos nucleófilos y pueden acoplarse con sus naftoquinona correspondiente (Kamo *et al.*, 2018a).

Como resultado, Maruo *et al.* (2013) obtuvieron 21.0 mg (63% de rendimiento) del dímero (±)-**1c** partiendo de 32.0 mg de **1b**. En este proyecto de tesis se partió de una mayor cantidad de **1b** (0.20 g) y el sólido crudo generado después de la reacción de dimerización se lavó con An, obteniendo el producto color blanco de interés (62.7 mg, 15% de rendimiento), aunque no fue sometido a etapas de purificación puesto que en ensayos previos llevados a cabo en el laboratorio se notó una drástica disminución en el rendimiento. Incluso, es posible que los autores emplearan bajas cantidades de **1b** por este motivo, aunque también cabe señalar que no mencionan el número de pasos necesarios para purificar (±)-**1c**. Sin embargo, después de su comparación por CCD, en el producto de la reacción se pudo detectar la presencia de un compuesto fluorescente de baja polaridad a 254 nm y sensible al revelador de KOH al 5% en

EtOH, con un valor de R_f distinto al de **1b** (0.375 en Hx/AcOEt 1:1), el cual correspondería a **(±)-1c**.

Por consiguiente, el sólido color blanco se analizó por RMN- ^1H , observándose las señales características del dímero esperado. Las señales pertenecientes a los protones aromáticos H-9, H-8 y H-8' se notaron a δ 7.79 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H) y 7.55 (dd, $J = 11.6, 7.7$ Hz, 1H), respectivamente; las J de H-9 indicaron su acoplamiento con protones en posiciones *orto* y *meta*, mientras que las J de H-8 y H-8' señalaron su acoplamiento con protones en posición *orto*. Las señales correspondientes a los protones aromáticos restantes se apreciaron a δ 7.54 (s, 1H, H-9') y 7.47 (m, 2H, H-7, 7').

A δ 5.27 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-12'b), 5.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-12'a), 5.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-12b) y 5.19 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-12a) se identificaron las señales de los protones de los metilenos de los grupos MOMO, en tanto que las señales de los tres protones de cada uno de los grupos metoxilo se observaron a δ 3.49 (s, 3H, H-13') y 3.46 (s, 3H, H-13). A campo alto se pudo notar la señal del protón H-3 (δ 2.86, d, $J = 7.9$ Hz, 1H), con una J que corroboró su acoplamiento con el protón H-11'a (δ 2.75, dd, $J = 14.8, 7.9$ Hz, 1H) del metileno cercano; el protón H-11'b se localizó a δ 3.51 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H) y su J confirmó que ambos protones del metileno H-11' son diastereotópicos. Asimismo, se observó que estos protones están acoplados entre sí, formando parte de un sistema AMX. Por último, a δ 1.68 (s, 3H) se notó la señal de los protones H-11 del grupo metilo. Las señales pertenecientes a **(±)-1c** se detallan en el espectro de RMN- ^1H de la Figura 2.11.

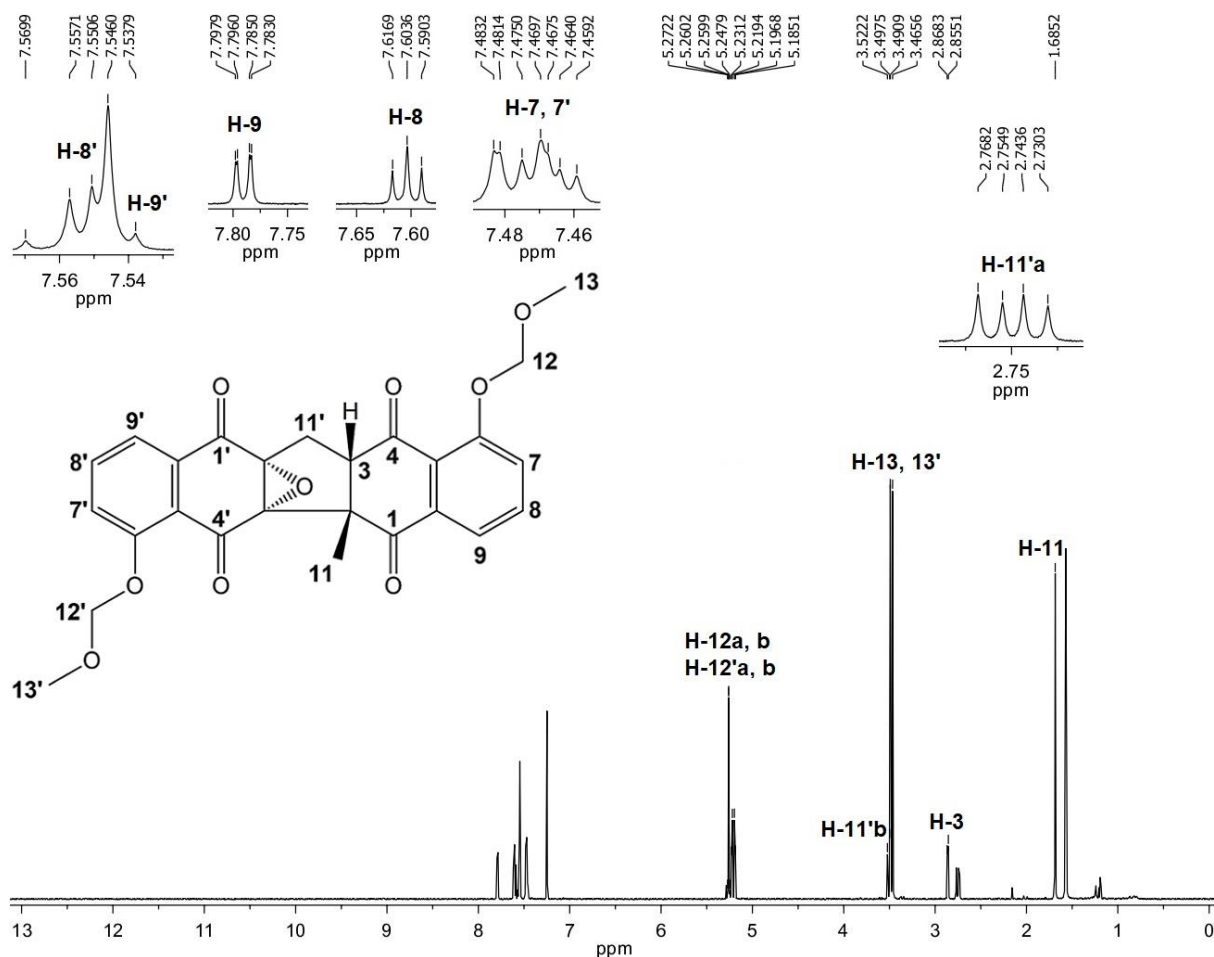


Figura 2.11. Espectro de RMN- ^1H de **($\pm$)-1c** obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

Todos los desplazamientos concordaron con lo reportado por Maruo *et al.* (2013) para este producto de síntesis y únicamente se apreciaron ligeras diferencias en la multiplicidad de los protones metilénicos de los grupos MOMO y uno de los protones aromáticos (H-8), atribuidas a la variación en la potencia de los equipos de RMN (Tabla 2.2). Además, **($\pm$)-1c** sintetizado en este trabajo se reportó como un racemato ya que fue obtenido siguiendo el protocolo de Maruo *et al.* (2013), quienes emplearon una estrategia biomimética para la síntesis de esta molécula y demostraron que el producto final de la reacción es una mezcla de dos enantiómeros, cuyos centros estereogénicos son generados en una sola etapa como resultado de las adiciones de Michael (Kamo *et al.*, 2016). Por lo tanto, el racemato **($\pm$)-1c** se empleó en las reacciones de síntesis de **($\pm$)-1** y **($\pm$)-2**.

Tabla 2.2. Datos de RMN- ^1H obtenidos para el compuesto **(±)-1c** y su comparación con los valores reportados por Maruo *et al.* (2013).

Posición	Compuesto (±)-1c	Maruo <i>et al.</i> (2013)
	600 MHz, CDCl_3 δ_{H} en ppm (m, J = Hz, H)	400 MHz, CDCl_3 δ_{H} en ppm (m, J = Hz, H)
3	2.86 (d, J = 7.9, 1H)	2.87 (d, J = 7.6, 1H)
7, 7'	7.47 (m, 2H)	7.48 (m, 2H)
8	7.60 (t, J = 8.0, 1H)	7.61 (dd, J = 8.4, 7.6, 1H)
8'	7.55 (dd, J = 11.6, 7.7, 1H)	7.56 (dd, J = 11.6, 7.6, 1H)
9	7.79 (dd, J = 7.8, 1.2, 1H)	7.79 (dd, J = 7.6, 1.2, 1H)
9'	7.54 (s, 1H)	7.54 (s, 1H)
11	1.68 (s, 3H)	1.69 (s, 3H)
11'	11'a: 2.75 (dd, J = 14.8, 7.9, 1H)	11'a: 2.75 (dd, J = 14.8, 7.6, 1H)
	11'b: 3.51 (d, J = 14.8, 1H)	11'b: 3.51 (d, J = 14.8, 1H)
12	12a: 5.19 (d, J = 7.0, 1H)	5.21 (dd, J = 14.8, 7.2, 2H)
	12b: 5.22 (d, J = 7.0, 1H)	
12'	12'a: 5.25 (d, J = 7.2, 1H)	5.26 (s, 2H)
	12'b: 5.27 (d, J = 7.2, 1H)	
13	3.46 (s, 3H)	3.47 (s, 3H)
13'	3.49 (s, 3H)	3.49 (s, 3H)

2.3.3. Síntesis de (±)-epóxido de zeylanona (1)

El compuesto **(±)-1** se sintetizó siguiendo el procedimiento reportado por Maruo *et al.* (2013) y en su investigación, estos autores obtuvieron 0.12 g de **(±)-1** (91% de rendimiento) partiendo de 0.17 g de **(±)-1c**, mediante una hidrólisis en medio ácido con AcOH y a 100°C. Para la síntesis de **(±)-1** realizada en este proyecto se usaron 0.13 g del sólido con **(±)-1c**, con un rendimiento del 14% (14.8 mg). Además de los cambios citados en el procedimiento para la síntesis de **1b** y **(±)-1c**, la diferencia notable en el rendimiento de **(±)-1** también podría atribuirse a la etapa de purificación adicional, ya que fue necesario el uso de placas preparativas para la recuperación del producto de interés. Igualmente, aunque se emplearon las mismas condiciones de reacción (agitación constante durante 5 h a 100°C), se utilizó una cantidad diferente del producto de partida, por lo que el volumen de AcOH se modificó (10.7 mL en comparación con los 13 mL reportados por los autores).

Posteriormente, el compuesto **(±)-1** se analizó por UHPLC-FTMS para su caracterización. El producto analizado mostró un T_r de 14.1 min (a 254 nm) y un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 391, coincidiendo con la molécula de interés, cuya fórmula molecular es $C_{22}H_{14}O_7$, con un peso molecular de 390 Da (Figura 2.12). En el espectro de masas se observaron los diferentes aductos formados, incluyendo el ion molecular $[M+H]^+$, donde se visualizaron algunos fragmentos característicos de compuestos de tipo naftoquinona. Se observó la pérdida de un fragmento hidroxilo (17 Da) a m/z 373 a partir del ion molecular $[M+H]^+$, dando como resultado un ion $C_{22}H_{13}O_6^+$. A partir de este ion generado, se notaron pérdidas de moléculas de monóxido de carbono (28 Da) a m/z 345, 317 y 161, obteniéndose los probables iones $C_{21}H_{13}O_5^+$, $C_{20}H_{13}O_4^+$ y $C_9H_5O_3^+$, respectivamente. Otros fragmentos intermedios notables fueron producidos por la probable pérdida de una estructura aromática de 103 Da a m/z 214, originándose un ion $C_{12}H_6O_4^+$, así como la subsecuente pérdida de un fragmento acetilénico (25 Da) a m/z 189, con la generación de un ion $C_{10}H_5O_4^+$ (Vessecchi *et al.*, 2012).

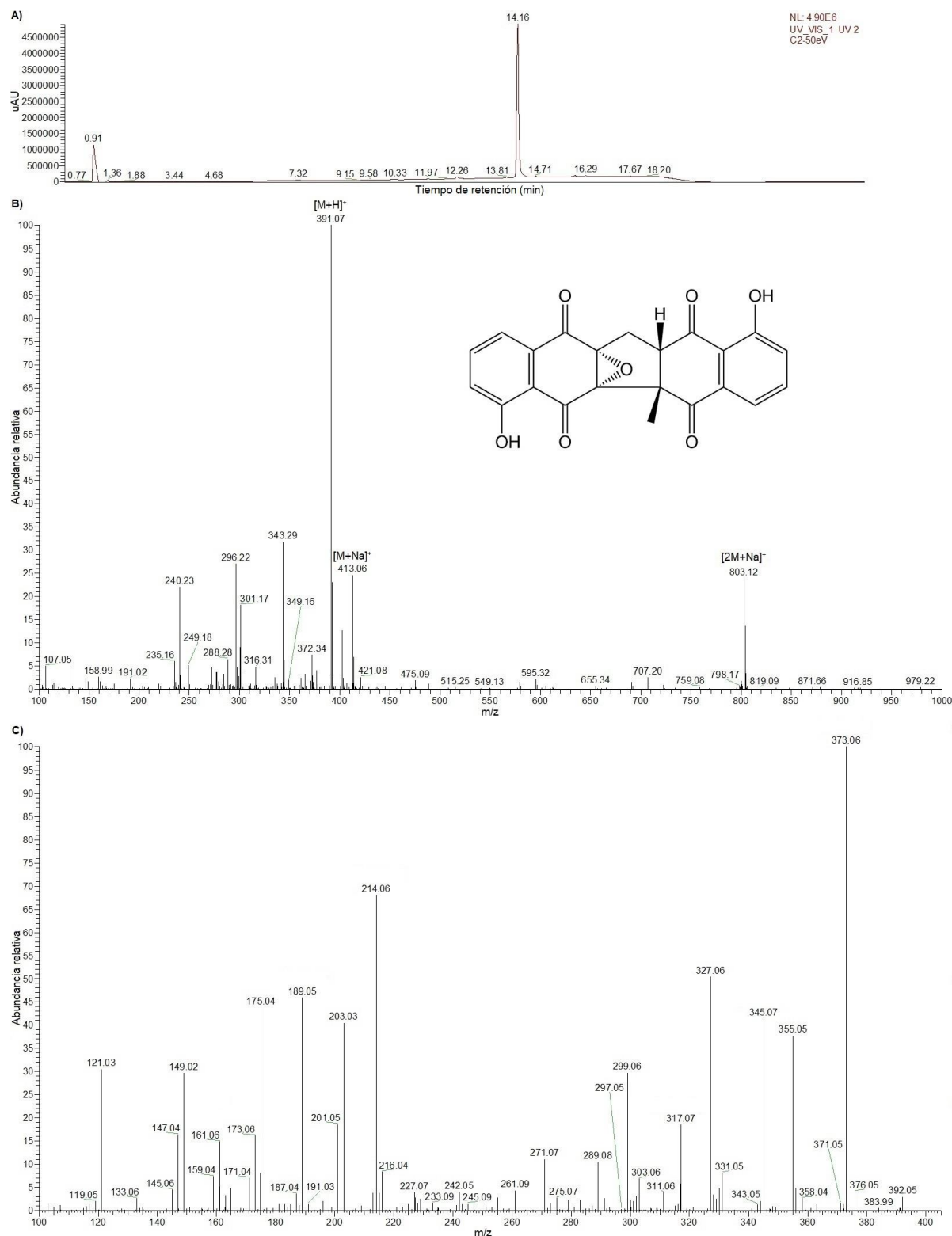


Figura 2.12. Cromatograma (A), espectro de masas con ion molecular $[M+H]^+$ y aductos (B) y espectro de masas de ion molecular $[M+H]^+$ (C) de $(\pm)$ -1 (epóxido de zeylanona, fórmula molecular $C_{22}H_{14}O_7$, $T_r = 14.1$ min, $[M+H]^+$ m/z 391.07, masa exacta: 390.0740).

En el espectro de RMN- ^1H se observaron las señales pertenecientes al producto **(±)-1**. En primera instancia, se identificaron las señales de los protones de los grupos hidroxilo enlazados a los carbonos 6 y 6', a δ 12.14 (s, 1H) y 11.16 (s, 1H), respectivamente; estas señales se localizaron a campo bajo ya que los protones están altamente desapantallados debido a que forman puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo cercanos.

Por otra parte, a campo alto se observó la señal de los protones H-11 del grupo metilo (δ 1.63, s, 3H). Seguidamente, a δ 2.75 (dd, $J = 15.0, 7.7$ Hz, 1H) y 3.62 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H) se notaron las señales de los protones H-11'a y H-11'b del metileno, mientras que el protón H-3 del metino se observó a δ 3.01 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H). Las J y la multiplicidad demostraron que estos protones están acoplados entre sí y que forman parte de un sistema AMX; la $J = 15.0$ Hz mostró que los protones H-11'a y H-11'b son diastereotópicos y la $J = 7.7$ Hz resaltó el acoplamiento entre H-11'a y H-3.

Luego, en la zona de protones aromáticos se pudo notar las señales características de dichos protones. A δ 7.67 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H) y 7.54 (dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H) se observaron las señales de los protones H-9 y H-9'; la multiplicidad y las J indicaron que cada uno se encuentra acoplado con protones en posiciones *orto* y *meta*. También se localizaron las señales de los cuatro protones aromáticos restantes, a δ 7.63 (m, 2H, H-8, 8') y 7.23 (m, 2H, H-7, 7'). Las señales correspondientes a **(±)-1** se pueden apreciar en el espectro de RMN- ^1H de la Figura 2.13.

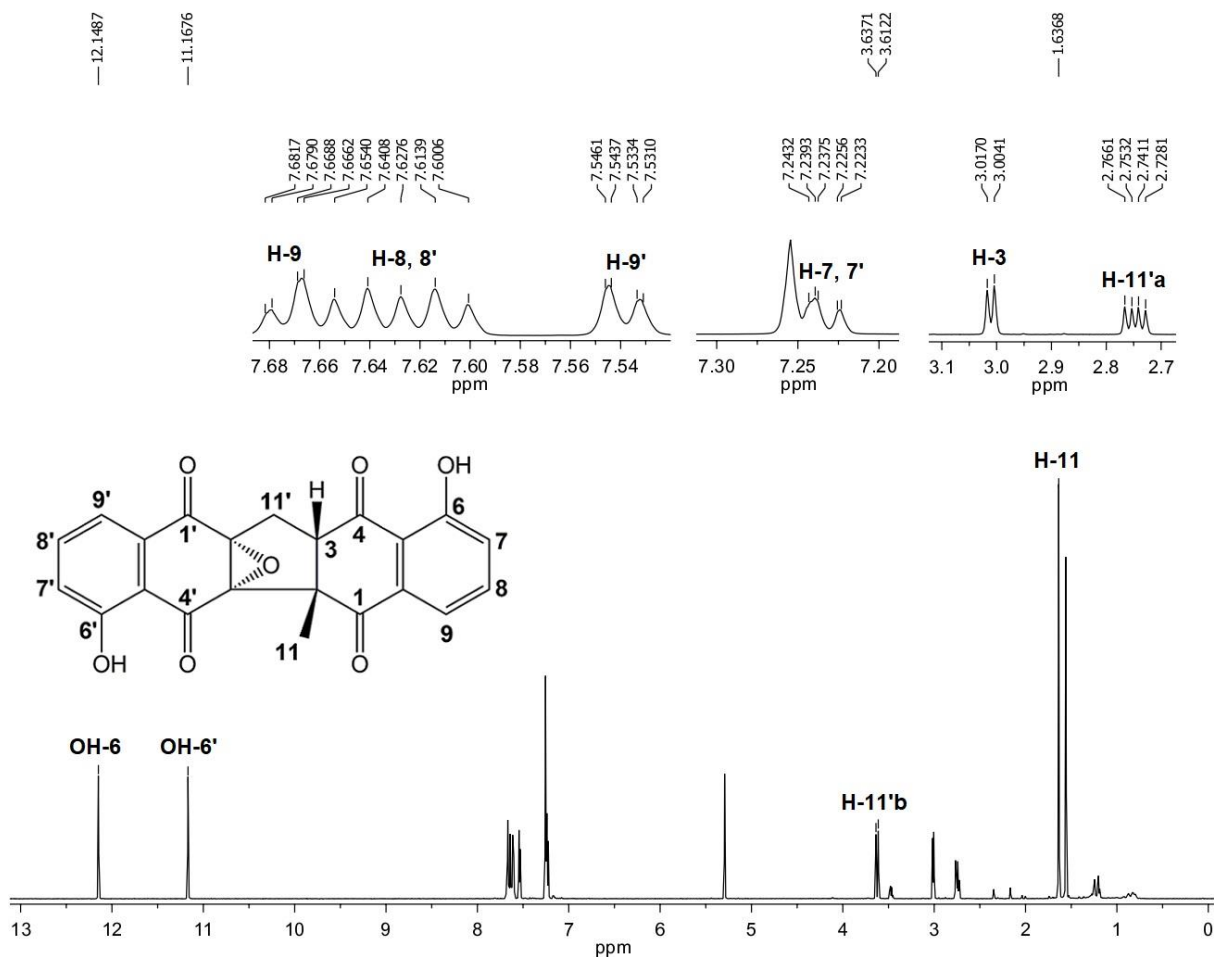


Figura 2.13. Espectro de RMN- ^1H de ($\pm$)-1 (epóxido de zealanona) obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

A pesar de las variaciones en la multiplicidad para los protones aromáticos debido a la diferencia en la potencia de los equipos, los desplazamientos coincidieron con lo descrito por Uc-Cachón *et al.* (2013), por lo que los datos espectroscópicos y espectrométricos sustentaron que el compuesto obtenido es el epóxido ($\pm$)-1 (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Datos de RMN-¹H obtenidos para el compuesto **(±)-1** (epóxido de zeylanona) y su comparación con los valores reportados por Uc-Cachón *et al.* (2013).

Posición	Compuesto (±)-1 600 MHz, CDCl ₃ δ_H en ppm (m, J = Hz, H)	Uc-Cachón <i>et al.</i> (2013) 400 MHz, CDCl ₃ δ_H en ppm (m, J = Hz, H)
3	3.01 (d, J = 7.7, 1H)	3.01 (d, J = 7.6, 1H)
OH-6	12.14 (s, 1H)	12.15 (s, 1H)
OH-6'	11.16 (s, 1H)	11.17 (s, 1H)
7, 7'	7.23 (m, 2H)	7: 7.26 (dd, J = 8.0, 2.0, 1H) 7': 7.24 (dd, J = 8.0, 1.2, 1H)
8, 8'	7.63 (m, 2H)	8: 7.65 (t, J = 8.0, 1H) 8': 7.62 (t, J = 8.0, 1H)
9	7.67 (dd, J = 7.7, 1.6, 1H)	7.68 (dd, J = 7.6, 2.0, 1H)
9'	7.54 (dd, J = 7.6, 1.4, 1H)	7.55 (dd, J = 7.2, 1.2, 1H)
11	1.63 (s, 3H)	1.62 (s, 3H)
11'	11'a: 2.75 (dd, J = 15.0, 7.7, 1H) 11'b: 3.62 (d, J = 15.0, 1H)	11'a: 2.73 (dd, J = 15.0, 7.6, 1H) 11'b: 3.63 (d, J = 15.0, 1H)

2.3.4. Síntesis de **(±)-zeylanona (2)**

Para la síntesis del producto **(±)-2** también se procedió de acuerdo a la metodología descrita por Maruo *et al.* (2013), quienes sintetizaron este compuesto a partir de **(±)-1c**. La reacción se llevó a cabo en dos pasos: una primera reacción para la desprotección de los grupos hidroxilo en la molécula de interés, partiendo de 0.28 g de **(±)-1c** en medio ácido (AcOH) y KI. El concentrado de reacción se mantuvo en agitación constante con *p*-TsOH·H₂O y tolueno para favorecer la apertura del anillo epóxido y la formación del doble enlace, dando como resultado 0.22 g (99% de rendimiento después de dos etapas) de la naftoquinona dimérica **(±)-2**.

En la síntesis efectuada en este trabajo de tesis se utilizaron 0.16 g del sólido crudo blanco con el producto **(±)-1c**, obteniendo 30.7 mg de **(±)-2** con un rendimiento del 25% después de dos pasos. Al igual que para el compuesto **(±)-1**, la variación en los rendimientos de reacción en comparación con Maruo *et al.* (2013) podría deberse a diferentes factores, como los cambios en las proporciones de los reactivos para la síntesis de los productos **1b** y **(±)-1c**. Otro factor a considerar es que se empleó una cantidad diferente de precursor, por lo que las cantidades del resto de reactivos para la generación de **(±)-2** se calcularon considerando esto, a pesar de que

las condiciones de ambas reacciones (agitación constante en AcOH por 1 h a 100°C, así como en tolueno durante 20 h a 70°C) fueron idénticas a las reportadas por Maruo *et al.* (2013).

Para elucidar la estructura del compuesto **(±)-2** también se realizó un análisis por UHPLC-FTMS. La molécula de interés presentó un T_r de 13.8 min y un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 375, datos que coincidieron con el producto esperado, que posee una fórmula molecular $C_{22}H_{14}O_6$ y un peso molecular de 374 Da (Figura 2.14). En el espectro de masas se pudieron apreciar los aductos formados y el ion molecular $[M+H]^+$, observándose los fragmentos típicos para esta naftoquinona dimérica, como la pérdida de un fragmento hidroxilo (17 Da) a m/z 357 que generó un ion $C_{21}H_{13}O_5^+$. Al igual que el epóxido **(±)-1**, se notaron pérdidas subsecuentes de moléculas de monóxido de carbono (28 Da) a m/z 329, 301 y 273, lo cual dio como resultado la formación de fragmentos iónicos $C_{21}H_{13}O_4^+$, $C_{20}H_{13}O_3^+$ y $C_{19}H_{13}O_2^+$, respectivamente. Posteriormente, la pérdida de un fragmento fenólico (92 Da) a m/z 181 originó una probable estructura iónica $C_{13}H_9O^+$ (Vessecchi *et al.*, 2012).

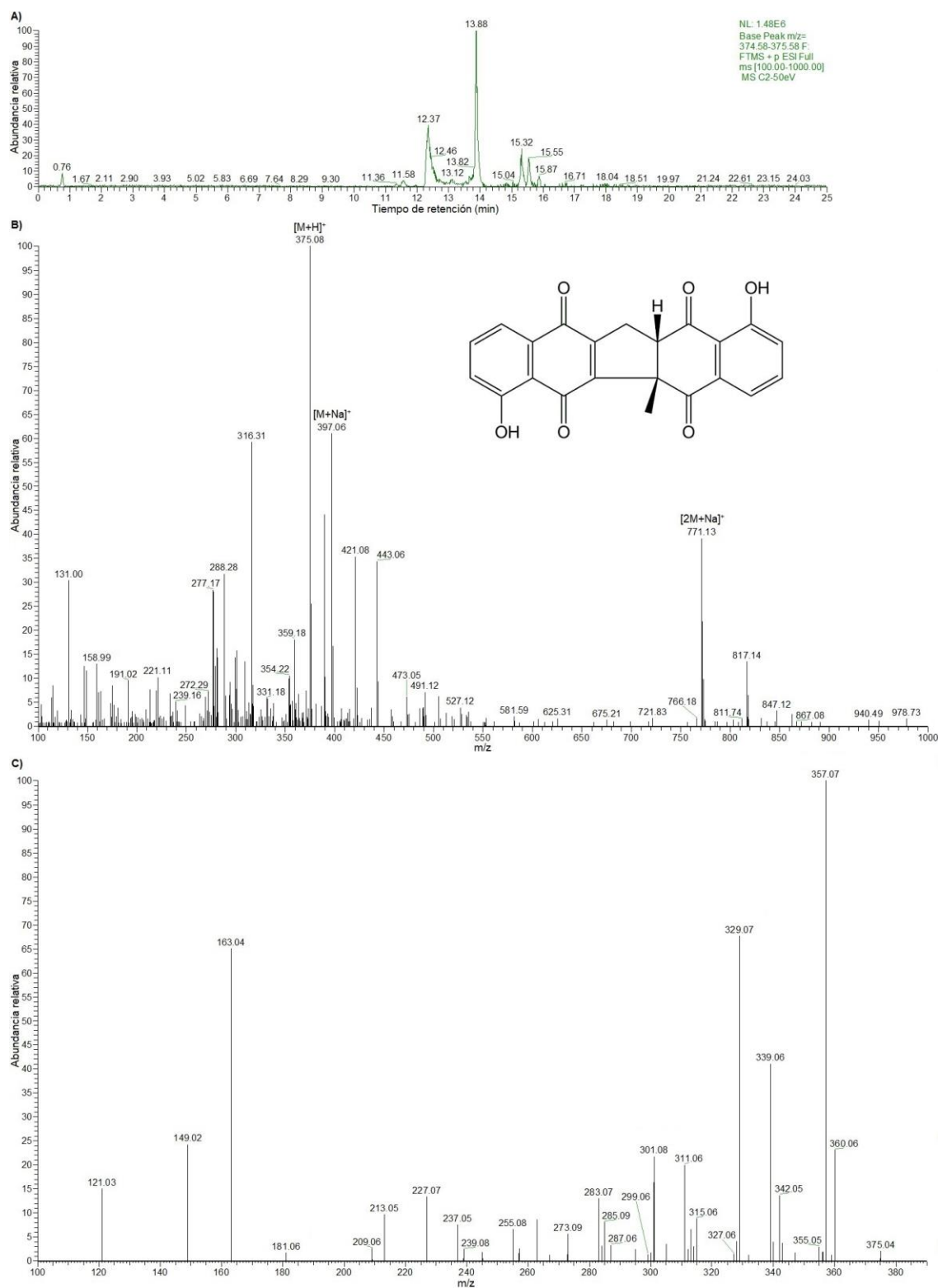


Figura 2.14. Cromatograma (A), espectro de masas con ion molecular $[M+H]^+$ y aductos (B) y espectro de masas de ion molecular $[M+H]^+$ (C) de ($\pm$)-2 (zeylanona, fórmula molecular $C_{22}H_{14}O_6$, $T_r = 13.8$ min, $[M+H]^+$ m/z 375.08, masa exacta: 374.0790).

Después de analizar el espectro de RMN- ^1H , se identificaron las señales características del producto de síntesis (Figura 2.15). A campo bajo aparecieron las señales de los protones de los grupos hidroxilo de los carbonos 6 y 6' (δ 12.16, s, 1H y 12.05, s, 1H), los cuales están desapantallados ya que forman puentes de hidrógeno. Seguidamente, en la región de protones aromáticos se notaron las señales características de estos átomos, a δ 7.28 (m, 2H) para los protones H-7 y H-7', así como a δ 7.59 (m, 2H) para los protones H-8' y H-9'. A δ 7.68 (dd, J = 8.4, 7.5 Hz, 1H) y 7.54 (dd, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H) se observaron las señales de los protones H-8 y H-9, respectivamente. La J = 7.5 Hz indicó que estos protones se encuentran en posición *orto* uno respecto al otro y las J restantes indican que se encuentran acoplados con otro protón en posiciones *orto* y *meta* (H-7). A campo alto se observó la señal perteneciente a los tres protones H-11 del grupo metilo (δ 1.83, s, 3H), mientras que a δ 3.45 (m, 2H) se pudo apreciar la señal de los protones H-3 y H-11'b. El protón metilénico H-11'a se observó a δ 3.09 (dd, J = 17.3, 7.2 Hz, 1H).

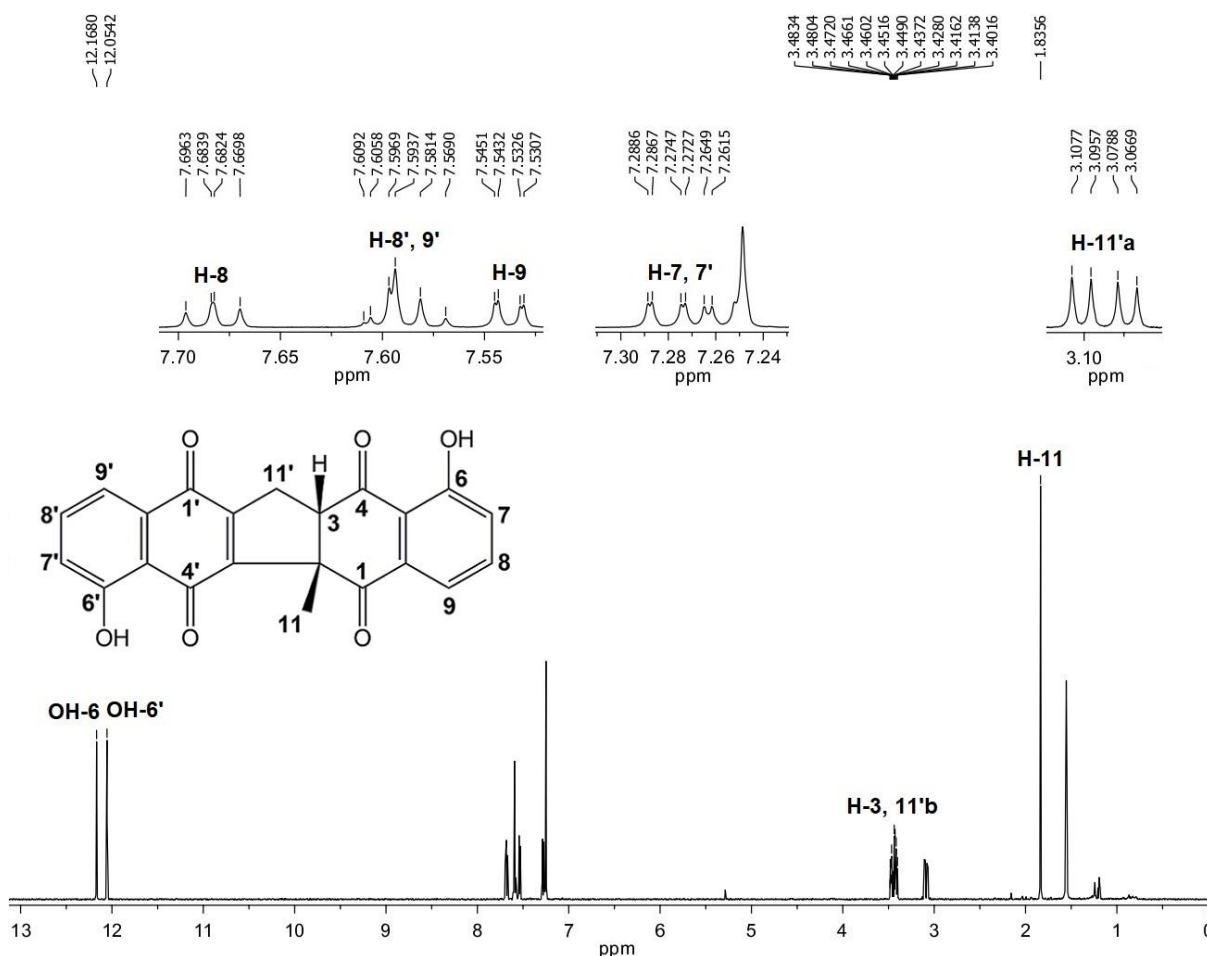


Figura 2.15. Espectro de RMN- ^1H de ($\pm$)-2 (zeylanona) obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

Los desplazamientos concordaron con lo reportado por Gu *et al.* (2004), con algunas diferencias observadas en la multiplicidad de los protones aromáticos, uno de los protones del metileno y el protón H-3 del metino, las cuales se atribuyeron a la potencia de los equipos (Tabla 2.4). En resumen, los análisis espectroscópicos y espectrométricos permitieron establecer la obtención de ($\pm$)-2.

Tabla 2.4. Datos de RMN-¹H obtenidos para el compuesto ($\pm$)-2 (zeylanona) y su comparación con los valores reportados por Gu *et al.* (2004).

Posición	Compuesto ($\pm$)-2 600 MHz, CDCl ₃ δ_H en ppm (m, J = Hz, H)	Gu <i>et al.</i> (2004) 500 MHz, CDCl ₃ δ_H en ppm (m, J = Hz, H)
3, 11'b	3.45 (m, 2H)	3: 3.43 (dd, J = 9.0, 6.5, 1H) 11'b: 3.47 (dd, J = 16.5, 9.0, 1H)
OH-6	12.16 (s, 1H)	12.19 (s, 1H)
OH-6'	12.05 (s, 1H)	12.08 (s, 1H)
7, 7'	7.28 (m, 2H)	7: 7.29 (dd, J = 8.5, 1.0, 1H) 7': 7.28 (dd, J = 7.5, 2.0, 1H)
8	7.68 (dd, J = 8.4, 7.5, 1H)	7.70 (dd, J = 8.5, 7.5, 1H)
8', 9'	7.59 (m, 2H)	8': 7.60 (dd, J = 8.0, 7.5, 1H) 9': 7.62 (dd, J = 8.0, 2.0, 1H)
9	7.54 (dd, J = 7.5, 1.1, 1H)	7.55 (dd, J = 7.5, 1.0, 1H)
11	1.83 (s, 3H)	1.85 (s, 3H)
11'a	3.09 (dd, J = 17.3, 7.2, 1H)	3.10 (dd, J = 16.5, 6.5, 1H)

2.3.5. Síntesis de ramentona (3b)

Se procedió a la obtención del compuesto **3b** con la finalidad de sintetizar el derivado hidroxilado. Se siguió el procedimiento de Dessolin *et al.* (2001) y Schroeder *et al.* (2016), quienes sintetizaron **3b** a partir de **3a** y **4** por medio de reacciones de doble acilación de Friedel-Crafts (o reacción de Haworth) en presencia de AlCl₃ y NaCl, seguido de una demetilación con HCl a baja temperatura. El rendimiento en la síntesis de **3b** fue del 14% (0.14 g), un rendimiento debajo del reportado por Schroeder *et al.* (2016), quienes obtuvieron **3b** con un rendimiento del 55% (1.2 g) a partir de 2.0 y 4.9 g de los precursores **3a** y **4**, respectivamente. La diferencia entre los rendimientos podría deberse a que se realizaron modificaciones con respecto a la metodología descrita. Como se mencionó anteriormente, en este proyecto de tesis se emplearon 0.69 g de **3a** y 1.9 g de **4**,

cantidades utilizadas con la finalidad de realizar la reacción a menor escala, aunque terminó por afectar el rendimiento. Igualmente, puesto que Schroeder *et al.* (2016) no indicaron el tiempo óptimo para llevar a cabo la reacción y a que el uso de un tapete de celita afectó considerablemente el rendimiento (en ensayos previos realizados en el laboratorio se obtuvieron 1.0-1.5 mg de producto de síntesis después de este paso), el proceso se llevó a cabo durante 5 min a 190°C y 1 h a 100°C, mientras que se omitió la etapa con el tapete de celita, tal como mencionan Dessolin *et al.* (2001). Adicionalmente, estos últimos autores reportaron que el compuesto **4** posee poca estabilidad aun si se almacena a bajas temperaturas y bajo atmósfera de N₂, lo que dificulta aún más la síntesis de **3b**.

Los resultados de GC-MS mostraron un pico abundante correspondiente a una molécula con un T_r de 19.4 min y un ion molecular [M]⁺ a *m/z* 204 (Figura 2.16). El espectro de masas se comparó con los datos reportados en la base datos NIST 11 y el patrón de fragmentación coincidió con el compuesto **3b**, de fórmula molecular C₁₁H₈O₄ y peso molecular de 204 Da. En el espectro de masas se pudo apreciar la pérdida de fragmentos característicos de naftoquinonas monoméricas con grupos hidroxilo tales como la droserona (**24**) o **1a** (Cetina Montejó, 2016). Por ejemplo, se notó la pérdida de una molécula de monóxido de carbono (28 Da) a *m/z* 176 por parte del ion molecular [M]⁺, lo que daría como resultado un radical iónico C₁₀H₈O₃^{•+}. Seguidamente, se observó la pérdida de un fragmento -CHO (29 Da) a *m/z* 147 (originando un radical iónico C₉H₇O₂^{•+}), con la posterior pérdida de un fragmento de tipo propileno (39 Da) a *m/z* 108 y la generación de otro radical iónico C₆H₄O₂^{•+}. También se observó un pico menos abundante, relacionado a una molécula con un T_r de 20.5 min, el cual correspondería al precursor **3a** (fórmula molecular de C₈H₁₀O₂ y peso molecular de 138 Da) (Dessolin *et al.*, 2001).

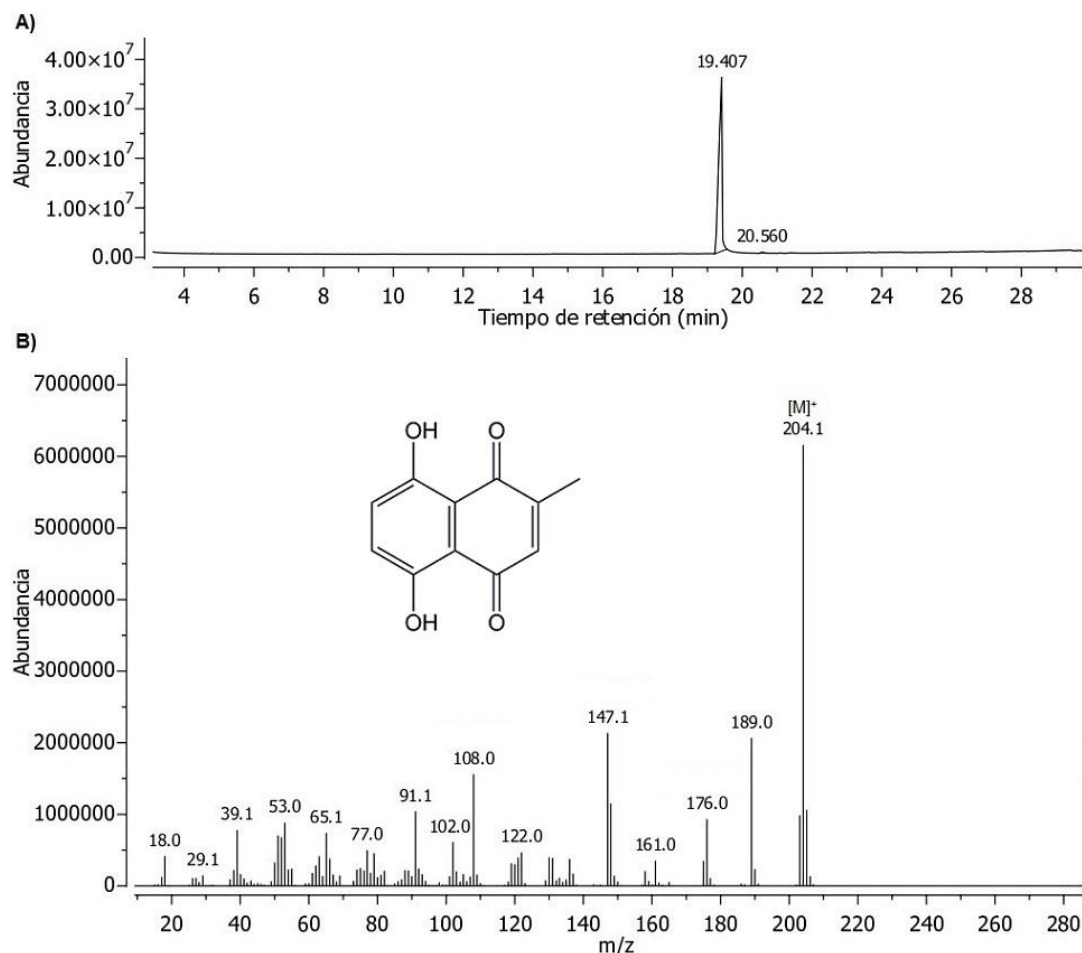


Figura 2.16. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) de **3b** (ramentona, fórmula molecular $C_{11}H_8O_4$, $T_r = 19.4$ min, $[M]^+$ m/z 204.1, masa exacta: 204.0423).

Por otro lado, el análisis de RMN- 1H mostró las señales características de **3b**. Se identificaron las señales correspondientes a los protones del grupo metilo unido a un doble enlace (δ 2.24, d, $J = 1.5$ Hz, 3H) y al protón enlazado al carbono sp^2 del mismo (δ 6.90, q, $J = 1.5$ Hz, 1H). Al igual que **1b**, el valor y similitud entre las J corroboró el acoplamiento a larga distancia entre estos protones alílicos.

Seguidamente, en el espectro se pudieron notar dos señales en la región de protones aromáticos, a δ 7.21 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H) y 7.19 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), las cuales pertenecen a los protones H-6 y H-7 del anillo. Ambas señales se apreciaron como un doblete a causa de la potencia del equipo y a que la molécula no es simétrica (por esta misma razón, una de las señales se encuentra ligeramente más desplazada hacia campo bajo); además se observó el efecto tejado, característico de un sistema AB. Por otro lado, las J de H-6 y H-7 indicaron que se trata de protones en posición *orto*. Por último, a campo bajo se notaron las señales correspondientes a

protones de grupos hidroxilo que forman puentes de hidrógeno, a δ 12.56 (s, 1H) y 12.44 (s, 1H) para los protones de los grupos hidroxilo unidos a los carbonos 5 y 8, respectivamente. Las señales pertenecientes a los protones de **3b** se detallan en el espectro de RMN- ^1H de la Figura 2.17.

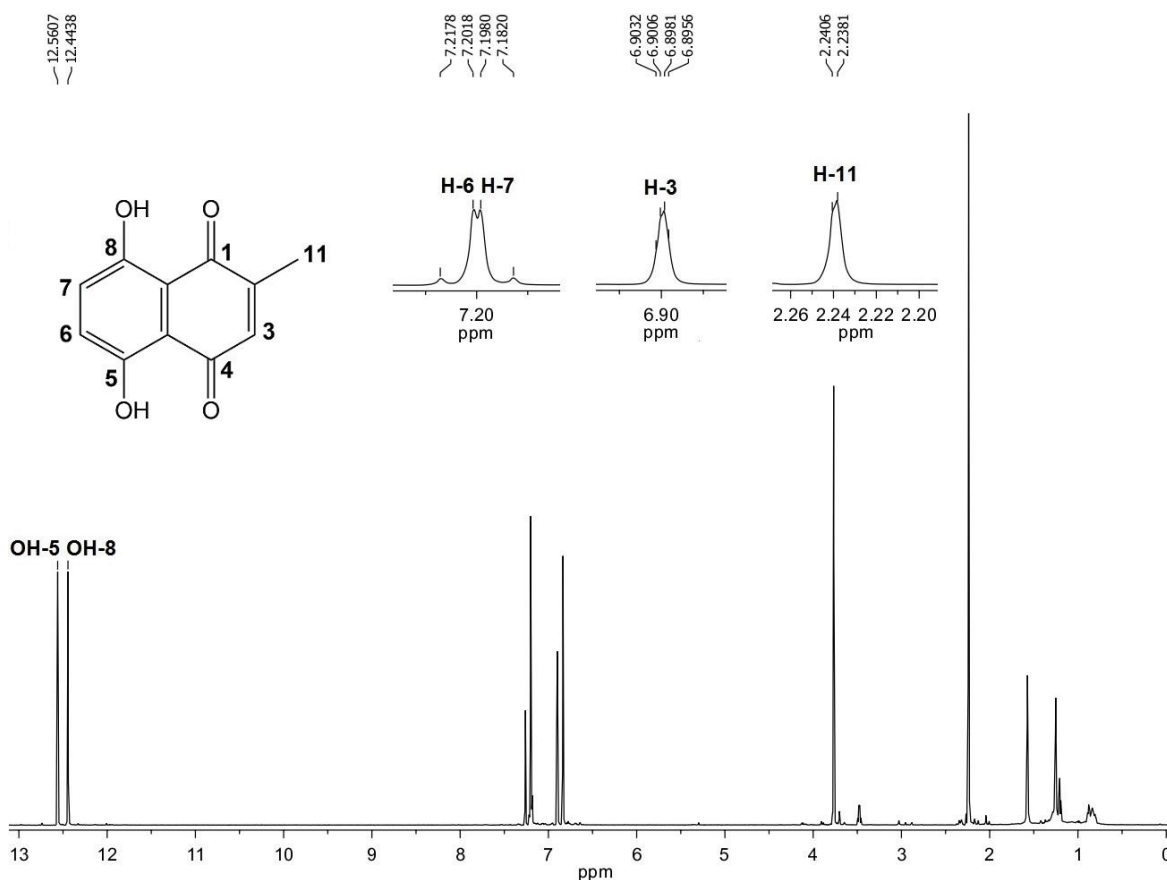


Figura 2.17. Espectro de RMN- ^1H de **3b** (ramentona) obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

Todos los desplazamientos coincidieron con lo reportado para esta molécula por Schroeder *et al.* (2016) y las diferencias en la multiplicidad y las J se atribuyeron a la potencia del equipo; incluso, este fue un factor importante, ya que permitió observar los acoplamiento a larga distancia, ayudando con la elucidación del compuesto esperado (Tabla 2.5). Aunque en el espectro de RMN- ^1H también se identificaron dos señales que coincidieron con los datos del precursor **3a** de acuerdo a la base de datos de PubChem (a δ 6.83, s, 4H y 3.77, s, 6H), en el cromatograma no se notó la abundancia de esta molécula; además, no se observaron señales pertenecientes a residuos de **4**. Entonces, se procedió a realizar la reacción para la protección de los grupos hidroxilo de **3b**.

Tabla 2.5. Datos de RMN-¹H obtenidos para el compuesto **3b** (ramentona) y su comparación con los valores reportados por Schroeder *et al.* (2016).

Posición	Compuesto 3b 600 MHz, CDCl ₃ δ_H en ppm (m, J = Hz, H)	Schroeder <i>et al.</i> (2016) 300 MHz, TMS δ_H en ppm (m, J = Hz, H)
3	6.90 (q, J = 1.5, 1H)	6.92 (s, 1H)
OH-5	12.56 (s, 1H)	12.59 (s, 1H)
6, 7	H-6: 7.21 (d, J = 9.6, 1H) H-7: 7.19 (d, J = 9.6, 1H)	7.22 (s, 2H)
OH-8	12.44 (s, 1H)	12.47 (s, 1H)
11	2.24 (d, J = 1.5, 3H)	2.26 (s, 3H)

2.3.6. Síntesis de 5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**3c**)

Para generar el derivado **3c** se siguió el procedimiento de Maruo *et al.* (2013), quienes emplearon MOMCl para la protección del grupo hidroxilo de **1a**, dando como resultado el producto **1b**, una 1,4-naftoquinona con un grupo MOMO como sustituyente. El rendimiento obtenido en la síntesis de **3c** fue del 52% (74.4 mg), partiendo de 0.10 g de **3b** y 0.15 mL de MOMCl. Puesto que **3c** es un compuesto del cual no se encuentran reportes acerca de las condiciones de síntesis, el rendimiento se comparó con el obtenido para el análogo **1b** (0.58 g, 94% de rendimiento), sintetizado a partir de 0.52 g de **1a** y 0.30 mL de MOMCl. Las diferencias esperadas en los rendimientos se atribuyeron a diversos factores, como las modificaciones en las cantidades de los reactivos, ya que se optó por utilizar las cantidades mencionadas anteriormente para los productos de partida con el objetivo de encontrar las condiciones idóneas que favorecieran la síntesis del derivado **3c** y estandarizar la reacción a menor escala. De igual forma, se empleó un tiempo de reacción de 3 h en lugar de 1.5 h descritas para la síntesis de **1b**.

En los resultados de GC-MS se observó un pico abundante correspondiente a una molécula con un T_r de 28.1 min y un ion molecular $[M]^+$ a m/z 292 (Figura 2.18). Este dato coincidió con el compuesto **3c** (fórmula molecular C₁₅H₁₆O₆ y peso molecular de 292 Da) y puesto que es una molécula nueva, no se encontró en la base de datos NIST 11. Dado que **3c** es un derivado de la naftoquinona **1b**, en el espectro de masas representado se observaron fragmentos característicos de esta clase de estructuras. La pérdida de un fragmento metoxilo (31 Da) a m/z 261 generaría el radical iónico C₁₄H₁₃O₅^{•+}. A su vez, esta estructura sufriría la pérdida de un fragmento metoximetilo (45 Da) a m/z 216, dando origen a un ion C₁₂H₈O₄⁺, con la posterior

pérdida de otro fragmento metoxilo (30 Da) a m/z 186 y la generación de un radical iónico $C_{11}H_6O_3^{+}$ (Vessecchi *et al.*, 2012). Por otro lado, se notaron dos picos menos abundantes, con T_r de 23.8 min y 30.5 min, los cuales podrían atribuirse a residuos del precursor **3b** (fórmula molecular $C_{11}H_8O_4$ y peso molecular de 204 Da) u otros productos derivados de la reacción (probable fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_4$ y peso molecular de 218 Da).

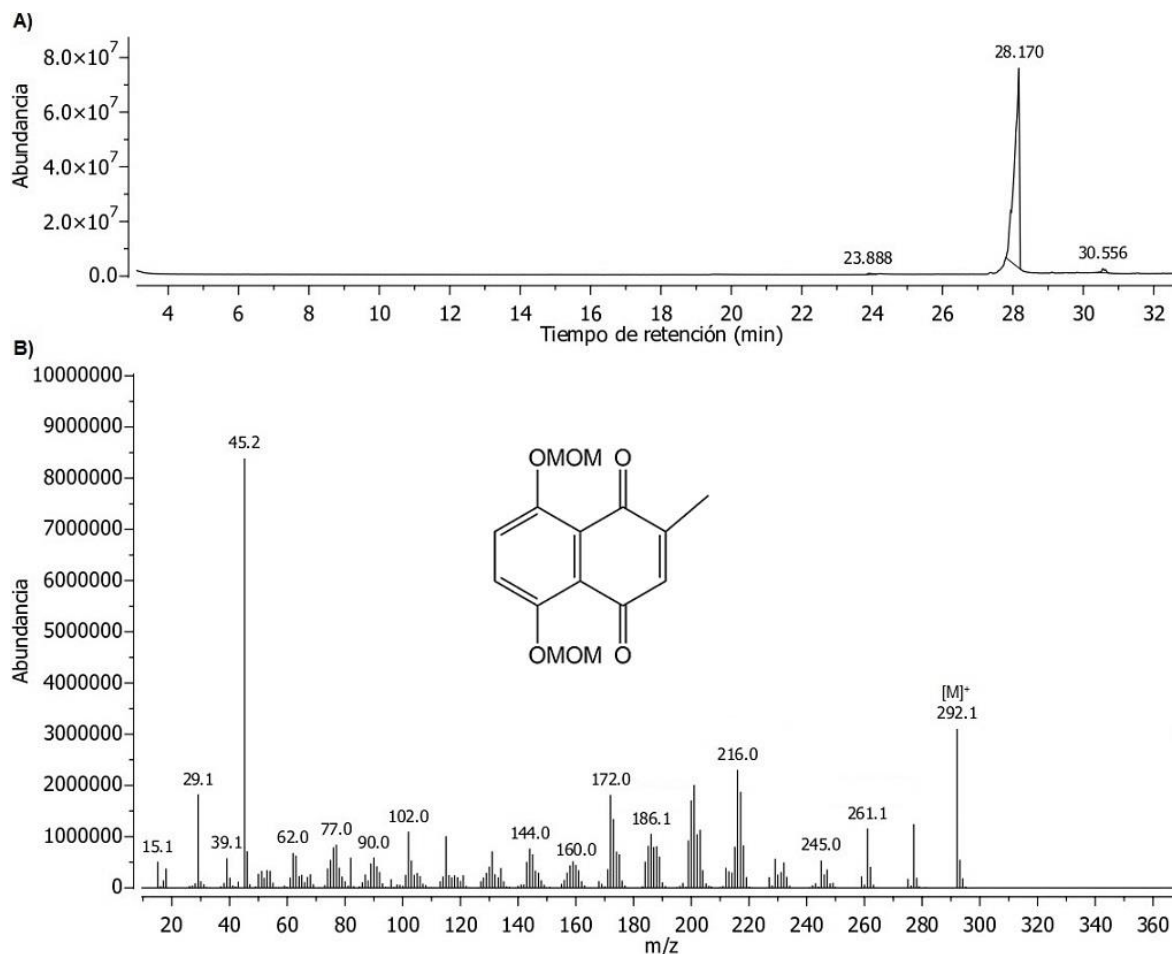


Figura 2.18. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) de **3c** (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona, fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_6$, T_r = 28.1 min, $[M]^+$ m/z 292.1, masa exacta: 292.0947).

El experimento de RMN- 1H realizado mostró las señales esperadas para el compuesto de interés (Figura 2.19). En primer lugar, a δ 5.27 (s, 2H) y 5.26 (s, 2H) se observaron las señales correspondientes a los protones de los metilenos H-14 y H-12. A campo alto también se observaron las señales pertenecientes a los tres protones de cada uno de los grupos metoxilo, a δ 3.55 (s, 3H) y 3.54 (s, 3H) para H-15 y H-13. De igual forma, las señales de los protones aromáticos H-6 y H-7 se notaron en la región correspondiente a estos, a δ 7.47 (d, J = 9.4 Hz, 1H) y 7.45 (d, J = 9.4 Hz, 1H); dichas señales aparecieron como un doblete y formando el efecto

tejado debido a las razones descritas con anterioridad. Por último, en el espectro de RMN- ^1H se apreciaron las señales de los protones del grupo metilo unido a un doble enlace (δ 2.11, d, J = 1.5 Hz, 3H, H-11) y del protón enlazado al carbono sp^2 de dicho doble enlace (δ 6.67, q, J = 1.5 Hz, 1H, H-3), cuyas J confirmaron el acoplamiento a larga distancia entre estos protones y un acoplamiento de tipo alílico.

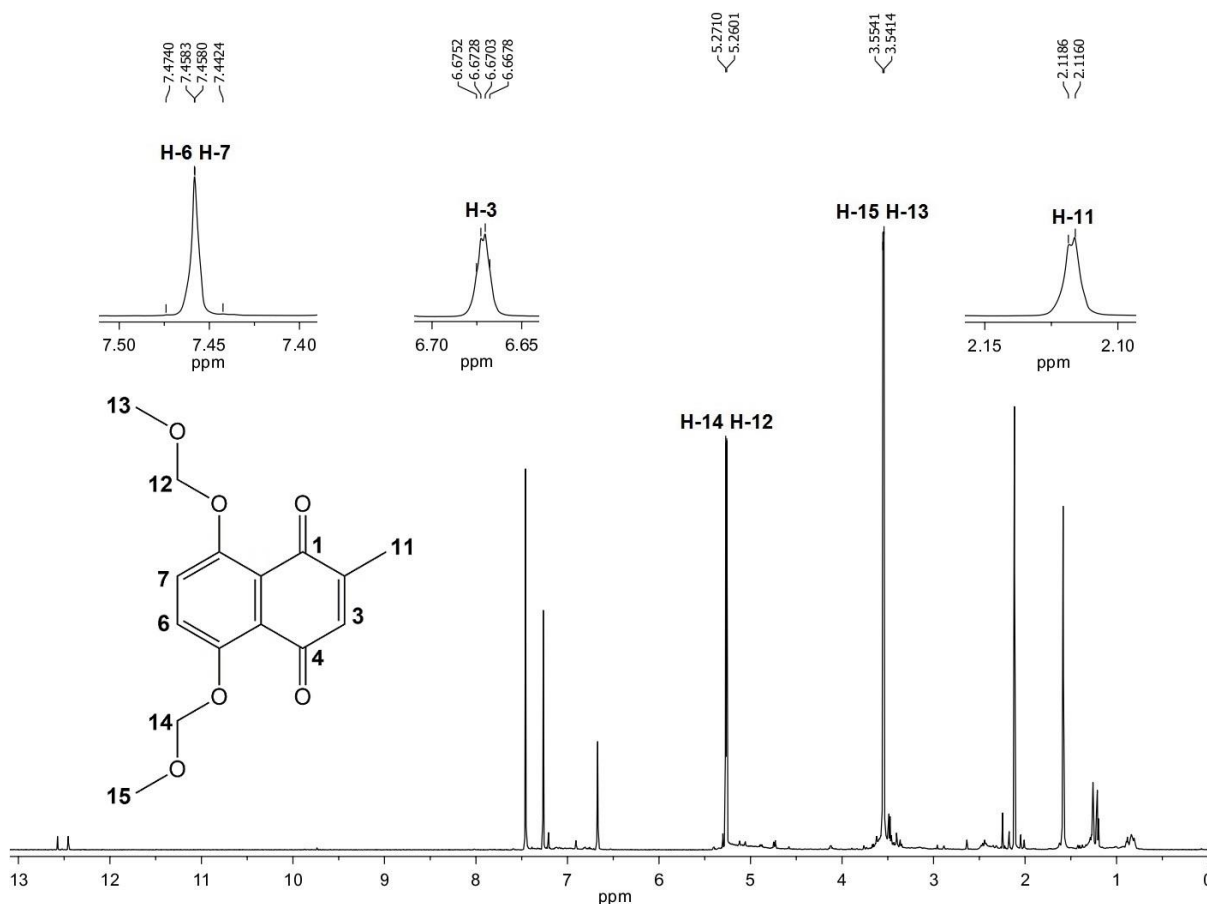


Figura 2.19. Espectro de RMN- ^1H de **3c** (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

El espectro de RMN- ^{13}C complementó lo observado en el análisis de RMN- ^1H para el producto **3c** (Figura 2.20). A campo bajo se notaron las señales típicas de carbonos pertenecientes a grupos carbonilo de cetonas, a δ 185.2 para C-4 y 184.4 para C-1. También se observaron las señales de dos carbonos aromáticos, altamente desplazados hacia campo bajo debido a que se encuentran enlazados a oxígeno (δ 152.2 para C-8 y 151.8 para C-5). A δ 125.1 y 124.8 se observaron las señales pertenecientes a dos carbonos sp^2 aromáticos cuaternarios (C-10 y C-9, respectivamente), mientras que se notaron dos señales a δ 122.7 y 122.6 para los carbonos 6 y 7. Las señales relacionadas con los carbonos de los grupos MOMO se observaron a δ 96.1 y

96.0 para los metilenos (C-12 y C-14), así como a δ 56.6 y 56.5 para los metilos (C-13 y C-15); las señales pertenecientes a los carbonos de los metilenos aparecen más desplazadas hacia campo bajo debido a que cada uno se encuentra unido a dos átomos de oxígeno. Finalmente, las dos señales de los carbonos 2 y 3 se observaron en la región de carbonos doblemente enlazados (δ 147.4 para C-2 y 135.7 para C-3), mientras que la señal del carbono sp^3 del grupo metilo (C-11) fue notable a δ 16.1.

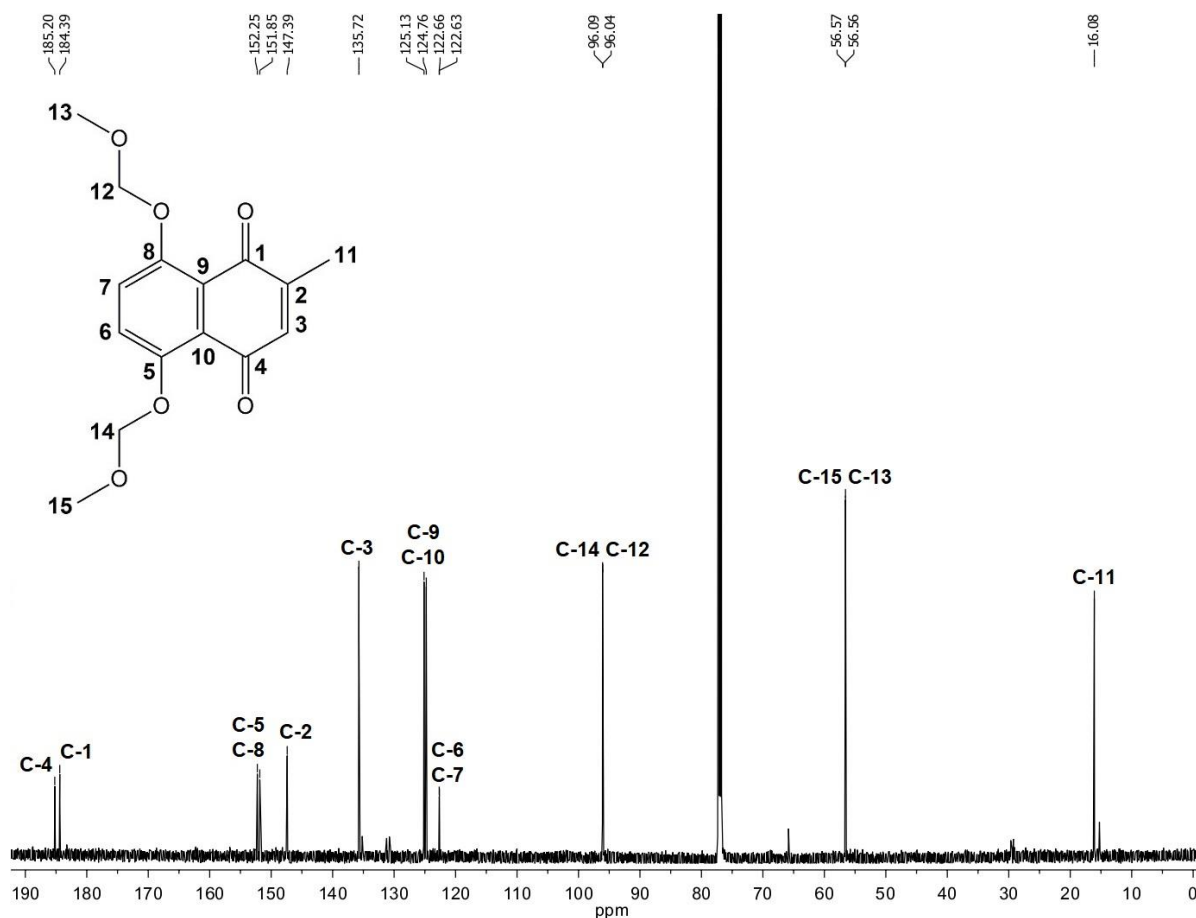


Figura 2.20. Espectro de RMN-¹³C de **3c** (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona) obtenido a 151 MHz en CDCl₃.

Con los resultados analizados, se determinó que el compuesto obtenido es el derivado **3c** (Tabla 2.6). No obstante, en el espectro de RMN-¹H también se notaron residuos de **3b** sin reaccionar. Se identificaron las señales pertenecientes a los protones de los grupos hidroxilo unidos a los carbonos 5 y 8 (δ 12.57, s, 1H; δ 12.45, s, 1H), al igual que la señal correspondiente al protón H-3 (δ 6.91, q, J = 1.1 Hz, 1H). Los protones aromáticos H-6 y H-7 de **3b** se observaron a δ 7.21 y 7.20, aunque se apreciaron como singuletes. Sin embargo, como se resaltó previamente, en el cromatograma no se observó en abundancia este compuesto. Por otro lado, se identificaron otras

señales a baja intensidad que podrían corresponder a alguna otra molécula derivada de **3c**, aunque como señala el cromatograma, este producto se encontraría en muy baja cantidad. Entonces, se procedió a realizar las reacciones de dimerización para la síntesis del derivado **(±)-3d**.

Tabla 2.6. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C obtenidos para el compuesto **3c** (5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona).

Posición	600 MHz, CDCl ₃ δ _H en ppm (m, J = Hz, H)	151 MHz, CDCl ₃ δ _C en ppm
1	-	184.4
2	-	147.4
3	6.67 (q, J = 1.5, 1H)	135.7
4	-	185.2
5	-	151.8
6	7.47 (d, J = 9.4, 1H)	122.7
7	7.45 (d, J = 9.4, 1H)	122.6
8	-	152.2
9	-	124.8
10	-	125.1
11	2.11 (d, J = 1.5, 3H)	16.1
12	5.26 (s, 2H)	96.0
13	3.54 (s, 3H)	56.5
14	5.27 (s, 2H)	96.1
15	3.55 (s, 3H)	56.6

2.3.7. Síntesis de **(±)-12,12a-dihidro-1,4,7,10-bis(metoximetoxi)-5a-metil-5b,11a-epoxi-5H-dibenzo[*b,h*]fluoren-5,6,11,13(5a*H*)-tetrona (3d)**

La síntesis de la naftoquinona **(±)-3d** implicó reacciones de dimerización, bajo condiciones similares a las ya mencionadas por Maruo *et al.* (2013) para la generación de **(±)-1c**: dimerización en medio básico durante 26 h a 0°C y bajo atmósfera de O₂, partiendo de 45.0 mg de **3c**. El producto de la reacción se concentró a presión reducida, se comparó en placas para CCD y se observó una banda fluorescente bajo luz UV (254 y 365 nm) y sensible al revelador de KOH al 5% en EtOH, con un valor de R_f diferente a **3c** (0.600 en Hx/AcOEt 1:1). Al igual que en la síntesis de **(±)-1c**, el sólido crudo concentrado con el producto de la reacción no se sometió a etapas de

purificación debido a la dificultad en el aislamiento del compuesto **(±)-1c** en el laboratorio y la consecuente obtención de bajos rendimientos, aunque a diferencia de **(±)-1c** sintetizado en este trabajo, las impurezas del concentrado de la reacción con **(±)-3d** no se pudieron descartar mediante lavados con An o algún otro disolvente.

Se obtuvieron 42.2 mg (46% de rendimiento) del sólido crudo con **(±)-3d**, un rendimiento inferior al esperado teniendo en cuenta que se partieron de 45.0 mg de **3c** y a que Maruo *et al.* (2013) sintetizaron 21.0 mg (63% de rendimiento) del producto puro **(±)-1c** a partir de 32.0 mg de **1b**. Estas diferencias en los rendimientos se pueden atribuir a las causas ya citadas en la síntesis de las moléculas previas y a que **(±)-3d** es un compuesto que no se ha reportado, por lo que se emplearon las cantidades del producto de partida **3c** con la finalidad de llevar a cabo la reacción a menor escala.

El sólido color café obtenido de la reacción se analizó por RMN-¹H y se identificaron las señales que corresponderían al análogo **(±)-3d** (Figura 2.21). En la región de protones aromáticos se observaron las señales típicas de estos átomos, a δ 7.41 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 9.1 Hz, 1H) y 6.81 (d, J = 9.1 Hz, 1H) para los protones H-8', H-7', H-7 y H-8. Debido a la potencia del equipo, las señales de cada uno de los protones se apreciaron como un doblete y las J corroboraron que se encuentran acoplados en posición *orto* (H-7 y H-7' con relación a H-8 y H-8', respectivamente). Respecto a los grupos MOMO, las señales de los protones H-13, H-15, H-13' y H-15' de los grupos metilo se notaron a δ 3.46 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.47 (s, 3H) y 3.47 (s, 3H); por el contrario, las señales pertenecientes a los protones H-12, H-12', H-14 y H-14' de los metilenos se apreciaron como un multiplete a δ 5.22 (m, 8H), lo que también se podría atribuir a la potencia del equipo. La señal correspondiente a los tres protones H-11 del metilo se observó a campo alto (δ 1.69, s, 3H), al igual que la señal de los protones H-3 y H-11'a (δ 3.52, m, 2H) y la señal del protón H-11'b del metileno (δ 3.77, d, J = 16.9 Hz, 1H).

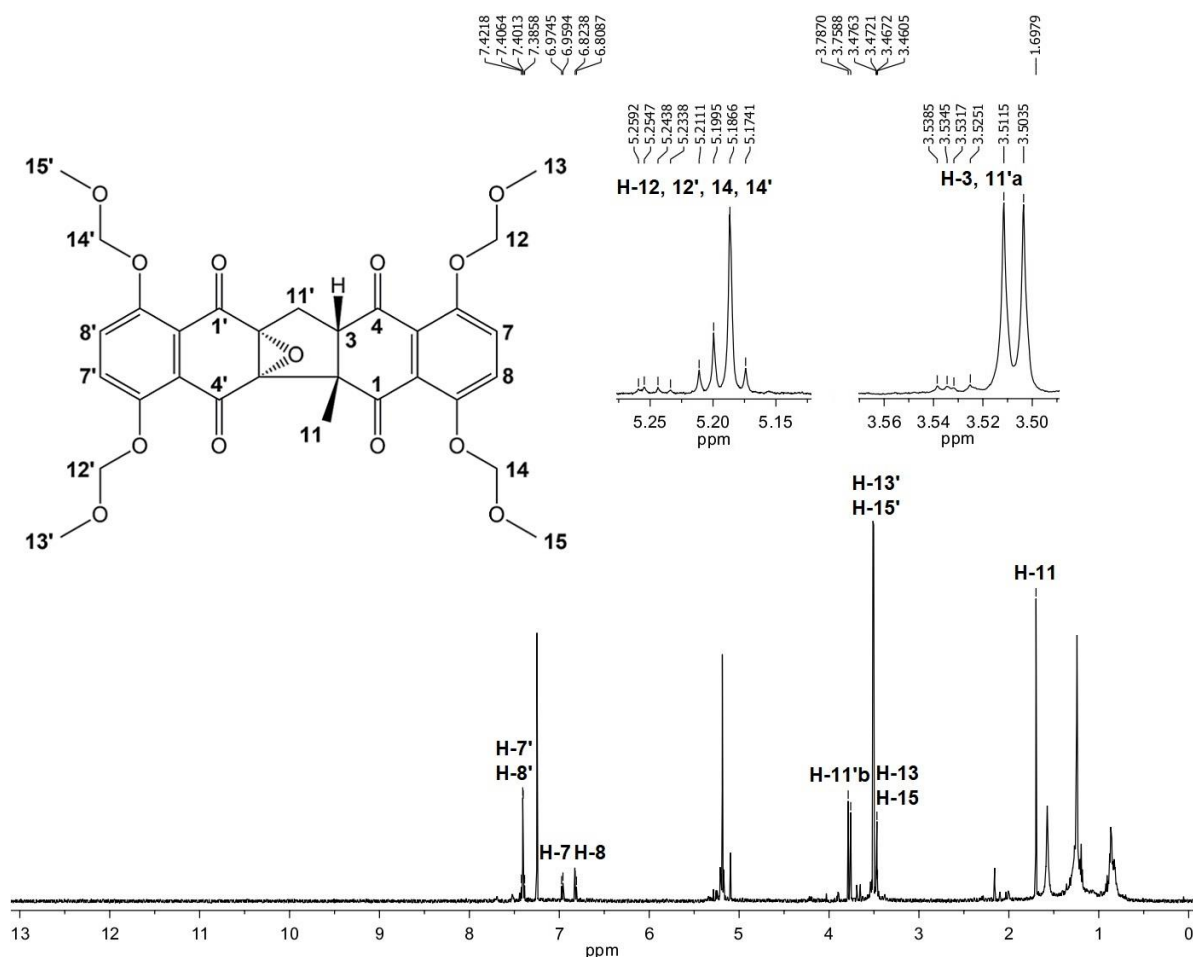


Figura 2.21. Espectro de RMN- ^1H de ($\pm$)-**3d** obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

Los desplazamientos observados permitieron determinar que se obtuvo el análogo ($\pm$)-**3d** (Tabla 2.7). Sin embargo, puesto que se analizó el sólido concentrado de la reacción, en el espectro de RMN- ^1H se observaron residuos de impurezas. Cabe recordar que en la reacción de dimerización se empleó **3c** con trazas mínimas de **3b** sin reaccionar y considerando que se ha descrito que **1a** es susceptible de descomponerse en las condiciones básicas de dimerización, es probable que las señales pertenecientes a los restos de impurezas correspondieran a productos derivados de dicha descomposición, ya que no se notaron señales de los grupos hidroxilo de **3b** (Maruo *et al.*, 2013). Igualmente, el compuesto ($\pm$)-**3d** fue reportado como una mezcla racémica, tomando en cuenta que se siguió el esquema de reacciones descritas por Maruo *et al.* (2013) en la síntesis del análogo ($\pm$)-**1c**. Entonces, el sólido crudo con ($\pm$)-**3d** se utilizó en la reacción de desprotección de grupos hidroxilo.

Tabla 2.7. Datos de RMN-¹H obtenidos para el compuesto **(±)-3d**.

Posición	600 MHz, CDCl ₃ δ _H en ppm (m, J = Hz, H)
3, 11'a	3.52 (m, 2H)
7	6.96 (d, J = 9.1, 1H)
7'	7.39 (d, J = 9.3, 1H)
8	6.81 (d, J = 9.1, 1H)
8'	7.41 (d, J = 9.3, 1H)
11	1.69 (s, 3H)
11'b	3.77 (d, J = 16.9, 1H)
12, 12', 14, 14'	5.22 (m, 8H)
13	3.46 (s, 3H)
13'	3.47 (s, 3H)
15	3.46 (s, 3H)
15'	3.47 (s, 3H)

2.3.8. Síntesis de derivado hidroxilado **(±)-3**

Similar a su análogo **(±)-1**, la molécula propuesta **(±)-3** se sintetizó mediante hidrólisis en medio ácido (AcOH) por 5 h a 100°C, condiciones descritas por Maruo *et al.* (2013). El rendimiento de la reacción fue del 5% (2.0 mg) a partir de 55.0 mg del sólido crudo concentrado con **(±)-3d**, un rendimiento debajo de lo esperado considerando que Maruo *et al.* (2013) obtuvieron 91% de rendimiento (0.12 g de **(±)-1**) partiendo de 0.17 g de **(±)-1c**. Debido a que el dímero hidroxilado **(±)-3** no se ha reportado con anterioridad, se probaron otras cantidades del sólido crudo con **(±)-3d** para encontrar las condiciones ideales de reacción. Sin embargo, se obtuvieron rendimientos similares, con 2.1 mg (6% de rendimiento) y 1.4 mg (7% de rendimiento) de **(±)-3** a partir de 50.9 y 29.0 mg de **(±)-3d**. Incluso, en estas últimas dos reacciones se requirieron etapas de purificación adicionales (cromatografía flash con Hx/AcOEt 3:1 y 1:1 como sistema de elución en gradiente, placa preparativa con Hx/AcOEt 3:1 como eluyente y columna de permeación en gel con MeOH al 100%).

Por otro lado, las diferencias entre los rendimientos de **(±)-1** y **(±)-3** son evidentes, aunque hay que resaltar que son naftoquinonas distintas. Las condiciones de síntesis fueron similares, pero en la reacción para obtener **(±)-3** se empleó el sólido crudo con **(±)-3d** sin purificar, mientras que en la síntesis de **(±)-1** se utilizó el producto puro **(±)-1c** (Maruo *et al.*, 2013). Además, para

sintetizar **(±)-3** se usaron cantidades diferentes del concentrado de reacción con **(±)-3d** (29.0-55.0 mg). Aunado a las diferencias mencionadas en la síntesis de los compuestos **3b** y **3c**, es necesario recalcar que se deben continuar estandarizando las condiciones de reacción para la generación de **(±)-3** con la finalidad de incrementar el rendimiento.

El dímero **(±)-3** fue analizado por UHPLC-FTMS, notándose un T_r de 13.8 min y un ion molecular a m/z 421 (Figura 2.22). En contraste con **(±)-1** y **(±)-2**, la m/z del ion molecular $[M+H]^+$ (421.23 Da) en el espectro de masas no concordó con la masa exacta calculada para **(±)-3** (422.0638 Da). No obstante, después de examinar el patrón de fragmentación, en el espectro de masas se pudieron identificar fragmentos característicos de una naftoquinona dimérica, como la pérdida de grupos hidroxilo (17 Da) a m/z 247, 217 y 200. También se notaron las pérdidas de fragmentos de tipo alcohol insaturado (43 Da) a m/z 377 y metilénico (14 Da) a m/z 263, así como de monóxido de carbono (28 Da) a m/z 141 (Vessecchi *et al.*, 2012). Para la generación de los iones de este derivado y sus análogos **(±)-1** y **(±)-2** se empleó el método de ionización por electropulverización, una técnica de ionización suave ampliamente utilizada en cromatografía líquida para el análisis estructural de macromoléculas (por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos) y compuestos de bajo peso molecular (orgánicos e inorgánicos) (Banerjee y Mazumdar, 2012). En este sentido, la ionización por electropulverización es de gran ayuda para la obtención de iones moleculares intactos (aunque con la generación de pocos fragmentos iónicos) de metabolitos de polaridad moderada a polares, por lo que es probable que la discrepancia entre la m/z del ion molecular $[M+H]^+$ y la masa exacta de **(±)-3** pueda deberse a las condiciones de corrida, ya que **(±)-3** es un compuesto de mayor polaridad en comparación con las naftoquinonas **(±)-1** y **(±)-2** (Wang *et al.*, 2018). Entonces, se continuó con la caracterización estructural de **(±)-3** por RMN- 1H y RMN- ^{13}C .

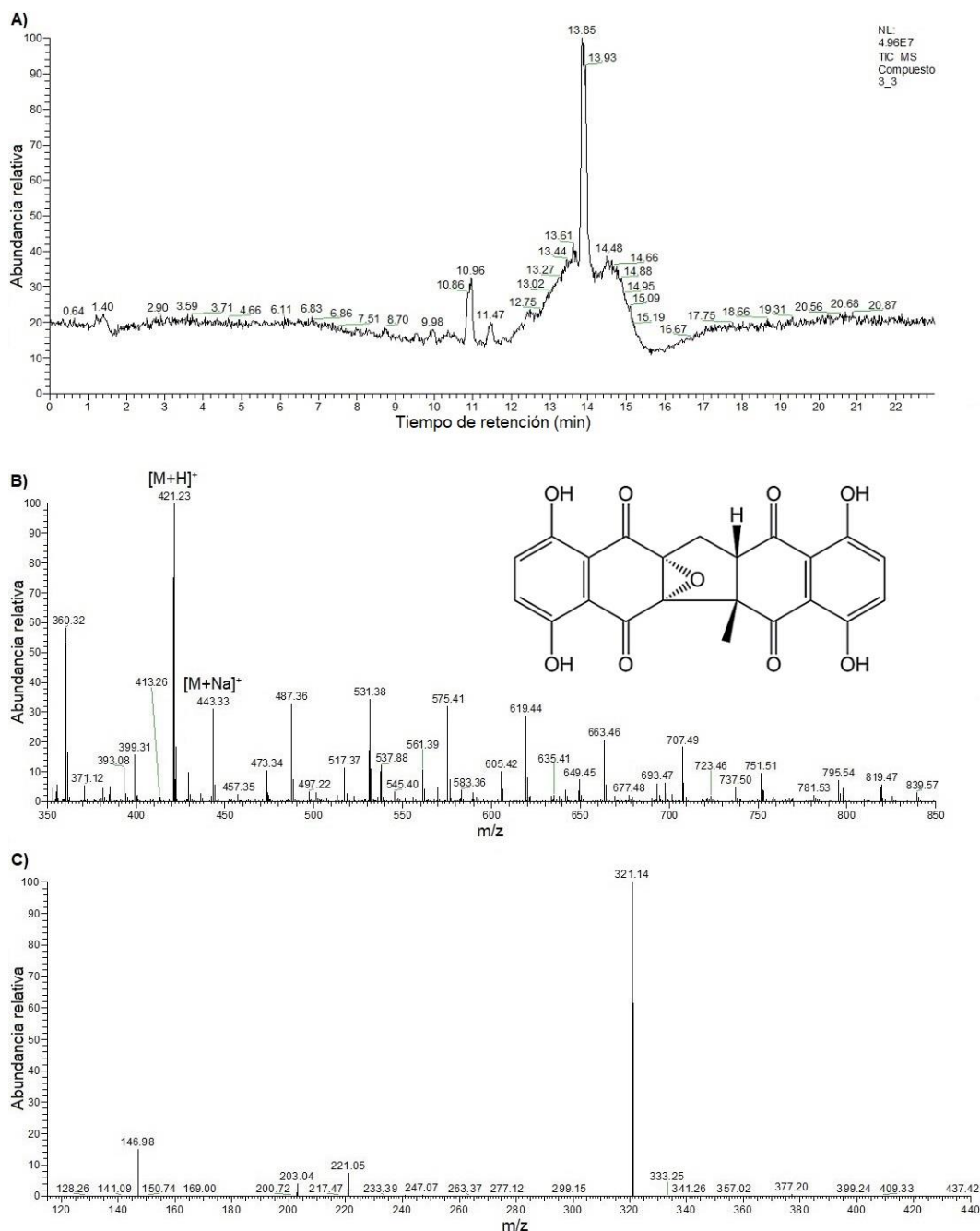


Figura 2.22. Cromatograma (A), espectro de masas con ion molecular $[M+H]^+$ y aducto (B) y espectro de masas de ion molecular $[M+H]^+$ (C) de **(±)-3** (fórmula molecular $C_{22}H_{14}O_6$, $T_r = 13.8$ min, $[M+H]^+$ a m/z 421.23; masa exacta: 422.3412).

En el espectro de RMN- 1H se observaron las señales que corresponderían a **(±)-3** (Figura 2.23). Al igual que **(±)-1** y **(±)-2**, las señales de los protones de los grupos hidroxilo enlazados a los carbonos 6 (δ 10.96, s, 1H), 6' (δ 11.19, s, 1H), 9 (δ 10.96, s, 1H) y 9' (δ 11.19, s, 1H) de **(±)-3** se localizaron a campo bajo puesto que forman puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo

cercanos. A continuación se notaron las señales de los protones aromáticos H-7 (δ 7.18, d, J = 9.3 Hz, 1H) y H-8 (δ 7.17, d, J = 9.3 Hz, 1H), con J que indicaron que se encuentran acoplados entre sí en posición *orto*. Por el contrario, la señal de H-7' y H-8' se apreció como un multiplete a δ 7.50 (m, 2H) probablemente debido a la potencia del equipo, así como los protones metilénicos H-11'a y H-11'b a δ 3.46 (m, 1H) y 5.17 (m, 1H), respectivamente. A δ 3.51 (d, J = 4.2 Hz, 1H) se identificó la señal del protón H-3, aunque dicha señal no se alcanzó a separar lo suficiente y no se observó el valor de la J que avale su acoplamiento con uno de los dos protones H-11'. Por último, a δ 1.70 (s, 3H) se notó la señal de los protones H-11 del grupo metilo.

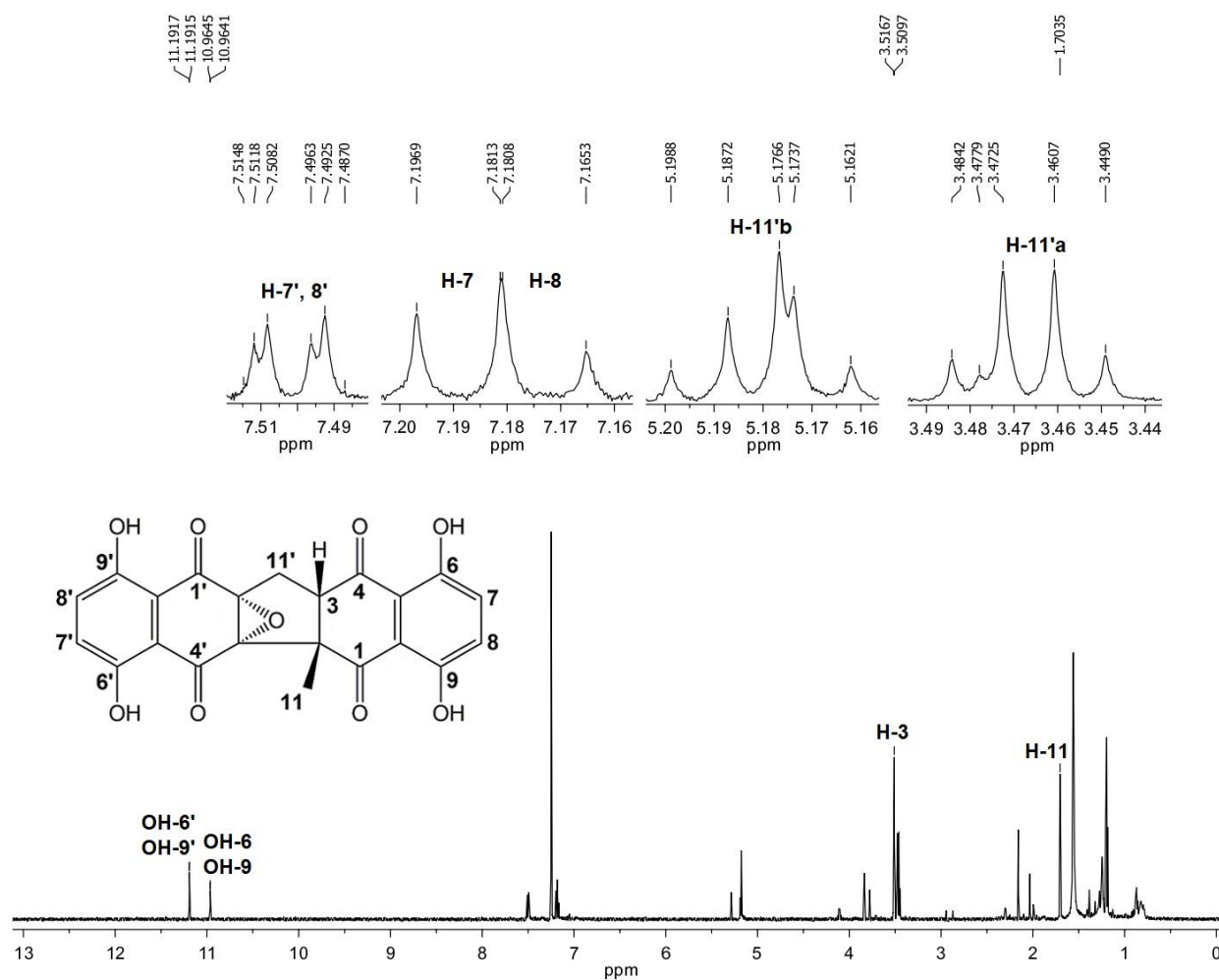


Figura 2.23. Espectro de RMN- ^1H de $(\pm)\text{-3}$ obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

Para complementar lo observado en el espectro de RMN- ^1H , se realizó un análisis de RMN- ^{13}C (Figura 2.24). Los resultados mostraron a campo bajo señales que corresponderían a los carbonos C-1 (δ 195.1), C-1' (δ 195.6), C-4 (δ 195.1) y C-4' (δ 195.6) de los grupos carbonilo, así como las señales de los cuatro carbonos aromáticos enlazados a los grupos hidroxilo (δ 156.9

para C-9', 156.9 para C-6', 156.5 para C-9 y 156.5 para C-6). Las señales de los carbonos sp^2 aromáticos cuaternarios se pudieron identificar a δ 129.4 (C-10'), 129.4 (C-5'), 129.1 (C-5) y 129.1 (C-10), mientras que a δ 112.5 (C-8), 111.4 (C-7), 110.9 (C-7') y 110.0 (C-8') se notaron las señales de los carbonos aromáticos restantes. Las señales de los dos carbonos pertenecientes al anillo epóxido aparecieron más desplazadas hacia campo alto, a δ 65.8 (C-2') y 61.5 (C-3'), donde también se observaron las señales de los carbonos sp^3 cuaternarios C-2 (δ 29.7) y C-3 (δ 31.9), seguidas de las señales del carbono del metileno (C-11') a δ 15.2 y el carbono sp^3 del grupo metilo (C-11) a δ 14.4.

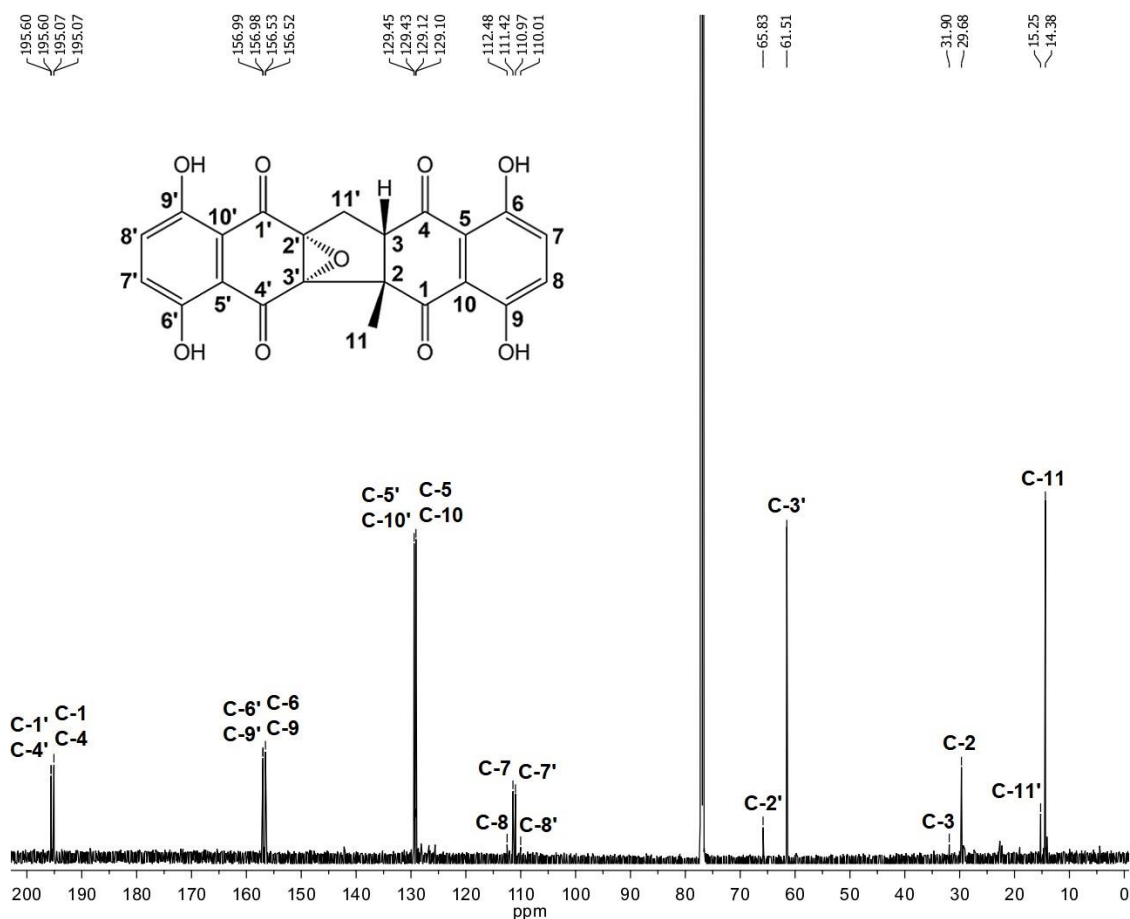


Figura 2.24. Espectro de RMN- ^{13}C de ($\pm$)-**3** obtenido a 151 MHz en $CDCl_3$.

Los datos espectroscópicos de RMN- 1H y RMN- ^{13}C permitieron establecer que se sintetizó el derivado hidroxilado ($\pm$)-**3**, a reserva de los experimentos bidimensionales adicionales que avalen los acoplamientos sugeridos, los cuales no se llevaron a cabo debido a la poca cantidad de producto disponible (Tabla 2.8). Sin embargo, se observaron algunas señales de menor abundancia. Dichas señales fueron evidentes en el espectro de RMN- 1H y poco notables en el espectro de RMN- ^{13}C , considerando que se analizó poca cantidad de muestra ya que el

rendimiento resultante de la síntesis fue bajo. Similar a los otros productos de síntesis, la pureza de **(±)-3** se comprobó por CCD antes de realizar los análisis espectroscópicos y espectrométricos, por lo que al ser una molécula sin reportes previos sobre su síntesis, es probable hipotetizar que sea una naftoquinona poco estable. Entonces, como ya se mencionó, es necesario continuar con la estandarización de las condiciones de síntesis para obtener un mayor rendimiento de **(±)-3**, corroborar su estructura y comprobar la hipótesis planteada acerca de su estabilidad.

Tabla 2.8. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C obtenidos para el compuesto **(±)-3**.

Posición	600 MHz, CDCl ₃ δ _H en ppm (m, J = Hz, H)	151 MHz, CDCl ₃ δ _C en ppm
1	-	195.1
1'	-	195.6
2	-	29.7
2'	-	65.8
3	3.51 (d, J = 4.2, 1H)	31.9
3'	-	61.5
4	-	195.1
4'	-	195.6
5	-	129.1
5'	-	129.4
OH-6	10.96 (s, 1H)	156.5
OH-6'	11.19 (s, 1H)	156.9
7	7.18 (d, J = 9.3, 1H)	111.4
7', 8'	7.50 (m, 2H)	110.9 (C-7'), 110.0 (C-8')
8	7.17 (d, J = 9.3, 1H)	112.5
OH-9	10.96 (s, 1H)	156.5
OH-9'	11.19 (s, 1H)	156.9
10	-	129.1
10'	-	129.4
11	1.70 (s, 3H)	14.4
11'	11'a: 3.46 (m, 1H) 11'b: 5.17 (m, 1H)	15.2

En conclusión, en este trabajo de tesis se sintetizaron los compuestos **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** (un análogo hidroxilado cuya síntesis se ha reportado por primera vez), así como las naftoquinonas monoméricas y diméricas intermediarias para este fin (incluyendo las moléculas **3c** y **(±)-3d**, las cuales tampoco se encuentran descritas en la literatura hasta el momento). El epóxido **(±)-1** fue generado en tres pasos (con un rendimiento total de 1.4%), mientras que **(±)-2** y **(±)-3** se sintetizaron después de cuatro etapas (con rendimientos globales del 3 y 0.1%, respectivamente). A pesar de que los rendimientos de reacción no fueron los esperados, se obtuvieron las cantidades necesarias de cada dímero para realizar los ensayos de citotoxicidad y actividad contra virus de influenza. Finalmente, en las Figuras 2.25 y 2.26 se esquematizan de manera general las reacciones de síntesis empleadas para la generación de las naftoquinonas de interés **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3**, junto con los rendimientos de reacción obtenidos en cada etapa (entre paréntesis).

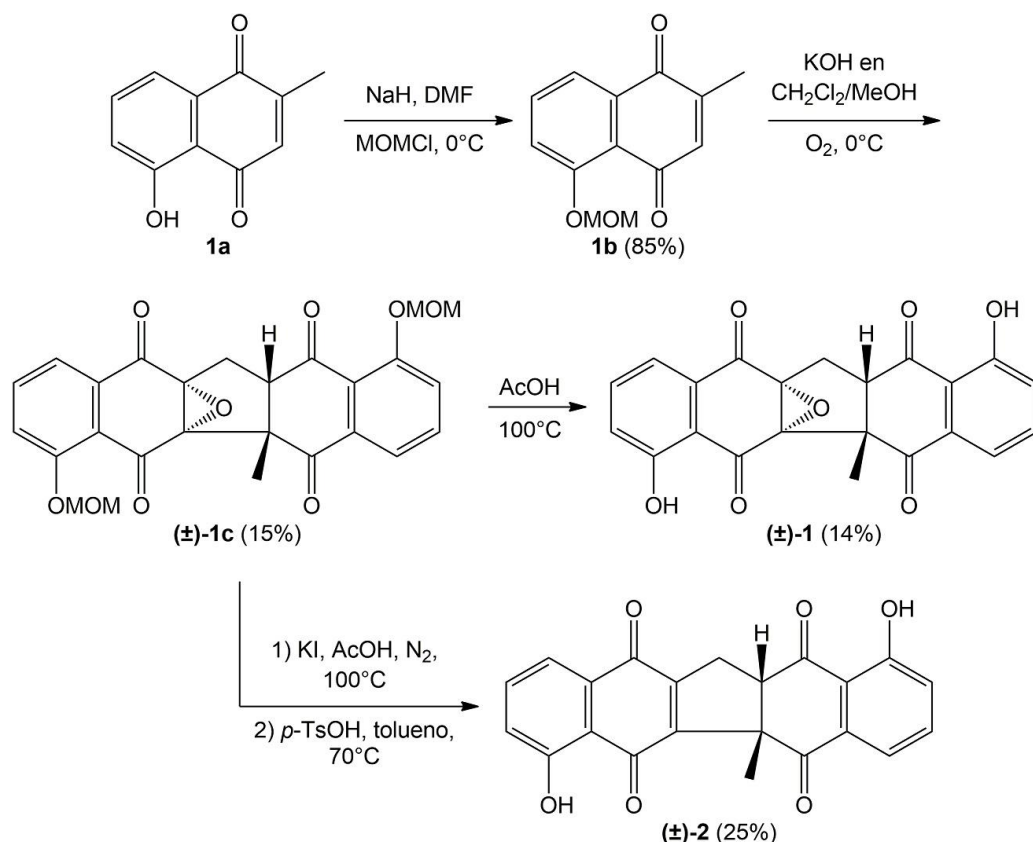


Figura 2.25. Esquema general de la síntesis de **(±)-1** (epóxido de zeylanona) y **(±)-2** (zeylanona). **1a**: plumbagina; **1b**: 5-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona; **(±)-1c**: análogo de **(±)-1** con grupos hidroxilo protegidos.

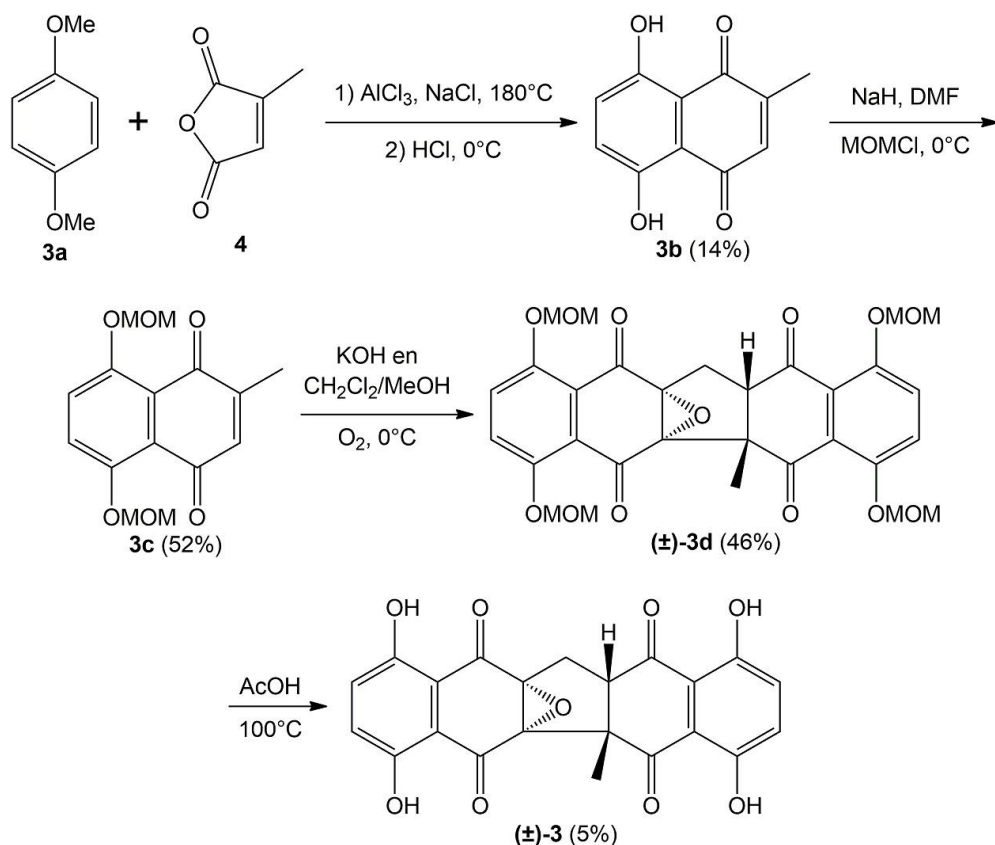


Figura 2.26. Esquema general de la síntesis de **(±)-3** (derivado hidroxilado). **3a**: 1,4-dimetoxibenceno; **4**: anhídrido 2-metilmaleico; **3b**: ramentona; **(±)-3d**: análogo de **(±)-3** con grupos hidroxilo protegidos.

CAPÍTULO III

ACTIVIDAD ANTIVIRAL *IN VITRO* DE EPÓXIDO DE ZEYLANONA Y DERIVADOS

3.1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de influenza representan un problema de salud pública mundial debido a las epidemias anuales. Desde principios del siglo pasado, se han documentado cuatro pandemias de influenza, ocurriendo la última en el año 2009, la cual fue causada por un virus de influenza A H1N1 de origen porcino. En años recientes ha habido un incremento en los reportes de transmisión directa de virus de influenza aviar a humanos, así como una transmisión limitada entre personas, por lo que existe preocupación sobre una nueva pandemia (Nuwarda *et al.*, 2021). Actualmente, los fármacos antivirales desempeñan un papel importante en la prevención y el tratamiento de las infecciones de influenza, aunque el número de compuestos aprobados es limitado, sus blancos virales son reducidos e incluso han sido asociados con resistencia viral. Por ende, se están explorando nuevas estrategias que implican fármacos dirigidos contra otras dianas virales (Terrier y Slama-Schwok, 2021).

El epóxido de zeylanona (**1**) es un producto natural aislado de la corteza del tallo de *D. anisandra* que ha exhibido propiedades antivirales, inhibiendo la replicación de los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1-H275Y) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria). Aunque se ha demostrado que esta naftoquinona dimérica no inhibió la actividad de la HA y NA, si disminuyó el número de copias del segmento génico que codifica para la NP y afectó la distribución intracelular de esta proteína, permaneciendo en el núcleo de las células infectadas (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). Entonces, aprovechando las propiedades antivirales de **1** y con la finalidad de aportar información sobre la actividad anti-influenza de las naftoquinonas, en este capítulo se abordó la determinación de las propiedades contra virus de influenza A y B de **(±)-1**, **(±)-zeylanona (2)** y el análogo **(±)-3**, previamente sintetizados como mezclas de enantiómeros siguiendo las condiciones establecidas por Dessolin *et al.* (2001), Schroeder *et al.* (2016) y Maruo *et al.* (2013).

La toxicidad de las moléculas fue evaluada en células MDCK, ya que son fáciles de multiplicar y expresan en su superficie residuos de AS con enlaces α -2,3 y α -2,6, lo que las convierte en la línea celular más utilizada para los ensayos con virus de influenza (Nelson *et al.*, 2019). Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó el método con cristal violeta debido a que es un colorante que

se une a proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo que puede detectar la adherencia celular. Entonces, ya que las células no viables pierden su adherencia y se desprenden de los pozos de las placas de cultivo, la cantidad de tinción con el cristal violeta se ve reducida (Feoktistova *et al.*, 2016).

Posteriormente se determinaron los títulos de los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria), los cuales serían empleados para el ensayo de reducción del efecto citopático. Los títulos se calcularon después realizar ensayos de formación de placas, donde las células MDCK no viables infectadas con el virus se observaron cómo placas o círculos blancos y generalmente, se considera que cada placa deriva de una sola célula infectada (Takahara *et al.*, 2019).

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de reducción del efecto citopático inducido por los virus de influenza, los cuales son de utilidad para evaluar la potencial actividad antiviral de un compuesto (en esta ocasión, los productos de síntesis obtenidos). Los virus de influenza causan infecciones líticas en las células MDCK, ocasionando el desprendimiento de las células destruidas y demás restos celulares de los pozos de las placas de cultivo. Por ende, para cuantificar la destrucción celular o la ausencia de esta debido a la acción de un agente antiviral, en estas pruebas se emplean compuestos colorimétricos como el cristal violeta (Smee *et al.*, 2002).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materiales y equipos empleados en los ensayos biológicos

Se utilizaron medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM; con 4.5 g/L de D-glucosa y L-glutamina) 1X, suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomicina (con 10,000 U/mL de penicilina y 10,000 µg/mL de estreptomicina), tripsina tratada con tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) y solución tampón de fosfatos salinos (PBS) estéril 1X a pH 7.4 (Gibco, New Hampshire, Estados Unidos). También se emplearon ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), dimetilsulfóxido (DMSO) estéril, cristal violeta y MeOH (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), placas para cultivo celular estériles de 6 y 96 pozos (NEST, Jiangsu, China) y matraces para cultivo celular de 25 y 75 cm² (Corning, New York, Estados Unidos). Los equipos requeridos fueron un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Instruments, New York, Estados Unidos), una incubadora New Brunswick Galaxy 170S

(Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y un lector de placas VICTOR X3 2030 PerkinElmer (PerkinElmer, Massachusetts, Estados Unidos).

3.2.2. Compuestos a evaluar

Los compuestos **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** fueron disueltos en DMSO estéril (100 µL de DMSO por cada 1 mg de compuesto) y luego diluidos a las concentraciones empleadas en los ensayos biológicos (100 µL por pozo). Se ha reportado que el DMSO a concentraciones de 0.5-1% o superiores ejerce toxicidad, dependiendo de la línea celular (Ilieva *et al.*, 2021). Por lo tanto, la preparación de las diluciones se realizó considerando este dato, de tal forma que a la máxima concentración evaluada para cada uno de los compuestos (100 µM en DMEM) se obtuvieron concentraciones de DMSO menores a 0.5% por pozo, siendo estas de 0.39, 0.37 y 0.42% para **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3**, respectivamente.

3.2.3. Línea celular y virus de influenza

Las pruebas biológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), en un ambiente controlado y acorde a las normas de bioseguridad vigentes. Se emplearon células MDCK donadas por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), las cuales fueron cultivadas y mantenidas en matraces de cultivo celular de 25 y 75 cm² con DMEM (HEPES 1 M, NaHCO₃ al 7.5% y penicilina-estreptomicina al 1%) complementado al 10% con SFB. El mantenimiento celular se llevó a cabo en una incubadora a una temperatura de 37°C y una atmósfera con 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Se trabajó con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria), proporcionados por el Laboratorio de Virología del CIR. Los virus fueron propagados en células MDCK con DMEM con tripsina TPCK a 1 µg/mL y fueron almacenados a -70°C hasta su uso. El título de cada solución madre viral fue determinado por medio de ensayos de formación de placas de acuerdo a Ayora-Talavera *et al.* (2014). En una placa estéril de 6 pozos, se cultivaron 2.5x10⁶ células MDCK por pozo en DMEM complementado (2 mL por pozo) y se incubaron 24 h (37°C y 5% de CO₂). Posteriormente, los sobrenadantes se descartaron, las células se lavaron con PBS estéril 1X (2 mL por pozo, 2 veces) y luego se infectaron con diluciones seriadas (1x10⁻¹ a 1x10⁻⁶) de los virus de influenza A y B en DMEM con tripsina TPCK a 1 µg/mL (200 µL por pozo). Las células se incubaron durante 1 h (37°C y 5% de CO₂) y una vez transcurrido el tiempo de infección, se desecharon los sobrenadantes y se añadió

medio overlay con agarosa al 3% y tripsina TPCK a 1 µg/mL (2 mL por pozo). Las placas se incubaron nuevamente por 72 h (37°C y 5% de CO₂). Se retiró el agar de los pozos, se adicionó una solución de cristal violeta al 0.4% en MeOH (2 mL por pozo) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se desechó el cristal violeta de los pozos, se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante y se contó el número de placas. Los títulos virales se calcularon como unidades formadoras de placas por mL (PFU/mL) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PFU/mL} = (\#P) / [(FD) (VV)]$$

Donde #P es el número de placas contadas, FD el factor de dilución y VV el volumen de la dilución viral añadida en mL.

3.2.4. Ensayo de citotoxicidad

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron siguiendo la metodología descrita por Juárez-Méndez *et al.* (2021). En una placa estéril de 96 pozos, se cultivaron 1x10⁵ células MDCK por pozo en DMEM complementado (100 µL por pozo) y se mantuvieron en la incubadora 24 h (37°C y 5% de CO₂). Se descartaron los sobrenadantes y las células se lavaron con PBS estéril 1X (100 µL por pozo, 2 veces). Luego, las células se trataron con cada uno de los compuestos a concentraciones de 1.562-100 µM en DMEM (100 µL por pozo). Se utilizó un control de células MDCK con DMSO al 1% en DMEM (control con DMSO al 1%) y un control conformado por células sin tratamiento en DMEM (control celular); también se añadieron 100 µL por pozo para cada uno de los controles y tanto los tratamientos como los controles se adicionaron por cuadruplicado. Posteriormente, las células se incubaron durante 72 h (37°C y 5% de CO₂). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se desecharon los sobrenadantes de los pozos, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó la solución de cristal violeta al 0.4% (50 µL por pozo). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente, se descartó el cristal violeta y se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante. Se midieron las densidades ópticas (DO) a 490 nm en un lector de placas y se calculó el porcentaje de viabilidad celular (%VC) con la fórmula:

$$\%VC = (DO_T / DO_{CC}) 100$$

Donde DO_T es la media de las DO obtenidas para cada uno de los tratamientos (o control con DMSO al 1%) y DO_{CC} la media de las DO del control celular. También se calculó por regresión no lineal la concentración requerida para reducir la viabilidad celular en un 50% (CC₅₀).

3.2.5. Ensayo de reducción del efecto citopático

El ensayo de reducción del efecto citopático se llevó a cabo mediante el procedimiento reportado por Borges-Argáez *et al.* (2019). En una placa estéril de 96 pozos, se cultivaron 1×10^5 células MDCK por pozo en DMEM complementado (100 μ L por pozo) y se incubaron durante 24 h (37°C y 5% de CO₂). Los sobrenadantes fueron descartados, las células se lavaron con PBS estéril 1X (100 μ L por pozo, 2 veces) y luego se infectaron con los virus de influenza A y B a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001 (100 μ L por pozo) durante 1 h (37°C y 5% de CO₂). Después del tiempo de infección, se desecharon los sobrenadantes y se añadieron los compuestos **(±)-1** (0.390-25 μ M), **(±)-2** (0.390-12.5 μ M) y **(±)-3** (0.390-6.25 μ M), disueltos con anterioridad en DMEM con tripsina TPCK a 1 μ g/mL (100 μ L por pozo). Como control de infección se emplearon células MDCK infectadas con virus de influenza A o B a una MOI de 0.001 (control viral), mientras que células sin tratamiento ni infección en DMEM fueron utilizadas como control celular (se adicionaron 100 μ L por pozo para cada uno de los controles; los tratamientos y controles se agregaron por cuadruplicado). Las células se mantuvieron en incubación durante 72 h (37°C y 5% de CO₂) y después se observó al microscopio para confirmar la presencia de efecto citopático. Entonces, los sobrenadantes fueron retirados, se realizaron dos lavados con PBS y se adicionó la solución de cristal violeta al 0.4% (50 μ L por pozo). Por último, la placa se incubó 30 min a temperatura ambiente, se desechó el cristal violeta y se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante. Las DO fueron medidas en el lector de placas a 490 nm y el porcentaje de reducción del efecto citopático (%REC) fue calculado a través de la fórmula:

$$\%REC = [(A - B) / (C - B)] 100$$

Donde A es la media de las DO obtenidas para cada uno de los tratamientos, B la media de las DO del control viral y C la media de las DO del control celular. Igualmente, se calculó por regresión no lineal la concentración requerida para inhibir el efecto citopático viral en un 50% (IC₅₀).

3.2.6. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (%VC) y reducción del efecto citopático (%REC) fueron expresados como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de tres experimentos y fueron comparados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett. Aquellos valores con un nivel de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos en contraste con su respectivo control. Asimismo, los valores de

CC_{50} e IC_{50} se calcularon por medio de un análisis de regresión no lineal, graficando las concentraciones de los compuestos (expresadas como $\log_{10} [\mu M]$) y el %VC o %REC, según correspondió. Los análisis fueron realizados en el programa GraphPad Prism® versión 8.2.1 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Efecto citotóxico de las naftoquinonas sintéticas

El efecto tóxico de cada uno de los productos de síntesis en células MDCK fue determinado, partiendo de las concentraciones descritas por Cetina-Montejo *et al.* (2019) para el epóxido **1** aislado de *D. anisandra* (1.562-100 μM). Una vez obtenidos los resultados, se calcularon las CC_{50} de los compuestos por regresión no lineal. El dímero **(±)-1** presentó una CC_{50} mayor a las otras naftoquinonas, seguido por **(±)-2** y **(±)-3**, que fue el análogo con mayor citotoxicidad (Figura 3.1).

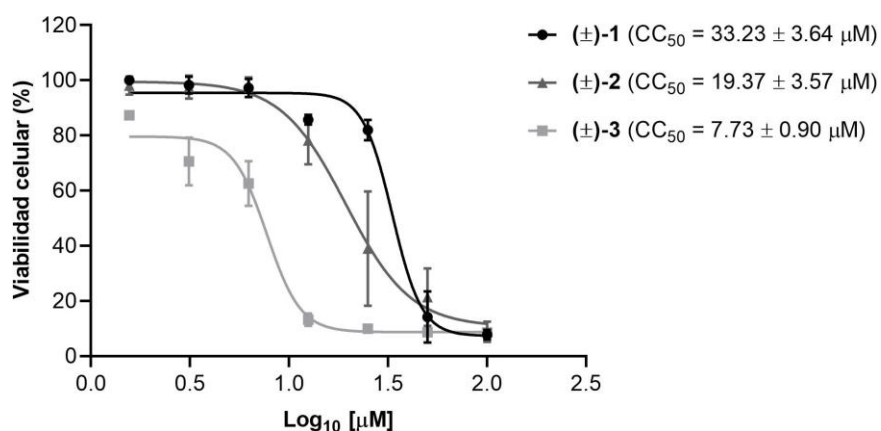


Figura 3.1. Curvas de citotoxicidad y sus respectivos valores de concentración citotóxica media (CC_{50}) correspondientes a **(±)-1** (epóxido de zeylanona), **(±)-2** (zeylanona) y **(±)-3** (derivado). Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos por cuadruplicado.

Igualmente, los %VC de las concentraciones evaluadas para cada uno de los productos de síntesis se compararon con el control celular, el cual fue considerado como el 100% de viabilidad celular. No se encontró diferencia estadística entre los %VC del control con DMSO al 1% y el control celular (Figura 3.2). Para **(±)-1**, se observaron %VC estadísticamente significativos a partir de 25 μM (7.77 a 81.97%). No obstante, de 1.562 a 25 μM se pudo notar que la viabilidad celular fue mayor al 50%, coincidiendo con la CC_{50} calculada (33.23 μM). Similar a **(±)-1**, los tratamientos con la naftoquinona dimérica **(±)-2** ejercieron toxicidad significativa en las células MDCK de 12.5 a 100 μM (%VC = 8.82-78.20%). Por el contrario, se observaron %VC mayores al 50% a concentraciones inferiores a 25 μM (78.20-98.49%), lo que coincidió con la CC_{50} calculada (19.37

μM). A diferencia de sus derivados, el compuesto **($\pm$)-3** presentó toxicidad significativa en casi todas las concentraciones probadas, a excepción de 1.562 μM (%VC = 87.29%). Los %VC a altas concentraciones (12.5-100 μM) exhibieron el mayor efecto citotóxico (8.62-13.24%), mientras que los %VC a 1.562-6.25 μM se encontraron por encima del 50% de viabilidad celular y concordaron con la CC_{50} calculada (7.73 μM).

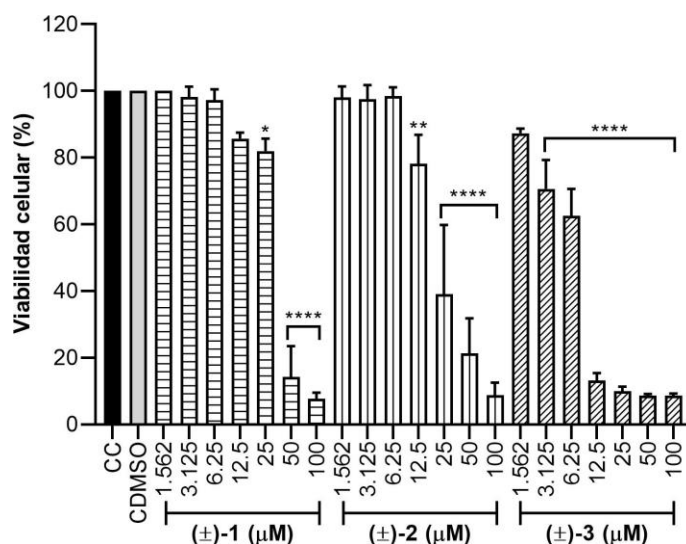


Figura 3.2. Porcentajes de viabilidad celular (%VC) correspondientes a los tratamientos con **($\pm$)-1** (epóxido de zeylanona), **($\pm$)-2** (zeylanona) y **($\pm$)-3** (derivado). Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos por cuadruplicado, comparados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ indican valores estadísticamente significativos en contraste con el control celular (CC). CDMSO: control con DMSO al 1%.

Como ya se mencionó, los dímeros de tipo naftoquinona **($\pm$)-1**, **($\pm$)-2** y **($\pm$)-3** evaluados en este trabajo de tesis fueron generados como racematos de acuerdo al esquema de síntesis biomimética descrito (Maruo *et al.*, 2013). Generalmente, los productos naturales son biosintetizados de manera enantioméricamente pura (como + o -) por las plantas, aunque se ha descrito que algunos metabolitos son producidos como mezclas racémicas por medio de diversos tipos de ciclaciones. Además, los enantiómeros (por separado o como mezcla) podrían desempeñar un papel importante en la biología o la supervivencia de las plantas (Zask y Ellestad, 2018). Con respecto a la actividad biológica, la mayoría de las mezclas racémicas poseen un enantiómero mayormente activo (eutómero) y otro menos activo, inactivo (distómero), tóxico o que ejerce otras propiedades farmacológicas (deseadas o indeseadas). En menor medida, existen racematos cuyos enantiómeros son igualmente activos (Nguyen *et al.*, 2006). De la

misma forma, los enantiómeros de una molécula pueden producir un efecto sinérgico, pero esto es poco común (Bitchagno *et al.*, 2022).

Se ha determinado por rotación óptica que la naftoquinona dimérica **2** se encuentra en *P. zeylanica* como una mezcla de enantiómeros (Sankaram *et al.*, 1979). Sin embargo, hay que resaltar que no se ha descrito si el epóxido natural **1** se produce de forma enantioméricamente pura o como mezcla racémica. Pese a que se ha establecido la relación estereoquímica entre el grupo metilo en C-11 y el protón H-3, no se ha definido la configuración absoluta de **1** debido que no se ha corroborado la relación entre dichos sustituyentes con el anillo epóxido (Uc-Cachón *et al.*, 2013). Similar a **1**, la configuración absoluta del producto natural **2** no ha sido confirmada, incluyendo la configuración del protón H-3 y el grupo metilo (Gu *et al.*, 2004).

Previamente se ha reportado que el epóxido **1** aislado de la corteza del tallo de *D. anisandra* no ejerció toxicidad en células MDCK a concentraciones ≤ 12.5 μM , con una CC_{50} de 21.70 μM (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). A pesar de que el dímero sintético **(±)-1** y el producto natural **1** no son citotóxicos a bajas concentraciones, el valor de CC_{50} de **(±)-1** sintetizado en este trabajo (33.23 μM) fue diferente al obtenido por Cetina-Montejo *et al.* (2019). Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis de que el epóxido natural es producido por *D. anisandra* como un enantiómero, a reserva de la caracterización absoluta de su estructura. De acuerdo a lo descrito, para **(±)-1** se establecen distintas premisas, ya que existe la probabilidad de que uno de los enantiómeros sea menos citotóxico o de una sinergia atribuida a que ambos enantiómeros no son tóxicos a bajas concentraciones, ocasionando el ligero aumento en el valor de CC_{50} (Bitchagno *et al.*, 2022). No obstante, se requiere la separación y evaluación de los enantiómeros para determinar las diferencias en su citotoxicidad, así como la comparación de dichos resultados con los observados en la mezcla racémica para avalar los postulados mencionados (Fernandes *et al.*, 2017).

Para **2** no hay estudios que indiquen su toxicidad en células MDCK. Gu *et al.* (2004) e Ito *et al.* (2018) únicamente detallan la citotoxicidad en líneas celulares de cáncer por parte del metabolito aislado de la corteza de *D. maritima* y de la raíz de *P. zeylanica*, respectivamente. Al igual que **(±)-1**, el valor de CC_{50} de **(±)-2** (19.37 μM) demostró que este análogo no es citotóxico a bajas concentraciones, pero presentó toxicidad en más del 50% de las células a concentraciones ≥ 25 μM . Con relación a **(±)-3**, no existen reportes sobre su toxicidad en alguna línea celular dado que es la primera vez que se sintetiza este análogo, aunque exhibió una mayor toxicidad celular ($\text{CC}_{50} = 7.73$ μM) en comparación con **(±)-1** y **(±)-2**.

Estos datos permiten sugerir que la presencia del grupo epóxido en **(±)-1** contribuye con una menor citotoxicidad en contraste con **(±)-2**, efecto que se ha observado en otras estructuras de tipo naftoquinona, como 2,3-epoxiplumbagina (**91**) y su derivado plumbagina (**1a**), con valores de CC₅₀ de 30.00 y 14.16 μ M, respectivamente (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). Por el contrario, se puede suponer que la presencia de grupos hidroxilo en las naftoquinonas diméricas ocasiona un aumento en su toxicidad celular y que esta se ve más acentuada con un mayor número de estos grupos funcionales, ya que Cetina Montejo (2016) mostró en su trabajo de tesis que el análogo **(±)-1c** no posee toxicidad en células MDCK (CC₅₀ >50 μ M), mientras que **(±)-1** y **(±)-2** presentaron citotoxicidad moderada y **(±)-3** citotoxicidad elevada. Sin embargo, para afirmar estas hipótesis, son necesarias la caracterización absoluta del producto natural **2** y la evaluación de su toxicidad en células MDCK para confirmar si este metabolito presenta un comportamiento similar al compuesto **1** y su derivado sintético **(±)-1**. Igualmente, son importantes la obtención de cada uno de los enantiómeros de **(±)-2** y **(±)-3** para determinar su citotoxicidad y establecer las posibles diferencias con los racematos sintéticos y productos naturales (Fernandes *et al.*, 2017). Las estructuras de estas naftoquinonas se encuentran representadas en la Figura 3.3.

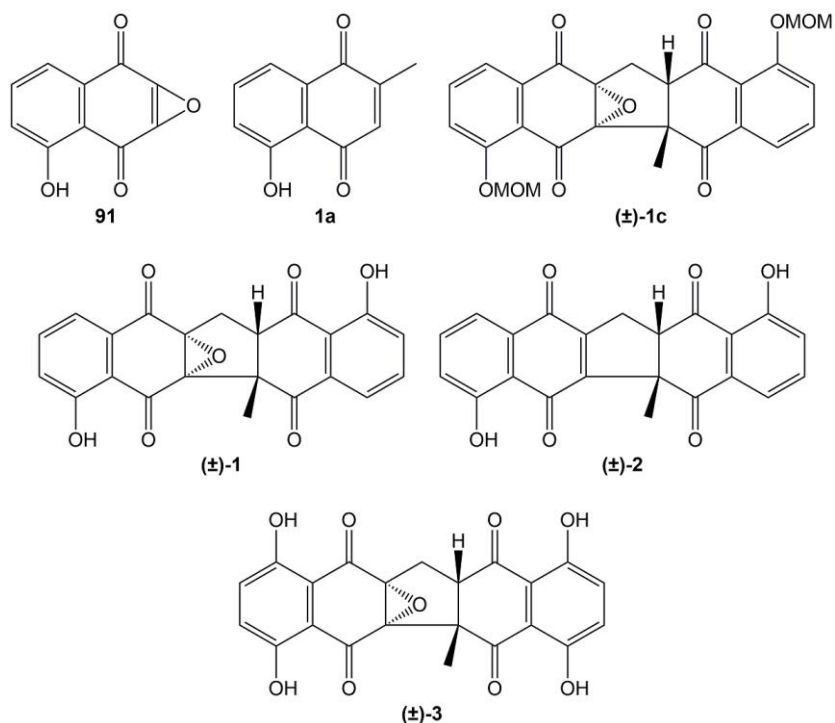


Figura 3.3. Naftoquinonas monoméricas y diméricas con toxicidad en células MDCK.

Por otra parte, hay reportes acerca de las propiedades citotóxicas (en líneas celulares normales) de naftoquinonas aisladas de fuentes naturales o sintetizadas como racematos, aunque son

limitados. Además del estudio de Cetina Montejo (2016) con **(±)-1c**, Yamashita *et al.* (2009) determinaron la citotoxicidad de (±)-5-hidroxi-2-(1'-hidroxietil)-[2,3-*b*]furan-4,9-naftoquinona (**92**), una molécula previamente identificada en *T. avellanedae*; este metabolito ejerció toxicidad moderada en células humanas Fb (piel), Hc (hígado), MPC-5 (pulmón) e IE (colón), con valores de EC₅₀ de 45.4-158 µM (Figura 3.4). Tian *et al.* (2015) obtuvieron el producto natural (±)-merrilliaquinona (**93**) de las ramas y hojas de *Illicium merrillianum* y demostraron que posee toxicidad moderada en células QSG7701 y LO2 (líneas celulares de hepatocitos humanos), con valores de IC₅₀ de 46.87 y 33.08 µM, respectivamente. Recientemente, Ngoc *et al.* (2019) aislaron la quinona (±)-rinacasutona (**94**) de las raíces de *R. nasutus* y evaluaron su toxicidad en células Vero, obteniendo una CC₅₀ >50 µM. Con respecto a productos de síntesis, Sunassee *et al.* (2013) sintetizaron (±)-2-(1-hidroxi-1-fenilmetil)-1,4-naftoquinona (**95**) en dos pasos a partir de un aldehído (1,4-dimetoxi-2-naftalencarbaldehído) y evaluaron su toxicidad en células NIH3T3 (fibroblastos normales); **(±)-95** no presentó citotoxicidad a las concentraciones probadas (los valores de IC₅₀ no fueron reportados por los autores). Adicionalmente, se puede observar que estas quinonas poseen pocos o ningún grupo hidroxilo en sus estructuras, lo que contribuye con el supuesto planteado de que un mayor número de estos grupos funcionales ocasiona un aumento en la toxicidad celular de estos compuestos, como se mencionó para los dímeros **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3**.

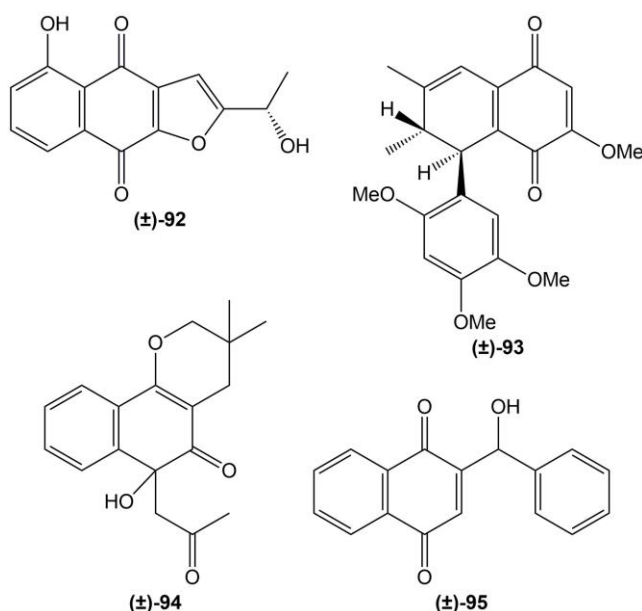


Figura 3.4. Mezclas racémicas de naftoquinonas con estudios de citotoxicidad reportados.

Las propiedades citotóxicas de las naftoquinonas han sido atribuidas a su alto potencial redox, ya que al ser reducidas cuando aceptan un electrón forman radicales aniónicos, los cuales son

inestables y se oxidan de nuevo a naftoquinonas debido al O_2 (Figura 3.5). La reducción del O_2 genera el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), una especie reactiva de oxígeno (ERO). El $O_2^{\cdot-}$ es dismutado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y da como resultado peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez es reducido gracias a procesos de oxidación del hierro y/o cobre, produciendo el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) (Bolton y Dunlap, 2017). Las ERO son necesarias para que la célula ejecute ciertas funciones con normalidad (como el plegamiento de proteínas en el RE y la regulación de la actividad de caspasas durante la apoptosis), aunque se requieren bajas concentraciones. Sin embargo, cuando existe un exceso en la concentración intracelular de estas ERO, se altera el equilibrio con especies antioxidantes endógenas y se producen efectos nocivos sobre las células a través de la formación de macromoléculas oxidadas, dañando lípidos, proteínas y ADN (Escardó Pereyra *et al.*, 2019). Por ende, las naftoquinonas contribuyen de manera importante a la citotoxicidad por medio de este ciclo redox, siendo responsables de estrés oxidativo celular. Aunado a esto, las naftoquinonas promueven el ciclo redox dependiendo de los sustituyentes en su estructura (sustituyentes ricos en electrones o un número elevado de estos) y si poseen un sistema de anillos extenso (Bolton y Dunlap, 2017).

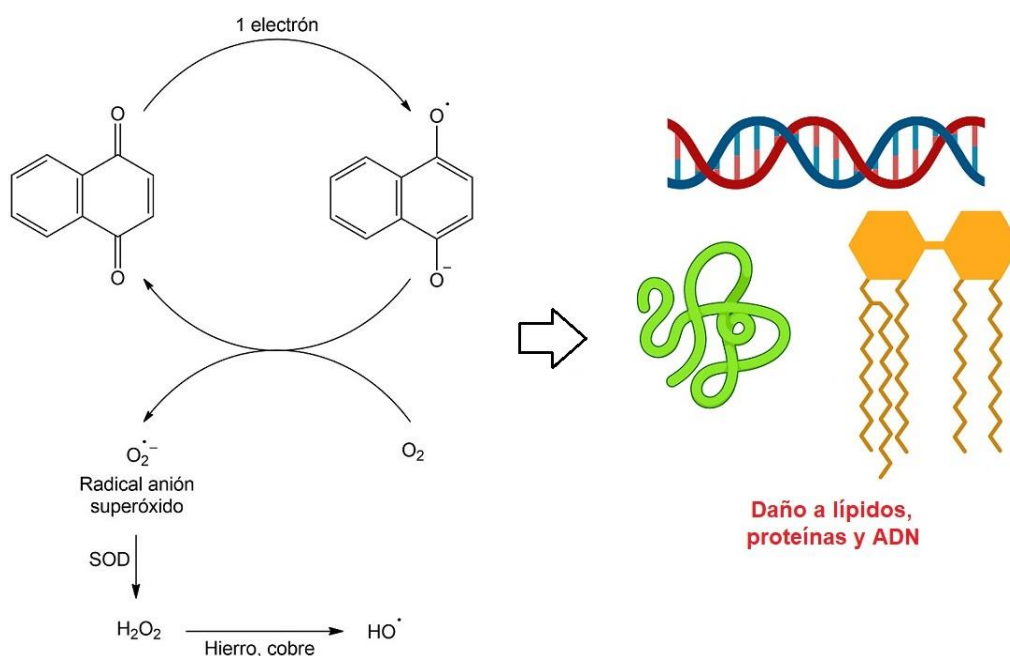


Figura 3.5. Mecanismos de citotoxicidad de las naftoquinonas.

Para la evaluación de la actividad antiviral de los derivados sintéticos se partió de concentraciones menores a su CC_{50} , considerando aquellas que presentaron %VC con la menor significancia estadística. El rango de concentraciones para **(±)-1** fue de 0.390-25 μM , contrastando con el intervalo reportado por Cetina-Montejo *et al.* (2019) para el epóxido natural

1 (0.390-12.5 μM), mientras que para **($\pm$)-2** se emplearon concentraciones de 0.390-12.5 μM . Con **($\pm$)-3** se realizó una excepción, ya que si bien se observaron concentraciones de esta molécula (3.125 y 6.25 μM) con %VC estadísticamente significativos ($p < 0.0001$), estos fueron mayores al 50%; por ende, en los ensayos de actividad antiviral se utilizaron concentraciones de 0.390-6.25 μM . Finalmente, los %VC de los compuestos a las diferentes concentraciones evaluadas y sus respectivas CC_{50} se encuentran detalladas en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Efecto citotóxico (CC_{50} y %VC) de **($\pm$)-1** (epóxido de zeilanona), **($\pm$)-2** (zeilanona) y **($\pm$)-3** (derivado).

[μM]	Viabilidad celular (%)		
	($\pm$)-1 ($\text{CC}_{50} = 33.23 \pm 3.64 \mu\text{M}$)	($\pm$)-2 ($\text{CC}_{50} = 19.37 \pm 3.57 \mu\text{M}$)	($\pm$)-3 ($\text{CC}_{50} = 7.73 \pm 0.90 \mu\text{M}$)
1.562	100.00 $\pm$ 0.00	98.11 $\pm$ 3.27	87.29 $\pm$ 1.40
3.125	98.24 $\pm$ 3.04	97.57 $\pm$ 4.20	70.63 $\pm$ 8.65****
6.25	97.23 $\pm$ 3.28	98.49 $\pm$ 2.61	62.60 $\pm$ 8.06****
12.5	85.69 $\pm$ 1.78	78.20 $\pm$ 8.66**	13.24 $\pm$ 2.20****
25	81.97 $\pm$ 3.70*	39.03 $\pm$ 20.78****	9.94 $\pm$ 1.38****
50	14.23 $\pm$ 9.29****	21.38 $\pm$ 10.42****	8.65 $\pm$ 0.52****
100	7.77 $\pm$ 1.78****	8.82 $\pm$ 3.71****	8.62 $\pm$ 0.69****

Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos por cuadruplicado, comparados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ indican valores estadísticamente significativos en contraste con el control celular (CC; 100.00 $\pm$ 0.00%). CDMSO: control con DMSO al 1% (100.00 $\pm$ 0.00%); CC_{50} : concentración citotóxica media; %VC: porcentaje de viabilidad celular.

3.3.2. Efecto de las naftoquinonas sintéticas en la reducción del efecto citopático

El efecto antiviral de **($\pm$)-1**, **($\pm$)-2** y **($\pm$)-3** se determinó en células MDCK infectadas con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) a una MOI de 0.001. Se calcularon las IC_{50} de cada uno de los compuestos por regresión no lineal, obteniéndose valores de $\text{IC}_{50} > 12.5 \mu\text{M}$ para el epóxido **($\pm$)-1** (Figura 3.6). Por el contrario, se observó que los análogos **($\pm$)-2** y **($\pm$)-3** no ejercieron una reducción del efecto citopático en las células infectadas a las concentraciones evaluadas.

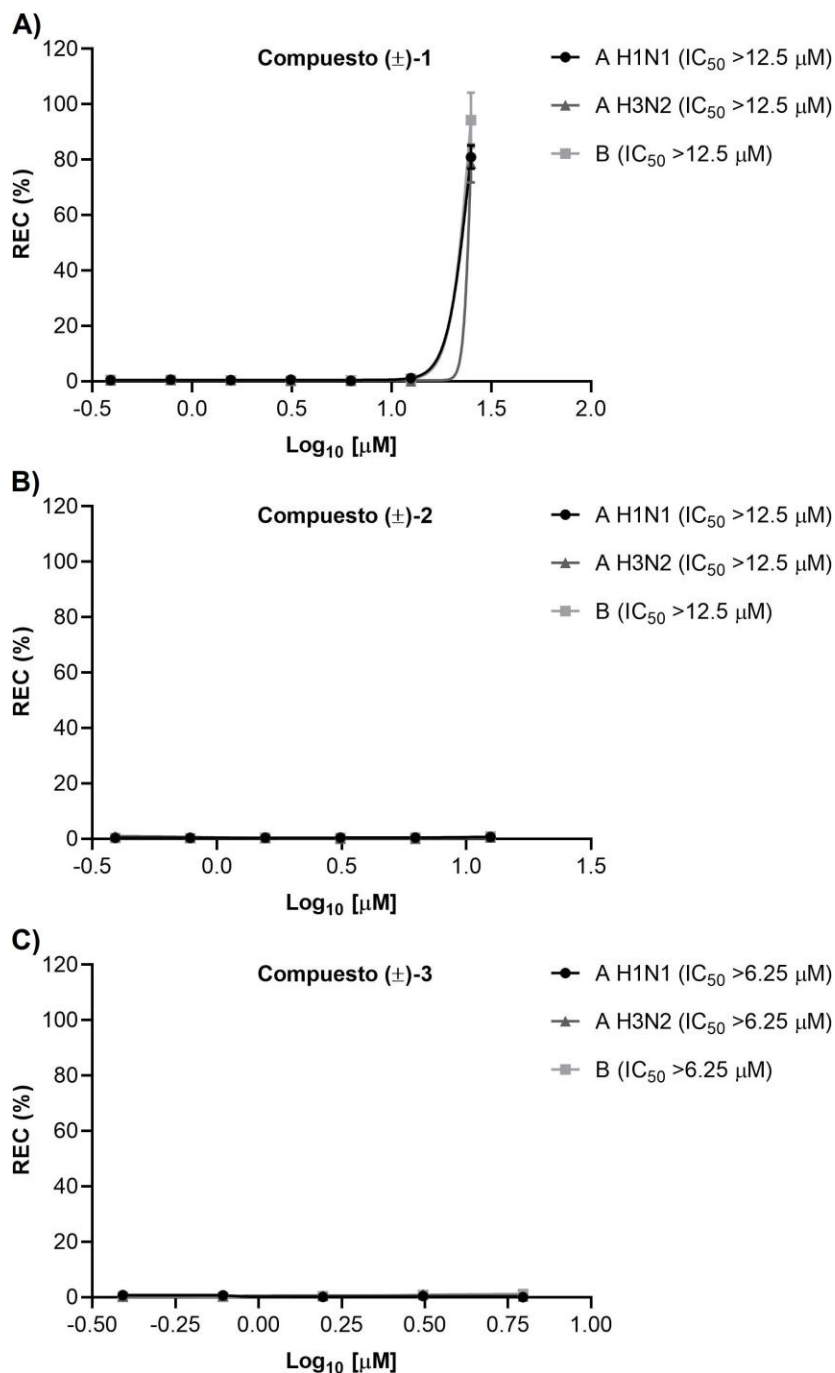


Figura 3.6. Curvas de actividad antiviral y sus respectivos valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) correspondientes a (±)-1 (epóxido de zeilanona) (A), (±)-2 (zeilanona) (B) y (±)-3 (derivado) (C) en células MDCK infectadas con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos por cuadruplicado.

Posteriormente, se realizó una comparación entre los %REC obtenidos para cada uno de los tratamientos y los porcentajes del control viral. También se empleó un control celular, que

representó el 100% de viabilidad ya que estuvo conformado por células sin tratamiento y sin infección. Como se pudo notar, los %REC del control celular fueron estadísticamente significativos en comparación con los porcentajes de cada control viral, los cuales se consideraron como el máximo efecto citopático observable (Figura 3.7). Para el compuesto **(±)-1**, a concentraciones de 0.390 a 12.5 μ M se observaron %REC que no presentaron significancia estadística en comparación con el control viral, siendo estos de 0.22-1.18%, 0.00-0.60% y 0.15-0.88% para los virus de influenza A H1N1, A H3N2 y B, respectivamente. Asimismo, se notaron %REC estadísticamente significativos de 80.94% (A H1N1), 78.57% (A H3N2) y 94.28% (B) a 25 μ M, lo que coincidió con la IC₅₀ calculada para **(±)-1** (>12.5 μ M). En contraste, los %REC de los dímeros **(±)-2** y **(±)-3** no presentaron significancia estadística, concordando con los valores de IC₅₀ estimados para dichas moléculas (>12.5 μ M para **(±)-2** y >6.25 μ M para **(±)-3**). Los %REC después de la infección viral en las células tratadas con **(±)-2** fueron 0.33-0.67% (A H1N1), 0.00-0.93% (A H3N2) y 0.21-0.85% (B) a concentraciones de 0.390 a 12.5 μ M, mientras que para **(±)-3** los %REC fueron de 0.06-0.76% (A H1N1), 0.24-1.04% (A H3N2) y 0.11-1.17% (B) a 0.390-6.25 μ M.

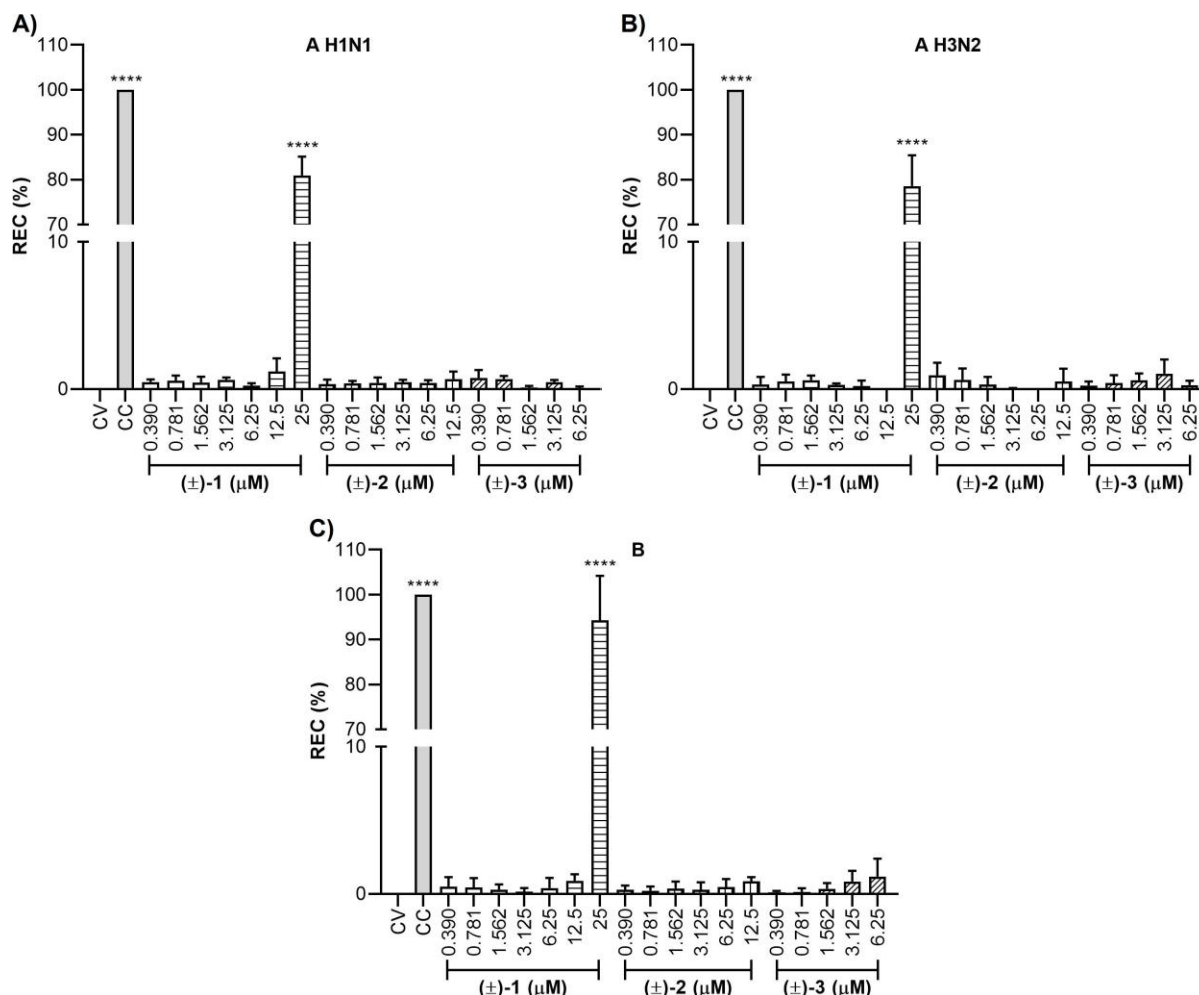


Figura 3.7. Porcentajes de reducción del efecto citopático (%REC) correspondientes a los tratamientos con **(±)-1** (epóxido de zeylanona), **(±)-2** (zeylanona) y **(±)-3** (derivado) en células MDCK infectadas con los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm (**A**), A/Sydney/5/97 (H3N2) (**B**) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) (**C**) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001. Los resultados representan la media $\pm$ DE de tres experimentos por cuadruplicado, comparados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ indican valores estadísticamente significativos en contraste con el control viral (CV). CC: control celular.

Como ya se describió, el producto natural **1** es un compuesto con actividad contra un amplio espectro de virus de influenza. Cetina-Montejo *et al.* (2019) determinaron el efecto de **1** obtenido de *D. anisandra* y demostraron que ocasionó una inhibición en la actividad de los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria), con valores de IC_{50} de 0.65-2.22 μM ; esta molécula ejerció su efecto inhibitorio en células infectadas con los virus a una MOI de 0.01. Además, se ha evidenciado que **1** actúa a nivel de la NP viral, afectando su translocación extranuclear. Los autores han hipotetizado que **1**

provocaría una disminución en la actividad viral mediante la inhibición de la formación de los complejos tipo daisy (RNPv-M1-NEP) y la exportación de las RNPv hacia el citoplasma celular, considerando que las NP son los elementos proteicos predominantes en las RNPv. A diferencia de **1**, no hay estudios que indiquen si el metabolito **2** tiene actividad anti-influenza.

Se ha mencionado que las configuraciones absolutas de **1** y **2** no han sido establecidas y únicamente se ha descrito que **2** sería producida por *P. zeylanica* como una mezcla racémica, de acuerdo a los resultados de rotación óptica de Sankaram *et al.* (1979). Por lo tanto, se ha propuesto una ruta de biosíntesis para **1** y **2**; partiendo de esta vía hipotética, se ha informado una ruta de síntesis biomimética para estos productos naturales, generándose los racematos **(±)-1** y **(±)-2** (Maruo *et al.*, 2013). Aprovechando este esquema de reacciones, se sintetizó un derivado hidroxilado (denominado **(±)-3**) considerando la hipótesis de que la actividad anti-influenza del epóxido **1** sería dependiente de sus grupos hidroxilo (Cetina Montejó, 2016). Entonces, se sintetizaron estas naftoquinonas racémicas y se determinó su probable efecto contra los virus de influenza A H1N1, A H3N2 y B especificados en la investigación de Cetina-Montejó *et al.* (2019). No obstante, hay que contemplar que pese a que los enantiómeros de una mezcla racémica presentan la misma composición química, enlaces y características fisicoquímicas, sus propiedades biológicas generalmente son diferentes (Casado *et al.*, 2020). Entonces, es común que un enantiómero sea mayormente activo y otro sea menos activo o inactivo, como se mencionó previamente (Nguyen *et al.*, 2006).

En este sentido, los resultados obtenidos para el compuesto **(±)-1** sintetizado en este trabajo de tesis contrastaron con lo reportado por Cetina-Montejó *et al.* (2019), ya que **(±)-1** mostró una reducción del efecto citopático en las cepas virales evaluadas a una MOI más baja (MOI = 0.001), a la concentración más alta (25 µM) y con una IC₅₀ >12.5 µM; no se observó un efecto antiviral significativo a las demás concentraciones (0.390-12.5 µM), por lo que **(±)-1** posee una menor actividad en comparación con su derivado natural. Esta información permite sugerir que la molécula analizada por Cetina-Montejó *et al.* (2019) fue aislada de manera enantioméricamente pura, puesto que **(±)-1** no exhibió actividad antiviral a las mismas concentraciones. Es posible que uno de los dos enantiómeros de **(±)-1** sea responsable del efecto (eutómero) y por esta razón el dímero sintético haya mostrado actividad antiviral hasta 25 µM, tomando en cuenta que a dicha concentración se hallaría una mayor cantidad del eutómero. Asimismo, es probable que el otro enantiómero sea menos activo o inactivo (distómero) contra los virus de influenza, debido a que a bajas concentraciones no se encontró citotoxicidad significativa (Nguyen *et al.*, 2006).

Los derivados sintéticos **(±)-2** y **(±)-3** no causaron una reducción del efecto citopático en todos los virus de influenza a las concentraciones probadas, por lo que se puede sugerir que ambos enantiómeros de estas mezclas racémicas no son activos contra los virus de influenza A y B. Igualmente, se podría establecer la premisa de que solo uno de los enantiómeros es bioactivo, aunque esto último indicaría que dicho enantiómero posee actividad mínima (dado que no se notó un efecto antiviral significativo a las concentraciones evaluadas) o que es activo a concentraciones superiores a 12.5 μM (para **(±)-2**) o 6.25 μM (para **(±)-3**), resaltando que los compuestos también mostraron toxicidad a concentraciones mayores a estas (Nguyen *et al.*, 2006).

En contraste con otras moléculas que han mostrado actividad antiviral como mezclas racémicas, la evidencia relativa a quinonas naturales o sintéticas es muy limitada (Yu *et al.*, 2022). Con relación al potencial efecto anti-influenza de este grupo de compuestos, los trabajos coinciden con los resultados observados en este proyecto de tesis para **(±)-2** y **(±)-3**, como el de Cetina Montejó (2016), quien demostró que **(±)-1c** no es activo contra los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) (Figura 3.8). Ngoc *et al.* (2019) aislaron la naftoquinona **(±)-94** de las raíces de *R. nasutus* y demostraron que tampoco posee actividad contra el virus de influenza A/PR/8/34 (H1N1).

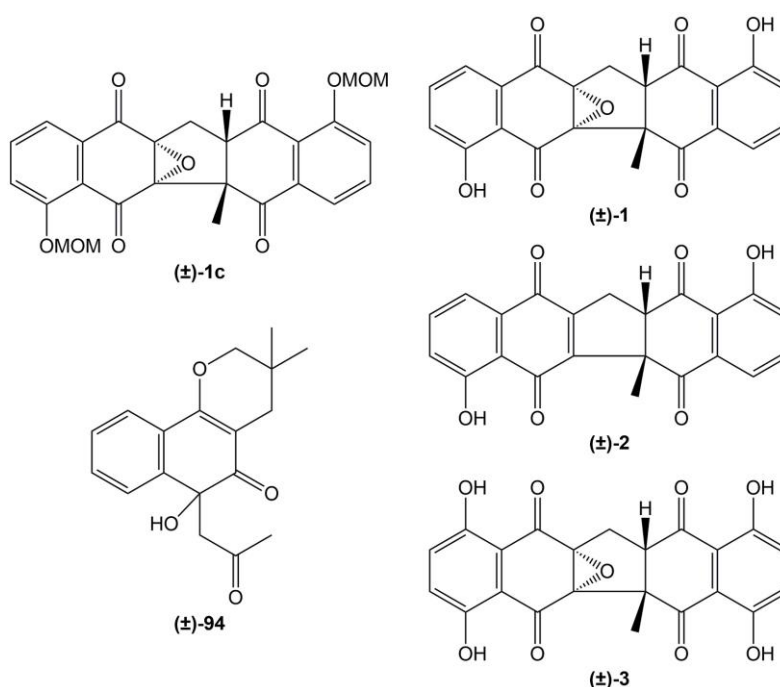


Figura 3.8. Mezclas racémicas de naftoquinonas con poca o nula actividad contra virus de influenza.

A pesar de la escasez de información relacionada con las mezclas racémicas de quinonas y su actividad contra virus de influenza, los resultados obtenidos en este estudio y la evidencia disponible señalan que las quinonas racémicas no son activas contra estos virus y aunado a esto, es probable que los enantiómeros de estos racematos también muestren diferencias en cuanto a su toxicología y farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción), los cuales son parámetros de suma importancia en los campos farmacéutico y médico (Superchi *et al.*, 2018). Por ende, la quiralidad y la estereoquímica son conceptos clave que siempre se deben tener en cuenta en la evaluación de la potencial actividad antiviral (u otras propiedades farmacológicas) de estos compuestos o derivados (Batista *et al.*, 2018). Esto es aún más relevante si se considera que hoy en día más del 60% de los fármacos disponibles comercialmente son quirales y entre éstos, aproximadamente 88% son administrados como racematos (Casado *et al.*, 2020).

Otro punto a tener en consideración está relacionado con las modificaciones estructurales, ya que hay investigaciones que han mostrado que ciertos cambios en la estructura de diversos metabolitos modulan su efecto antiviral, incluyendo sus propiedades anti-influenza (Guo *et al.*, 2022). Los resultados de las pruebas de citotoxicidad permitieron plantear como supuestos que la ausencia del grupo epóxido en **(±)-2** y la presencia de dos grupos hidroxilo adicionales en **(±)-3** contribuyen con un mayor efecto tóxico sobre las células MDCK en comparación con **(±)-1**. En las pruebas para determinar la potencial actividad contra los virus de influenza A y B se observó que estas modificaciones estructurales también colaboran con un decremento en el efecto antiviral de **(±)-1** y además, se puede incluir que la ausencia de grupos hidroxilo en **(±)-1** ocasiona un efecto similar, como se pudo notar con el derivado **(±)-1c** sintetizado previamente por Cetina Montejó (2016), el cual no inhibió la replicación de dichos virus. Asimismo, los datos publicados en el trabajo de Cetina-Montejó *et al.* (2019) mostraron que una disminución en la complejidad molecular tampoco potencia la actividad antiviral, ya que las naftoquinonas monoméricas *cis*-isoshinanolona (**64**), droserona (**24**), **91** y **1a** no presentaron algún efecto contra los virus de influenza, en contraste con el metabolito dimérico **1** (Figura 3.9).

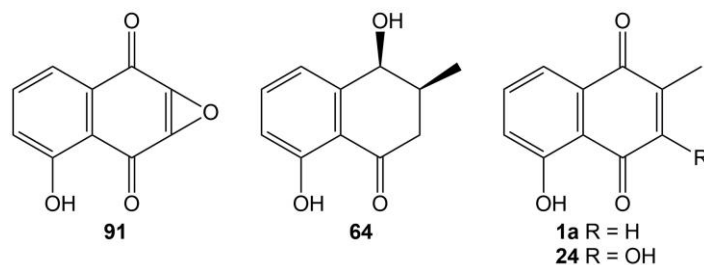


Figura 3.9. Naftoquinonas sin actividad contra virus de influenza.

De lo anterior se puede inferir que el epóxido natural **1** es una naftoquinona con una estructura privilegiada y que las modificaciones en su estructura afectan su actividad contra los virus de influenza, ya que incluso el racemato ($\pm$)-**1** mostró un ligero efecto antiviral a la máxima concentración evaluada. Considerando la evidencia obtenida, un grupo funcional clave en la actividad antiviral de **1** sería el anillo epóxido y puesto que ($\pm$)-**2** no contiene este sustituyente, es probable que su unión a los sitios activos de la NP viral (la cual se ha descrito como una diana molecular fundamental en la inhibición de la replicación viral por parte de **1**) u otras proteínas implicadas en el transporte de las RNPv hacia el citoplasma celular durante el proceso infeccioso (como las proteínas M1 o NEP, componentes de los complejos en cadena tipo daisy) se vean afectadas (Dou *et al.*, 2018). Esto derivará en el correcto ensamblaje de los viriones y su posterior propagación a otras células para continuar con el ciclo replicativo (Shafiuddin y Boon, 2019).

El derivado hidroxilado ($\pm$)-**3** es una molécula con mayor complejidad estructural que **1** ya que contiene cuatro sustituyentes hidroxilo, mientras que **1** solo posee dos de estos grupos. Por consiguiente, se podría hipotetizar que un aumento en el número de sustituyentes hidroxilo ocasionaría que ($\pm$)-**3** no se enlace al sitio activo de la NP (y posiblemente a otras proteínas virales involucradas en la translocación de las RNPv) debido a un probable impedimento estérico, lo que se también vería reflejado en la nula inhibición de la replicación de los virus de influenza (Dou *et al.*, 2018). Además, al no observarse actividad antiviral por parte de ($\pm$)-**2** y ($\pm$)-**3**, se podría descartar que las modificaciones químicas ya mencionadas causen una interacción de estas naftoquinonas diméricas con proteínas virales clave en otras etapas del ciclo replicativo, como la HA o NA (McAuley *et al.*, 2019). Sin embargo, hay que resaltar que en la literatura no se encuentran estudios *in silico* de acoplamiento molecular o *in vitro* con quinonas que avalen estos postulados, por lo que es importante sugerir la realización de estos experimentos para comprobar si las hipótesis planteadas son correctas.

Por otro lado, para corroborar las hipótesis con respecto a la actividad contra virus de influenza por parte del epóxido **1** y sus análogos, así como las sugeridas con relación a su biosíntesis en

las plantas, es esencial la caracterización absoluta de los productos naturales **1** y **2**. Aunque la comparación entre los datos obtenidos de la actividad antiviral del producto de síntesis **(±)-1** y el metabolito **1** aislado por Cetina-Montejo *et al.* (2019) señalan la posibilidad de que este último es generado como un enantiómero puro por las especies vegetales en los que se ha encontrado, se requiere el uso de técnicas que permitan separar los enantiómeros del compuesto sintetizado (Fernandes *et al.*, 2017). Seguidamente, es fundamental la evaluación de los dos enantiómeros contra los virus de influenza y contrastar estos resultados con lo reportado para el producto natural **1** y el racemato **(±)-1**. Por otro lado, si se demuestra que uno de los enantiómeros de **(±)-1** posee una actividad idéntica al metabolito obtenido de *D. anisandra* y se estandarizan las condiciones de síntesis para producir una mayor cantidad del epóxido bioactivo, es primordial llevar a cabo otros ensayos biológicos que permitan establecer a detalle el mecanismo de acción por el cual **1** ejerce su actividad antiviral, al igual que otros estudios farmacológicos y toxicológicos que aseguren que no es capaz de inducir efectos nocivos para la salud (Casado *et al.*, 2020). Para **(±)-1c**, **(±)-2** y **(±)-3**, la separación de cada uno de los enantiómeros de estos racematos, con la consecuente determinación de su actividad contra los virus de influenza A y B (junto con el metabolito **2**), son de interés para confirmar si hay posibles discrepancias con las mezclas racémicas sintetizadas y los productos naturales **1** y **2** (Fernandes *et al.*, 2017).

En conclusión, aunque los derivados **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** sintetizados en este trabajo no presentaron actividad contra los virus de influenza A y B (con excepción de **(±)-1**, que mostró un efecto antiviral a 25 μ M), los resultados proporcionaron más información sobre el papel que pueden desempeñar las mezclas racémicas de naftoquinonas en la búsqueda de compuestos contra la influenza, sentando una base para el desarrollo de nuevas investigaciones que posibiliten confirmar los supuestos planteados y que validen la potencial eficacia terapéutica de estas moléculas.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN

Los virus de influenza son responsables de una de las enfermedades infecciosas del sistema respiratorio más constantes y letales, lo que representa un problema de salud pública debido a las epidemias estacionales o al probable surgimiento de una cepa pandémica. Las medidas preventivas y terapéuticas han sido fundamentales en la protección contra la influenza, aunque la inmunidad limitada contra nuevas cepas virales o la aparición de resistencia a los fármacos aprobados implica un riesgo latente (Chakraborty y Chauhan, 2023). Incluso se han identificado mutaciones asociadas con resistencia en cepas de influenza aviar con potencial pandémico (H5N1 y H7N9), lo que amplía la necesidad de buscar alternativas farmacológicas. En esta búsqueda han emergido los productos naturales y sus análogos sintéticos, con potencial utilidad en el desarrollo de nuevos antivirales (Smyk *et al.*, 2022).

El objetivo de este proyecto fue sintetizar el epóxido de zeylanona (**1**) y dos análogos (zeylanona **2** y un derivado hidroxilado **3**) y la determinación de su actividad contra virus de influenza. Como la mayoría de los productos naturales, **1** es producido en poca cantidad por *Diospyros anisandra*, pero con una prometedora actividad anti-influenza ya que su mecanismo de acción estaría relacionado con la NP y probablemente otras proteínas asociadas al transporte extranuclear de las RNPv, dianas moleculares sobre las cuales no hay fármacos disponibles (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). La importancia de sintetizar **1** en este proyecto radicó en aumentar el rendimiento en comparación con el reportado de manera natural. Otro punto clave sobre **1** sería su estructura, ya que se ha señalado que su actividad antiviral dependería de los grupos hidroxilo en su estructura (Cetina Montejo, 2016). Se generaron dos análogos aprovechando el esquema de síntesis de **1** y se comprobó que modificaciones como la adición de dos grupos hidroxilo (**3**) y la eliminación del anillo epóxido (**2**) no potenciaron la actividad antiviral **1**. A pesar de lo anterior, en este estudio se reporta la síntesis de **2**, una molécula producida en mínima cantidad por distintas especies vegetales y con datos nuevos sobre su actividad antiviral (Ito *et al.*, 2018).

Con respecto a la síntesis de los compuestos, estos se sintetizaron como mezclas de enantiómeros (**±**)-**1**, (**±**)-**2** y (**±**)-**3**, tal como plantea su vía de biosíntesis propuesta (Maruo *et al.*, 2013). Los rendimientos para (**±**)-**1** y (**±**)-**2** fueron mayores en comparación con los metabolitos

aislados de fuentes naturales por Gu *et al.* (2004), Ito *et al.* (2018) y Cetina-Montejo *et al.* (2019). También se logró la síntesis de estructuras que no habían sido reportadas con anterioridad, como el derivado hidroxilado **(±)-3** y sus intermediarios 5,8-metoximetoxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**3c**) y **(±)-3d**. La síntesis de **(±)-3** abre la posibilidad de sintetizar otros análogos hidroxilados (o con otros sustituyentes) empleando el mismo esquema de reacciones. Asimismo, aunque los rendimientos de **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** fueron menores al de moléculas sintéticas ya descritas, las modificaciones realizadas mostraron que los compuestos pueden obtenerse a menor escala siguiendo la misma ruta de reacciones (Kamo *et al.*, 2018a). Esto último permite sugerir la continuación de la estandarización para producirlos a una escala mayor, considerando los resultados de actividad biológica y las hipótesis propuestas a partir de estos.

En este sentido, la evaluación de la citotoxicidad de las naftoquinonas y actividad contra virus de influenza contribuyeron a esclarecer el papel que pueden desempeñar los productos naturales **1** y **2** y los racematos sintéticos. Como ya se mencionó, **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** mostraron toxicidad en células MDCK y únicamente **(±)-1** mostró actividad antiviral a la concentración más alta evaluada, siendo de 11 a 38 veces menor (dependiendo de la cepa viral) a lo reportado por Cetina-Montejo *et al.* (2019).

Las diferencias en la bioactividad de las mezclas racémicas sintéticas con relación al metabolito **1** son evidentes e indicarían que este último (y por consiguiente **2**) sería generado naturalmente como un enantiómero. Esta información es de mucha utilidad considerando las dificultades existentes para la asignación de las configuraciones absolutas de muchos compuestos de origen natural debido a los bajos rendimientos en su aislamiento (como el epóxido **1** y su análogo **2**, de los cuales únicamente se han establecido sus configuraciones relativas) (Zask y Ellestad, 2018). Entonces, los bioensayos aportaron información fundamental para entender cuál sería la relación entre la estructura del metabolito **1** y su actividad anti-influenza, aunque la estandarización de un método que permita aislar los productos naturales **1** y **2** en mayor cantidad es necesaria para la caracterización absoluta de los mismos y determinar cuál enantiómero de **(±)-1** y **(±)-2** está presente en la naturaleza (Fernandes *et al.*, 2017).

Otro punto a destacar es la estructura del epóxido **1**, ya que las modificaciones estructurales en **(±)-2** y **(±)-3** mostraron disminuir la actividad antiviral en comparación con **(±)-1**. Cabe resaltar que en varios productos naturales se ha notado que la complejidad molecular ocasiona un aumento en su actividad (Guo *et al.*, 2022). Con las naftoquinonas, se ha demostrado que incluso la disminución en la complejidad molecular también afecta la actividad antiviral, ya que las

naftoquinonas monoméricas no inhiben la replicación de los virus de influenza a diferencia de la naftoquinona dimérica **1** (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). Por lo tanto, la evidencia disponible y los resultados de este proyecto de tesis permiten sugerir que **1** tiene una estructura privilegiada altamente relacionada con su probable mecanismo de acción, cuya selectividad con las dianas moleculares virales radicaría en los dos grupos hidroxilo y el anillo epóxido. El análisis *in silico* permitiría corroborar esta hipótesis.

Finalmente, a pesar de que los compuestos sintetizados no son activos, estos resultados concuerdan con lo reportado en diversos trabajos y establecen un punto de partida para nuevas investigaciones con estos derivados (Ngoc *et al.*, 2019). Además, considerando que todos los fármacos aprobados contra la influenza son moléculas enantioméricamente puras, para determinar cuál de los enantiómeros de **(±)-1** sería responsable de la actividad contra los virus de influenza es importante la estandarización de las condiciones de síntesis para producir una mayor cantidad de este racemato y separar cada uno de sus enantiómeros, para continuar con su estudio y determinar el probable mecanismo de acción de este compuesto (Zhang *et al.*, 2020).

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

Los compuestos ($\pm$)-epóxido de zeylanona (**1**), ($\pm$)-zeylanona (**2**) y el derivado hidroxilado ($\pm$)-**3** se sintetizaron mediante reacciones biomiméticas.

El compuesto ($\pm$)-**1** se sintetizó en tres pasos (rendimiento total de 1.4%), mientras que los compuestos ($\pm$)-**2** y ($\pm$)-**3** se sintetizaron en cuatro pasos (con rendimientos totales del 3 y 0.1%, respectivamente).

Los compuestos ($\pm$)-**1** y ($\pm$)-**2** exhibieron toxicidad moderada en células MDCK (CC_{50} = 33.23 y 19.37 μ M, respectivamente); el compuesto ($\pm$)-**3** mostró toxicidad elevada (CC_{50} = 7.73 μ M).

El compuesto ($\pm$)-**1** inhibió la actividad de los virus de influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2) y B/Yucatan/286/10 (linaje Victoria) a 25 μ M, mientras que no ocasionó una reducción del efecto citopático en las cepas virales a las demás concentraciones evaluadas (IC_{50} >12.5 μ M).

Los compuestos ($\pm$)-**2** y ($\pm$)-**3** no inhibieron la actividad de los virus de influenza A y B a las concentraciones evaluadas, con valores de IC_{50} >12.5 y >6.25 μ M, respectivamente.

4.3. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo aportaron evidencia sobre la función de las mezclas racémicas sintéticas **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3** en la búsqueda de compuestos contra la influenza y su relación con la actividad ya reportada para el producto natural **1**. No obstante, aún es necesario continuar estudiando estas moléculas con la finalidad de aclarar las hipótesis planteadas, por lo que se sugiere lo siguiente:

Continuar con la estandarización de las condiciones de reacción para obtener una mayor cantidad de las naftoquinonas diméricas.

Separar los enantiómeros de las naftoquinonas diméricas **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3**.

Realizar otro tipo de modificaciones químicas relacionadas con la estructura de **1** para determinar si los grupos hidroxilo y el anillo epóxido son los responsables de la actividad.

Purificar y/o caracterizar totalmente las naftoquinonas propuestas **3c**, **(±)-3d** y **(±)-3**, puesto que son estructuras nuevas.

Determinar la citotoxicidad y actividad contra virus de influenza de los enantiómeros puros de las mezclas racémicas **(±)-1**, **(±)-2** y **(±)-3**.

Realizar análisis *in silico* para corroborar el modo de unión de los enantiómeros biológicamente activos con sus respectivas dianas moleculares virales.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertson, A.K.F., Lumb, J.P. (2015). A bio-inspired total synthesis of tetrahydrofuran lignans. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 7, 2204-2208.
- Aminin, D., Polonik, S. (2020). 1,4-naphthoquinones: some biological properties and application. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 68, 1, 46-57.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirscha, V.M., Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33, 8, 1582-1614.
- Ayora-Talavera, G., Cetina-Montejo, L., Matos-Patrón, A., Romero-Beltrán, L. (2014). Hemagglutinin variants of influenza A(H1N1)pdm09 virus with reduced affinity for sialic acid receptors. *Archives of Virology*, 159, 1207-1211.
- Ayora Talavera, G., Cetina Montejo, L.A., Borges Argáez, R.L. (2017). Uso de naftoquinonas para el tratamiento de la influenza. Patente de México, número MX/a/2017/000486, Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
- Azman, N.S.N., Hossan, M.S., Nissapatorn, V., Uthaipibull, C., Prommana, P., Jin, K.T., Rahmatullah, M., Mahboob, T., Raju, C.S., Jindal, H.M., Hazra, B., Razak, M.R.M.A., Prajapati, V.K., Pandey, R.K., Aminudin, N., Shaari, K., Ismail, N.H., Butler, M.S., Zarubaev, V.V., Wiart, C. (2018). Anti-infective activities of 11 plants species used in traditional medicine in Malaysia. *Experimental Parasitology*, 194, 67-78.
- Baltz, R.H. (2019). Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46, 281-299.
- Bamola, N., Verma, P., Negi, C. (2018). A review on some traditional medicinal plants. *International Journal of Life Sciences Scientific Research*, 4, 1, 1550-1556.

- Banerjee, S., Mazumdar, S. (2012). Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1-40.
- Bao, R., Zhang, H., Tang, Y. (2021). Biomimetic synthesis of natural products: a journey to learn, to mimic, and to be better. *Accounts of Chemical Research*, 54, 19, 3720-3733.
- Batista, A.N.L., dos Santos Jr., F.M., Batista Jr., J.M., Cass, Q.B. (2018). Enantiomeric mixtures in natural product chemistry: separation and absolute configuration assignment. *Molecules*, 23, 2, 1-18.
- Bhuia, M.S., Khalipha, A.B.R., Rahman, N., Rabbani, M.G., Siam, M.S.H., Hossain, M.S., Mondal, M., Munshi, M.H., Mia, M.M., Hossen, S. (2021). In-silico drug design of Zeylanone and its derivatives against 6M0J for treatment of COVID-19 using molecular docking tools. *International Journal of Evergreen Scientific Research*, 04, 02, 1-12.
- Bitchagno, G.T.M., Nchiozem-Ngnitedem, V.A., Melchert, D., Fobofou, S.A. (2022). Demystifying racemic natural products in the homochiral world. *Nature Reviews Chemistry*, 6, 806-822.
- Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.J., Park, H., Volchkov, P. (2021). Avian influenza in wild birds and poultry: dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology. *Pathogens*, 10, 5, 1-23.
- Bolton, J.L., Dunlap, T. (2017). Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. *Chemical Research in Toxicology*, 30, 1, 13-37.
- Borges-Argáez, R., Chan-Balan, R., Cetina-Montejo, L., Ayora-Talavera, G., Sansores-Peraza, P., Gómez-Carballo, J., Cáceres-Farfán, M. (2019). *In vitro* evaluation of anthraquinones from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) roots and several derivatives against strains of influenza virus. *Industrial Crops and Products*, 132, 468-475.
- Bulger, P.G., Bagal, S.K., Marquez, R. (2008). Recent advances in biomimetic natural product synthesis. *Natural Product Reports*, 25, 254-297.

- Cetina Montejó, L.A. (2016). Evaluación de la actividad antiviral de naftoquinonas aisladas de *Diospyros anisandra* contra el virus de influenza. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México.
- Casado, N., Valimafía-Traverso, J., García, M.A., Marina, M.L. (2020). Enantiomeric determination of drugs in pharmaceutical formulations and biological samples by electrokinetic chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50, 6, 554-584.
- Cetina-Montejó, L., Ayora-Talavera, G., Borges-Argáez, R. (2019). Zeylanone epoxide isolated from *Diospyros anisandra* stem bark inhibits influenza virus *in vitro*. *Archives of Virology*, 164, 6, 1543-1552.
- Chaimayo, C., Hayashi, T., Underwood, A., Hodges, E., Takimoto, T. (2017). Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein. *Virology*, 505, 23-32.
- Chakraborty, S., Chauhan, A. (2023). Fighting the flu: a brief review on anti-influenza agents. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1-52.
- Chen, F., Yang, L., Zhai, L., Huang, Y., Chen, F., Duan, W., Yang, J. (2020). Methyl brevifolincarboxylate, a novel influenza virus PB2 inhibitor from *Canarium Album* (Lour.) Raeusch. *Chemical Biology & Drug Design*, 96, 5, 1280-1291.
- Chlanda, P., Zimmerberg, J. (2016). Protein-lipid interactions critical to replication of the influenza A virus. *FEBS Letters*, 590, 13, 1940-1954.
- Dar, U.A., Kamal, M., Shah, S.A. (2021). 1,4-naphthoquinone: a privileged structural framework in drug discovery, en: Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds, Shahid-ul-Islam, Banday, J.A. (Eds.). Scrivener Publishing LLC, Massachusetts, pp. 149.
- Day, A.J., Sumby, C.J., George, J.H. (2020). Biomimetic synthetic studies on the bruceol family of meroterpenoid natural products. *The Journal of Organic Chemistry*, 85, 4, 2103-2117.
- De, S.K. (2021). Applied Organic Chemistry: Reaction Mechanisms and Experimental Procedures in Medicinal Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 301-303.

- Dessolin, J., Biot, C., Davioud-Charvet, E. (2001). Bromination studies of the 2,3-dimethylnaphthazarin core allowing easy access to naphthazarin derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, 66, 16, 5616-5619.
- Dirección General de Epidemiología (2023). Informe semanal de la temporada de influenza estacional y otros virus respiratorios 2022-2023. Semana 20-2023. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/826408/INFLUENZA_OVR_SE20_2023.pdf [Acceso 1 agosto 2023].
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., Daniels, R. (2018). Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-17.
- Dumm, R.E., Heaton, N.S. (2019). The development and use of reporter influenza B viruses. *Viruses*, 11, 8, 1-13.
- Escardó Pereyra, C., Ferreira Dantas, R., Baptista Ferreira, S., Pinho Gomes, L., Paes Silva-Jr., F. (2019). The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer Cell International*, 19, 1-20.
- Farrukee, R., Hurt, A.C. (2017). Antiviral drugs for the treatment and prevention of influenza. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 9, 3, 318-332.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, 4, 343-346.
- 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, 1-11.
- Fernandes, C., Tiritan, M.E., Pinto, M.M.M. (2017). Chiral separation in preparative scale: a brief overview of membranes as tools for enantiomeric separation. *Symmetry*, 9, 10, 1-19.
- Flores-Sanchez, I.J., Verpoorte, R. (2009). Plant polyketide synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 3, 167-174.
- Fodor, E., te Velhuis, A.J.W. (2020). Structure and function of the influenza virus transcription and replication machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10, 9, 1-15.

- Furuta, A., Tsubuki, M., Endoh, M., Miyamoto, T., Tanaka, J., Salam, K.A., Akimitsu, N., Tani, H., Yamashita, A., Moriishi, K., Nakakoshi, M., Sekiguchi, Y., Tsuneda, S., Noda, N. (2015). Identification of hydroxyanthraquinones as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 8, 18439-18453.
- Giese, S., Bolte, H., Schwemmler, M. (2016). The feat of packaging eight unique genome segments. *Viruses*, 8, 6, 1-11.
- Govorkova, E.A., Takashita, E., Daniels, R.S., Fujisaki, S., Presser, L.D., Patel, M.C., Huang, W., Lackenby, A., Nguyen, H.T., Pereyaslov, D., Rattigan, A., Brown, S.K., Samaan, M., Subbarao, K., Wong, S., Wang, D., Webby, R.J., Yen, H.L., Zhang, W., Meijer, A., Gubareva, L.V. (2022). Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018-2020. *Antiviral Research*, 200, 1-13.
- Grienke, U., Schmidtke, M., Kirchmair, J., Pfarr, K., Wutzler, P., Dürrwald, R., Wolber, G., Liedl, K.R., Stuppner, H., Rollinger, J.M. (2010). Antiviral potential and molecular insight into neuraminidase inhibiting diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 2, 778-786.
- Gu, J.Q., Graf, T.N., Lee, D., Chai, H.B., Mi, Q., Kardono, L.B.S., Setyowati, F.M., Ismail, R., Riswan, S., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Swanson, S.M., Kroll, D.J., Falkinham III, J.O., Wall, M.E., Wani, M.C., Kinghorn, A.D., Oberlies, N.H. (2004). Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia. *Journal of Natural Products*, 67, 7, 1156-1161.
- Guo, Y., Ma, A., Wang, X., Yang, C., Chen, X., Li, G., Qiu, F. (2022). Research progress on the antiviral activities of natural products and their derivatives: Structure-activity relationships. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1-19.
- Hoffmann, R.W. (2013). Natural product synthesis: changes over time. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 1, 123-130.
- Huang, P.Q. (2018). Principles for synthetic efficiency and expansion of the field, en: Efficiency in Natural Product Total Synthesis, Huang, P.Q., Yao, Z.J., Hsung, R.P. (Eds.). John Wiley & Sons, Nueva Jersey, pp. 42.

- Hugelshofer, C.L., Magauer, T. (2017). Bioinspired total syntheses of terpenoids. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15, 12-16.
- Hutchinson, E.C., Fodor, E. (2013). Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*, 5, 10, 2424-2446.
- Hutchinson, E.C., Yamauchi, Y. (2018). Understanding influenza, en: Influenza Virus. Methods and Protocols, Yamauchi, Y. (Ed.). Humana Press, Nueva York, pp. 7-12.
- Ilieva, Y., Dimitrova, L., Zaharieva, M.M., Kaleva, M., Alov, P., Tsakovska, I., Pencheva, T., Pencheva-El Tibi, I., Najdenski, H., Pajeva, I. (2021). Cytotoxicity and microbicidal activity of commonly used organic solvents: A comparative study and application to a standardized extract from *Vaccinium macrocarpon*. *Toxics*, 9, 5, 1-16.
- Ito, C., Matsui, T., Takano, M., Wu, T.S., Itoigawa, M. (2018). Anti-cell proliferation effect of naphthoquinone dimers isolated from *Plumbago zeylanica*. *Natural Product Research*, 32, 18, 2127-2132.
- Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V., Ebrahimpour, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93, 8, 4638-4646.
- Jeong, H.J., Ryu, Y.B., Park, S.J., Kim, J.H., Kwon, H.J., Kim, J.H., Park, K.H., Rho, M.C., Lee, W.S. (2009). Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 19, 6816-6823.
- Juárez-Méndez, M.T., Borges-Argáez, R., Ayora-Talavera, G., Escalante-Rebolledo, S.E., Escalante-Erosa, F., Cáceres-Farfán, M. (2022). *Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-hemagglutinin-neuraminidase activity on influenza AH1N1pdm09 virus. *Natural Product Research*, 36, 10, 2666-2672.
- Kamo, S., Yoshioka, K., Kuramochi, K., Tsubaki, K. (2016). Total syntheses of juglorescein and juglocombins A and B. *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 35, 10317-10320.
- Kamo, S., Kuramochi, K., Tsubaki, K. (2018a). Recent topics in total syntheses of natural dimeric naphthoquinone derivatives. *Tetrahedron Letters*, 59, 3, 224-230.

- Kamo, S., Kuramochi, K., Tsubaki, K. (2018b). Bioinspired synthesis of juglorubin from juglomycin C. *Organic Letters*, 20, 4, 1082-1085.
- Kamo, S., Saito, T., Kusakabe, Y., Tomoshige, S., Uchiyama, M., Tsubaki, K., Kuramochi, K. (2019). Synthetic and biological studies of juglorubin and related naphthoquinones. *The Journal of Organic Chemistry*, 84, 21, 13957-13966.
- Kim, J.Y., Jeong, H.J., Park, J.Y., Kim, Y.M., Park, S.J., Cho, J.K., Park, K.H., Ryu, Y.B., Lee, W.S. (2012). Selective and slow-binding inhibition of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on glycosyl hydrolase 33 and 34 sialidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 5, 1740-1748.
- Kim, H., Webster, R.G., Webby, R.J. (2018). Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen. *Viral Immunology*, 31, 2, 174-183.
- Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., Palese, P., Shaw, M.L., Treanor, J., Webster, R.G., García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 3, 1-21.
- Lagacé-Wiens, P.R.S., Rubinstein, E., Gumel, A. (2010). Influenza epidemiology - past, present, and future. *Critical Care Medicine*, 38, 4, 1-9.
- Lee, K.S., Kim, S.K. (2013). Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 2, 100-108.
- Li, H., Cao, B. (2017). Pandemic and avian influenza A viruses in humans: Epidemiology, virology, clinical characteristics, and treatment strategy. *Clinics in Chest Medicine*, 38, 1, 59-70.
- Li, J.J. (2013). Name Reactions. A Collection of Detailed Reaction Mechanisms. Springer, Nueva York, pp. 175.
- Li, L., Chen, Z., Zhang, X., Jia, Y. (2018). Divergent strategy in natural product total synthesis. *Chemical Reviews*, 118, 7, 3752-3832.
- Li, Y., Huo, S. Yin, Z., Tian, Z., Huang, F., Liu, P., Liu, Y., Yu, F. (2023). The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs. *Mbio*, 14, 5, 1-22.

- Liang, Y. (2023). Pathogenicity and virulence of influenza. *Virulence*, 14, 1, 1-21.
- Lina, B., Boucher, C., Osterhaus, A., Monto, A.S., Schutten, M., Whitley, R.J., Nguyen-Van-Tam, J.S. (2018). Five years of monitoring for the emergence of oseltamivir resistance in patients with influenza A infections in the Influenza Resistance Information Study. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 12, 2, 267-278.
- Lu, L., Lycett, S.J., Brown, A.J.L. (2014). Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 1-15.
- Ma, H.X., Wang, R.L., Nie, Y.F., Su, J., Li, D.X., Li, Y., Du, Y.H., Wei, H.Y., Li, X.L., Wang, Z., Xu, B.L., Huang, X.Y. (2019). Distribution of avian influenza A viruses in poultry-related environment and its association with human infection in Henan, 2016 to 2017. *Biomedical and Environmental Sciences*, 32, 11, 797-803.
- Ma, S.G., Gao, R.M., Li, Y.H., Jiang, J.D., Gong, N.B., Li, L., Lü, Y., Tang, W.Z., Liu, Y.B., Qu, J., Lü, H.N., Li, Y., Yu, S.S. (2013). Antiviral spirooliganones A and B with unprecedented skeletons from the roots of *Illicium oligandrum*. *Organic Letters*, 15, 17, 4450-4453.
- Ma, Z., Chen, C. (2018). Natural products as inspiration for the development of new synthetic methods. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 65, 1, 43-59.
- Maruo, S., Nishio, K., Sasamori, T., Tokitoh, N., Kuramochi, K., Tsubaki, K. (2013). Biomimetic synthesis of zeilanone and zeilanone epoxide by dimerization of 2-methyl-1,4-naphthoquinone. *Organic Letters*, 15, 7, 1556-1559.
- Matsuo, Y., Oowatashi, R., Saito, Y., Tanaka, T. (2017). Nonenzymatic biomimetic synthesis of black tea pigment theaflavins. *Synlett*, 28, 18, 2505-2508.
- McAuley, J.L., Gilbertson, B.P., Trifkovic, S., Brown, L.E., McKimm-Breschkin, J.L. (2019). Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-13.
- Meyer, G.W., Bahamon Naranjo, M.A., Widhalm, J.R. (2021). Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking, and resistance to their allelopathic effects. *Journal of Experimental Botany*, 72, 2, 167-176.

- Mifsud, E.J., Hayden, F.G., Hurt, A.C. (2019). Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral Research*, 169, 1-9.
- Minho, A.P., Domingues, L.F., Gainza, Y.A., Figueiredo, A., Boligon, A.A., Domingues, R., Chagas, A.C.S. (2020). *In vitro* screening of plant extract on *Haemonchus contortus* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Essential Oil Research*, 32, 3, 269-278.
- 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.
- Nachbagauer, R., Krammer, F. (2017). Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies. *Clinical Microbiology and Infection*, 23, 4, 222-228.
- Nelson, S.W., Lorbach, J.N., Nolting, J.M., Stull, J.W., Jackwood, D.J., Davis, I.C., Bowman, A.S. (2019). Madin-Darby canine kidney cell sialic acid receptor modulation induced by culture medium conditions: Implications for the isolation of influenza A virus. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 13, 6, 593-602.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83, 3, 770-803.
- Ngoc, T.M., Phuong, N.T.T., Khoi, N.M., Park, S.J., Kwak, H.J., Nhiem, N.X., Trang, B.T.T., Tai, B.H., Song, J.H., Ko, H.J., Kim, S.H. (2019). A new naphthoquinone analogue and antiviral constituents from the root of *Rhinacanthus nasutus*. *Natural Product Research*, 33, 3, 360-366.
- Nguyen, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: an overview. *International Journal of Biomedical Science*, 2, 2, 85-100.
- Nile, S.H., Kim, D.H., Nile, A., Park, G.S., Gansukh, E., Kai, G. (2020). Probing the effect of quercetin 3-glucoside from *Dianthus superbus* L against influenza virus infection- *In vitro* and *in silico* biochemical and toxicological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 1-10.
- Novikov, V.L., Balaneva, N.N., Shestak, O.P., Anufriev, V.P., Glazunov, V.P. (2016). Cycloacylation of chloro-substituted hydroquinone dimethyl ethers with dichloromaleic anhydride. *Russian Chemical Bulletin*, 65, 4, 993-1003.

- Nuwarda, R.F., Alharbi, A.A., Kayser, V. (2021). An overview of influenza viruses and vaccines. *Vaccines*, 9, 9, 1-27.
- Oliva, J., Eichenbaum, A., Belin, J., Gaudino, M., Guillotin, J., Alzieu, J.P., Nicollet, P., Brugidou, R., Gueneau, E., Michel, E., Meyer, G., Ducatez, M.F. (2019). Serological evidence of influenza D virus circulation among cattle and small ruminants in France. *Viruses*, 11, 6, 1-5.
- Olubiyi, O.O., Olagunju, M., Keutmann, M., Loschwitz, J., Strodel, B. (2020). High throughput virtual screening to discover inhibitors of the main protease of the coronavirus SARS-CoV-2. *Molecules*, 25, 14, 1-20.
- Organización Mundial de la Salud (2018). Influenza (Seasonal). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) [Acceso 17 mayo 2023].
- Organización Mundial de la Salud (2023a). Avian influenza weekly update number 909. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/365675/AI-20230818.pdf?sequence=966&isAllowed=y> [Acceso 17 septiembre 2023].
- Organización Mundial de la Salud (2023b). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2023-2024 northern hemisphere influenza season. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-northern-hemisphere-recommendation-2023-2024/202302_seasonal_recommendation_a.pdf?sfvrsn=42612ae5_3&download=true [Acceso 25 julio 2023].
- Oymans, J., te Velhuis, A.J.W. (2018). A mechanism for priming and realignment during influenza A virus replication. *Journal of Virology*, 92, 3, 1-14.
- Paget, J., Caini, S., Del Riccio, M., van Waarden, W., Meijer, A. (2022). Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? *Eurosurveillance*, 27, 39, 1-6.
- Pang, X., Zhao, J.Y., Liu, N., Chen, M.H., Zheng, W., Zhang, J., Chen, X.J., Cen, S., Yu, L.Y., Ma, B.P. (2021). Anthraquinone analogues with inhibitory activities against influenza A virus from *Polygonatum odoratum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 23, 8, 717-723.

- Petrova, V.N., Russell, C.A. (2018). The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 47-60.
- Poupon, E., Nay, B. (2011). Biomimetic organic synthesis: an introduction, en: Biomimetic Organic Synthesis, Poupon, E., Nay, B. (Eds.). Wiley-VCH, Weinheim, pp. 24, 25.
- Rajasekaran, D., Palombo, E.A., Yeo, T.C., Ley, D.L.S., Tu, C.L., Malherbe, F., Grollo, L. (2013). Identification of traditional medicinal plant extracts with novel anti-influenza activity. *PLOS ONE*, 8, 11, 1-15.
- Rauf, A., Uddin, G., Patel, S., Khan, A., Halim, S.A., Bawazeer, S., Ahmad, K., Muhammad, N., Mubarakj, M.S. (2017). *Diospyros*, an under-utilized, multi-purpose plant genus: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 714-730.
- Razzak, M., De Brabander, J.K. (2011). Lessons and revelations from biomimetic syntheses. *Nature Chemical Biology*, 7, 865-875.
- Rewar, S., Mirdha, D., Rewar, P. (2015). Treatment and prevention of pandemic H1N1 influenza. *Annals of Global Health*, 81, 5, 645-653.
- Ruiz-Aragón, J., Gani, R., Márquez, S., Alvarez, P. (2020). Estimated cost-effectiveness and burden of disease associated with quadrivalent cell-based and egg-based influenza vaccines in Spain. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16, 9, 2238-2244.
- Ruíz Santillán, M.P., Mejía Coico, F.R. (2020). Plantas utilizadas en medicina tradicional para afecciones respiratorias virales. *REBIOL*, 40, 1, 109-130.
- Sankaram, A.V.B., Rao, A.S., Shoolery, J.N. (1979). Zeylanone and Isozeylanone, two novel quinones from *Plumbago Zeylanica*. *Tetrahedron*, 35, 14, 1777-1782.
- Schrauwen, E.J.A., Fouchier, R.A.M. (2014). Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerging Microbes & Infections*, 3, 1, 1-10.
- Schroeder, R.L., Goyal, N., Bratton, M., Townley, I., Pham, N.A., Tram, P., Stone, T., Geathers, J., Nguyen, K., Sridhar, J. (2016). Identification of quinones as novel PIM1 kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3187-3191.

- Schroeder, R., Sfondouris, M., Goyal, N., Komati, R., Weerathunga, A., Gettridge, C., Stevens, C.L.K., Jones, F.E., Sridhar J. (2019). Identification of new mono/dihydroxynaphthoquinone as lead agents that inhibit the growth of refractive and triple-negative breast cancer cell lines. *ACS Omega*, 4, 6, 10610-10619.
- Seah, A., Loo, L.H., Jamali, N., Maiwald, M., Aik, J. (2023). The influence of air quality and meteorological variations on influenza A and B virus infections in a paediatric population in Singapore. *Environmental Research*, 216, 1-11.
- Sederdahl, B.K., Williams, J.V. (2020). Epidemiology and clinical characteristics of influenza C virus. *Viruses*, 12, 1, 1-11.
- Semenov, V.A., Krivdin, L.B. (2022). Combined computational NMR and molecular docking scrutiny of potential natural SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors. *The Journal of Physical Chemistry B*, 126, 11, 2173-2187.
- Shafiuddin, M., Boon, A.C.M. (2019). RNA sequence features are at the core of influenza A virus genome packaging. *Journal of Molecular Biology*, 431, 21, 4217-4228.
- Shao, W., Li, X., Goraya, M.U., Wang, S., Chen, J.L. (2017). Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 8, 1-13.
- Sharma, G., Kumar, S.V., Wahab, H.A. (2018). Molecular docking, synthesis, and biological evaluation of naphthoquinone as potential novel scaffold for H5N1 neuraminidase inhibition. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36, 1, 233-242.
- Sharma, L., Rebaza, A., Dela Cruz, C.S. (2019). When “B” becomes “A”: the emerging threat of influenza B virus. *European Respiratory Journal*, 54, 1-3.
- Skrzyńska, A., Romaniszyn, M., Pomikło, D., Albrecht, Ł. (2018). The application of 2-benzyl-1,4-naphthoquinones as pronucleophiles in aminocatalytic synthesis of tricyclic derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, 83, 9, 5019-5026.
- Smee, D.F., Morrison, A.C., Barnard, D.L., Sidwell, R.W. (2002). Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods*, 106, 1, 71-79.

- Smyk, J.M., Szydłowska, N., Szulc, W., Majewska, A. (2022). Evolution of influenza viruses - drug resistance, treatment options, and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 20, 1-20.
- Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, 68, 2, 66-74.
- Song, L., Yao, H., Tong, R. (2014). Biomimetic asymmetric total syntheses of spiroooliganones A and B. *Organic Letters*, 16, 14, 3740-3743.
- Suarez, D.L. (2017). Influenza A virus, en: Animal Influenza, Swayne, D.E. (Ed.). John Wiley & Sons, Iowa, pp. 3.
- Sunassee, S.N., Veale, C.G.L., Shunmoogam-Gounden, N., Osoniyi, O., Hendricks, D.T., Caira, M.R., de la Mare, J.A., Edkins, A.L., Pinto, A.V., da Silva Júnior, E.N., Davies-Coleman, M.T. (2013). Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 98-110.
- Superchi, S., Scafato, P., Górecki, M., Pescitelli, G. (2018). Absolute configuration determination by quantum mechanical calculation of chiroptical spectra: basics and applications to fungal metabolites. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 2, 287-320.
- Swaminathan, K., Müller, P., Downard, K.M. (2014). Substituent effects on the binding of natural product anthocyanidin inhibitors to influenza neuraminidase with mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 828, 61-69.
- Szewczyk, B., Bieńkowska-Szewczyk, K., Król, E. (2014). Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochimica Polonica*, 61, 3, 397-401.
- Takahara, Y., Nakaya, Y., Yasuura, M., Ashiba, H., Kumar, P.K.R., Fujimaki, M. (2019). Comparison of influenza virus detection methods. *Sensors and Materials*, 31, 1, 79-87.

- Takashita, E., Morita, H., Nagata, S., Shirakura, M., Fujisaki, S., Miura, H., Takayama, I., Arita, T., Suzuki, Y., Yamaoka, M., Tanikawa, T., Tsunekuni, R., Mine, J., Sakuma, S., Uchida, Y., Shibata, A., Iwanaka, M., Kishida, N., Nakamura, K., Kageyama, T., Watanabe, S., Hasegawa, H., The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. (2022). Antiviral susceptibilities of avian influenza A (H5), A (H7), and A (H9) viruses isolated in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 75, 4, 398-402.
- Tandon, V.K., Singh, R.V., Yadav, D.B. (2004). Synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antiviral, antifungal and anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 11, 2901-2904.
- Te Velhuis, A.J.W., Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 479-493.
- Terrier, O., Slama-Schwok, A. (2021). Anti-influenza drug discovery and development: targeting the virus and its host by all possible means, en: *Antiviral Drug Discovery and Development*, Liu, X., Zhan, P., Menéndez-Arias, L., Poongavanam, V. (Eds.). Springer, Singapur, pp. 196.
- Tian, X., Li, L., Pei, J., Yue, R., Fang, X., Zhang, J., He, W., Shan, L., Shen, Y., Zhang, W. (2015). (–) and (+)-Merrilliaquinone, a pair of new quinone enantiomers from *Illicium merrillianum* and their distinctive effect on human hepatoma and hepatic cells. *RSC Advances*, 5, 75857-75862.
- Uc-Cachón, A.H., Molina-Salinas, G.M., Said-Fernández, S., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Borges-Argáez, R. (2013). A new dimeric naphthoquinone from *Diospyros anisandra*. *Natural Product Research*, 27, 13, 1174-1178.
- Uc-Cachón, A.H., Borges-Argáez, R., Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., González-Salazar, F., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Molina-Salinas, G.M. (2014). Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 27, 1, 114-120.
- Uddin, Z., Song, Y.H., Curtis-Long, M.J., Kim, J.Y., Yuk, H.J., Park, K.H. (2016). Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from *Polygonum cuspidatum* and their inhibitory mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 283-292.

- Valesano, A.L., Fitzsimmons, W.J., McCrone, J.T., Petrie, J.G., Monto, A.S., Martin, E.T., Luring, A.S. (2020). Influenza B viruses exhibit lower within-host diversity than influenza A viruses in human hosts. *Journal of Virology*, 94, 5, 1-14.
- Vessecchi, R., Emery, F.S., Galembeck, S.E., Lopes, N.P. (2012). Gas-phase reactivity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones: a computational and mass spectrometry study of lapachol congeners. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 12, 1648-1659.
- Wade, L.G. (2004). Química Orgánica. Pearson Educación, Madrid, pp. 1042, 1043.
- Wang, Y., Bao, R., Huang, S., Tang, Y. (2013). Bioinspired total synthesis of katsumadain A by organocatalytic enantioselective 1,4-conjugate addition. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9, 1601-1606.
- Wang, X.M., Lin, H.Y., Kong, W.Y., Guo, J., Shi, J., Huang, S.C., Qi, J.L., Yang, R.W., Gu, H.W., Yang, Y.H. (2014). Synthesis and biological evaluation of heterocyclic carboxylic acyl shikonin derivatives. *Chemical Biology & Drug Design*, 83, 3, 334-343.
- Wang, Y., Sun, J., Qiao, J., Ouyang, J., Na, N. (2018). A “soft” and “hard” ionization method for comprehensive studies of molecules. *Analytical Chemistry*, 90, 24, 14095-14099.
- Wang, S., Dong, G., Sheng, C. (2019). Structural simplification of natural products. *Chemical Reviews*, 119, 6, 4180-4220.
- Wang, H.X., Zeng, M.S., Ye, Y., Liu, J.Y., Xu, P.P. (2021). Antiviral activity of puerarin as potent inhibitor of influenza virus neuraminidase. *Phytotherapy Research*, 35, 1, 324-336.
- White, M.C., Lowen, A.C. (2018). Implications of segment mismatch for influenza A virus evolution. *Journal of General Virology*, 99, 1, 3-16.
- Widhalm, J.R., Rhodes, D. (2016). Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Horticulture Research*, 3, 16046, 1-17.
- Wille M., Holmes, E.C. (2020). The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10, 7, 1-20.

- Wolff, T., Veit, M. (2021). Influenza B, C and D viruses (*Orthomyxoviridae*), en: Encyclopedia of Virology, Fourth Edition, Volume 2, Bamford, D.H., Zuckerman, M. (Eds.). Elsevier, Massachusetts, pp. 561-574.
- Wu, N.C., Wilson, I.A. (2020). Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10, 8, 1-21.
- Wuts, P.G.M., Greene, T.W. (2007). Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, Nueva Jersey, pp. 16-58.
- Yamashita, M., Kaneko, M., Tokuda, H., Nishimura, K., Kumeda, Y., Iida, A. (2009). Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 17, 6286-6291.
- Yamashita, M., Sawano, J., Umeda, R., Tatsumi, A., Kumeda, Y., Iida, A. (2021). Structure-activity relationship studies of antimicrobial naphthoquinones derived from constituents of *Tabebuia avellanedae*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 69, 7, 661-673.
- 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.
- Yang, Y., Zhao, D., Yuan, K., Zhou, G., Wang, Y., Xiao, Y., Wang, C., Xu, J., Yang, W. (2015). Two new dimeric naphthoquinones with neuraminidase inhibitory activity from *Lithospermum erythrorhizon*. *Natural Product Research*, 29, 10, 908-913.
- Yu, J.H., Yu, Z.P., Capon, R.J., Zhang, H. (2022). Natural enantiomers: occurrence, biogenesis and biological properties. *Molecules*, 27, 4, 1-73.
- Zaraket, H., Hurt, A.C., Clinch, B., Barr, I., Lee, N. (2021). Burden of influenza B virus infection and considerations for clinical management. *Antiviral Research*, 185, 1-13.
- Zask, A., Ellestad, G. (2018). Biomimetic syntheses of racemic natural products. *Chirality*, 30, 2, 157-164.

- Zhang, Y., Han, H., Qiu, H., Lin, H., Yu, L., Zhu, W., Qi, J., Yang, R., Pang, Y., Wang, X., Lu, G., Yang, Y. (2017). Antiviral activity of a synthesized shikonin ester against influenza A (H1N1) virus and insights into its mechanism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 636-645.
- Zhang, X., He, J., Huang, W., Huang, H., Zhang, Z., Wang, J., Yang, L., Wang, G., Wang, Y., Li, Y. (2018). Antiviral activity of the sesquiterpene lactones from *Centipeda minima* against influenza A virus *in vitro*. *Natural Product Communications*, 13, 2, 115-119.
- Zhang, Z.J., Morris-Natschke, S.L., Cheng, Y.Y., Lee, K.H., Li, R.T. (2020). Development of anti-influenza agents from natural products. *Medicinal Research Reviews*, 40, 6, 2290-2338.
- Zu, M., Yang, F., Zhou, W., Liu, A., Du, G., Zheng, L. (2012). *In vitro* anti-influenza virus and anti-inflammatory activities of theaflavin derivatives. *Antiviral Research*, 94, 3, 217-224.

ANEXO I: ARTÍCULO DE REVISIÓN

- Chan-Zapata, I., Borges-Argáez, R., Ayora-Talavera, G. (2023). Quinones as promising compounds against respiratory viruses: A review. *Molecules*, 28, 4, 1981. <https://doi.org/10.3390/molecules28041981>. Estatus: Publicado.

QUINONES AS PROMISING COMPOUNDS AGAINST RESPIRATORY VIRUSES: A REVIEW

Ivan Chan-Zapata ¹, Rocío Borges-Argáez ^{1,*} and Guadalupe Ayora-Talavera ²

¹ Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97205, Yucatán, México

² Departamento de Virología, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Paseo de Las Fuentes, Mérida 97225, Yucatán, México

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

Abstract: Respiratory viruses represent a world public health problem, giving rise to annual seasonal epidemics and several pandemics caused by some of these viruses, including the COVID-19 pandemic caused by the novel SARS-CoV-2, which continues to date. Some antiviral drugs have been licensed for the treatment of influenza, but cause side effects and lead to resistant viral strains. Likewise, aerosolized ribavirin is the only drug approved for the therapy of infections by the respiratory syncytial virus but possesses various limitations. On the other hand, no specific drugs are licensed to treat other viral respiratory diseases. In this sense, natural products and their derivatives have appeared promising alternatives in searching for new compounds with antiviral activity. Besides their chemical properties, quinones have demonstrated interesting biological activities, including activity against respiratory viruses. This review summarizes the activity against respiratory viruses and their molecular targets by the different types of quinones (both natural and synthetic). Thus, the present work offers a general overview of the importance of quinones as an option for the future pharmacological treatment of viral respiratory infections, subject to additional studies that support their effectiveness and safety.

Keywords: influenza; SARS-CoV-2; naphthoquinone; anthraquinone; benzoquinone; antivirals; natural compounds; synthetic quinones

1. INTRODUCTION

Respiratory viruses are a group of pathogens that elicit upper or lower respiratory tract infections [1]. Upper respiratory tract infections affect the nasal cavity through the larynx and have common symptoms, such as cough, sore throat, nasal congestion, sneezing, rhinorrhea, sinus pain, myalgia, headache, fever, chills, and loss of appetite. Lower respiratory tract infections occur below the larynx and can also cause bronchitis, bronchiolitis, and pneumonia [2]. Human

respiratory viruses cause these symptoms after infecting and replicating in cells of the respiratory tract. Subsequently, these pathogens are transmitted mainly through the respiratory secretions of infected people by direct (physical) or indirect contact (contaminated objects or surfaces), as well as by droplets or aerosols [3,4].

Viral respiratory diseases represent an important problem for global public health with an enormous economic burden. These respiratory infections are among the most frequent illness in humans, mainly in children, older adults, and immunosuppressed people, making them the most vulnerable populations. In children and older adults, viruses cause 95% and 40% of all respiratory infections, respectively. In addition, respiratory tract infections are associated with significant mortality over the world. According to World Health Organization (WHO), in 2019 lower respiratory infections ranked fourth among the leading causes of death in the world, with 2.6 million deaths. WHO also ranked respiratory infections as the second leading cause of death worldwide in children <5 years of age, estimating 1.9 million deaths annually for complications related to acute respiratory infections [5-7]. Respiratory viruses include the parainfluenza viruses (PIVs), human metapneumoviruses (HMPVs), respiratory syncytial viruses (RSVs), adenoviruses (AdVs), rhinoviruses (RVs), bocaviruses (BoVs), influenza viruses, and coronaviruses (CoVs) [8]. The aim of this work was to describe the activity of quinones against respiratory viruses such as influenza viruses, CoVs, PIV, RSV, and HRV. Likewise, we review and summarize the properties of these compounds over the viral targets.

2. RESPIRATORY VIRUSES

2.1. Parainfluenza virus (PIV), human metapneumovirus (HMPV), and respiratory syncytial virus (RSV)

PIV, HMPV, and RSV are respiratory viruses belonging to the *Paramyxoviridae* family. These pathogens are enveloped viruses containing a non-segmented negative-sense single-stranded RNA (ssRNA) genome. Globally, these viral agents are characterized by causing significant morbidity and mortality, mainly among children in developing countries [9,10]. RSV is among the most important pathogens causing lower respiratory tract infections in childhood. However, immunosuppressed people and older adults are also at high risk of developing complications from RSV infections. There is a single RSV serotype with two antigenic subtypes (A and B), which circulate together but only one subtype predominates. Although RSV mortality is more common

in developing countries, the social and economic burden associated with this virus is high worldwide [11,12].

Human PIVs (HPIVs) include four serotypes (HPIV1-4) and represent one of the main causes of acute respiratory infections. These viruses affect people of all ages but cause lower respiratory tract infections that can lead to serious illness in infants and young children. HPIVs infection rates are highest in children <5 years of age, followed by patients >60 years of age. In healthy young adults, this disease is usually mild and restricted to the upper respiratory tract [13,14].

HMPVs include two genotypes (A and B) divided into five lineages (A1, A2a, A2b, B1, and B2). Similar to previous viruses, HMPVs cause respiratory infections of varying severity and circulate around the world throughout the year, but the epidemics caused by these pathogens predominate in spring and winter. From 1995 to 2016, 42,464 cases of infections were reported in countries such as Canada, United States, Mexico, Spain, Austria, Scotland, South Africa, South Korea, and Taiwan [15-17].

2.2. Adenovirus (AdV)

AdVs are non-enveloped icosahedral pathogens that possess a double-stranded DNA (dsDNA) genome and belong to the *Adenoviridae* family [18]. These viruses are divided into seven species (A to G) with 103 recognized types. Respiratory infections associated with human AdVs (HAdVs) are mainly caused by genera B (types 3, 7, 14, 21, and 55), C (types 1, 2, and 5), and E (types 4 and 41). Although most respiratory infections caused by these viruses are mild to moderate in severity, HAdV-B types 3, 7, 14, and 55 can cause severe infections and life-threatening outbreaks. In this sense, regional outbreaks of severe and fatal acute infections have been reported in Europe, Asia, and North America caused by HAdV-B7 or HAdV-B14 [17,19,20].

2.3. Rhinovirus (RV)

Human RVs (HRVs) belong to the *Picornaviridae* family and are non-enveloped viruses with positive-sense ssRNA. HRVs are classified into A, B, and C species, which have approximately 80, 32, and 57 types, respectively. RVs are among the most frequent respiratory viruses in humans, causing significant morbidity and high annual economic losses. These pathogens are responsible for the common cold and cause more than 50% of upper respiratory tract infections. Besides, HRVs are involved in lower respiratory illnesses such as pneumonia, bronchitis, and bronchiolitis, as well as exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and

asthma. These viruses circulate throughout the year and affect the entire world, although the highest peak of infections is observed in the autumn and declines in the summer, with HRV-A and HRV-C as the predominant species [21-23].

2.4. Bocavirus (BoV)

Recently, human BoVs (HBoVs) have appeared as new respiratory pathogens. These non-enveloped viruses are found in the *Parvoviridae* family and contain a linear negative- or positive-sense ssDNA genome. There are four types of HBoVs (HBoV1-4) and infections caused by these viral agents are more common during winter and spring, although they are present all year. HBoV infections are also present in people of all ages but are more frequent in children. Finally, although these viruses do not have a high global prevalence, fatal cases have been reported due to HBoV infections [24-26].

2.5. Influenza virus

Influenza viruses are another group of enveloped respiratory viruses that belong to the *Orthomyxoviridae* family and contain a genome consisting of negative-sense ssRNA segments. The *Orthomyxoviridae* family includes four types of influenza viruses (A to D). Influenza A and B viruses mainly affect humans, being responsible for annual seasonal epidemics. Influenza B infections are highly contagious and sometimes lead to severe illness. In contrast, influenza A infections are the most common and cause mild to severe respiratory illness. Influenza C viruses are the least common and produce milder infections compared to influenza A and B, while there are no reports of influenza D viruses infecting humans [27,28].

Influenza B viruses are divided into two lineages: B/Yamagata/16/88 and B/Victoria/2/87 (commonly known as B/Yamagata and B/Victoria, respectively). Influenza A viruses are classified considering the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) subtypes located on their surface. There are 18 HA subtypes (H1-18) and 11 NA subtypes (N1-11), but three HA and two NA subtypes have circulated in humans, appearing in the population as the pandemic strains H1N1, H2N2, and H3N2 [29-31]. In the past century, the 1918 "Spanish" influenza pandemic caused by an H1N1 strain (apparently derived from an avian source), the 1957 "Asian" influenza pandemic H2N2, and the 1968 "Hong Kong" influenza pandemic H3N2 (both emerging from reassortments between human and avian viruses) were responsible for 50 million, two million and one million deaths around the world, respectively [32,33].

Later, in 2009, a new influenza A(H1N1) virus with gene segments from strains of avian, porcine, and human viruses emerged. The respiratory diseases of this influenza A(H1N1)pdm09 strain were responsible for around 201,200 deaths and affected more than 214 countries, causing the first influenza pandemic of the 21st century [34-36]. On the other hand, avian influenza has emerged as a threat to poultry, causing great economic losses. In addition, there are highly pathogenic avian influenza viruses with the ability to infect other mammals, such as pigs and humans, posing a threat to global public health due to the risk of a potential pandemic. Several outbreaks of avian influenza in humans have recently been reported, which have been attributed to close contact with infected birds or to a contaminated environment, such as markets where live birds are sold [37,38]. Worldwide, since 2003, WHO has estimated 868 cases of human infections with avian influenza A(H5N1) virus in 21 countries, of which 457 resulted in fatal cases, while 1,568 cases of human infections and 616 deaths associated with the avian influenza A(H7N9) virus have been reported since 2013 [39].

Influenza B viruses have mutations and limited animal reservoirs, giving them relative stability. Nevertheless, the possibility of genetic modification and increased pathogenicity is always latent, with the consequent generation of a pandemic strain of influenza B [40]. Currently, seasonal influenza epidemics are caused by influenza A(H1N1), A(H3N2), and B viruses. Globally, these seasonal epidemics result in about 3-5 million cases of severe illness and 290,000-650,000 deaths [41].

2.6. Coronavirus (CoV)

CoVs are enveloped viruses with a non-segmented positive-sense ssRNA. These viruses belong to the *Coronaviridae* family and are divided into four genera (alpha, beta, gamma, and delta CoVs). Gamma and delta CoVs cause avian CoV infections (birds are the natural reservoirs of these viruses), whereas mammalian CoV diseases are mainly associated with alpha and beta CoVs (bats and rodents are the natural reservoirs). There are seven human CoVs (HCoVs) that cause infections, four of which (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, and HCoV-HKU1) cause mild seasonal respiratory tract diseases around the world. In contrast, three highly pathogenic HCoVs have been identified this century: severe acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV), and severe acute respiratory syndrome CoV 2 (SARS-CoV-2) [42-44].

In November 2002, SARS-CoV caused the first coronavirus epidemic. This virus originating from China caused more than 8,000 cases of respiratory infections and 774 deaths in 30 countries on all continents, until its containment in July 2003. Subsequently, MERS-CoV gave rise to another epidemic in September 2012, which started in Saudi Arabia and spread to 27 countries, causing more than 2,500 cases of infections and 866 deaths [45-47].

Finally, in December 2019, a new coronavirus was identified, which was responsible for an outbreak of pneumonia in Wuhan, China. This virus (different from SARS-CoV and MERS-CoV) was named SARS-CoV-2 according to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and the WHO has named coronavirus disease 2019 (COVID-19) the illness caused by this viral agent [48,49]. In the following months, SARS-CoV-2 transmission accelerated, and COVID-19 spread to several countries, with infections ranging from asymptomatic or mild upper respiratory tract illness to pneumonia and acute respiratory distress syndrome. So, the WHO officially declared the global outbreak of COVID-19 a pandemic on March 11, 2020 [50-52]. On December 16, 2022, the WHO reported over 647 million confirmed cases of COVID-19 and more than 6.6 million deaths worldwide [53].

3. PHARMACOLOGICAL TREATMENTS FOR RESPIRATORY VIRUS INFECTIONS

Viral respiratory infections represent one of the main causes of medical consultations in the world, so the prevention and treatment of these diseases remain an important objective. Antiviral therapy drugs prevent the activity of viral proteins involved in the multiple stages of the replication cycle of respiratory viruses, such as structural proteins or replication enzymes [54-56]. Antiviral drugs also play an important role in the prophylaxis and treatment of influenza infections. Ion channel protein (M2) blockers, NA inhibitors, and viral polymerase inhibitors are the three classes of antivirals approved for clinical use. The first drugs licensed for influenza treatment were adamantanes (amantadine and rimantadine), which act by blocking M2 ion channels. Nevertheless, adamantanes are only effective against influenza A viruses, and even resistant strains to these therapeutic agents have emerged, which are still in circulation. Therefore, adamantanes are no longer recommended in therapy against this disease [57,58].

Currently, the only class of antivirals appropriate for influenza therapy is NA inhibitors (oseltamivir, zanamivir, peramivir, and laninamivir). Although these drugs can inhibit all NA types and subtypes of influenza viruses by binding to the catalytic site of the enzyme, influenza A and B viruses resistant to NA inhibitors have also recently emerged [59,60]. In addition, viral polymerase

inhibitors have emerged as novel compounds in influenza treatment. These drugs are baloxavir marboxil, favipiravir, and pimodivir. Some research has demonstrated that polymerase inhibitors have greater clinical efficacy compared to NA inhibitors. However, it has recently been shown that both baloxavir and pimodivir would be associated with the emergence of new viral variants that are not very susceptible to these antivirals [29,61].

On the other hand, aerosolized ribavirin is the only antiviral drug licensed for the treatment of RSV infections, although its use is limited due to issues with efficacy, toxicity, and cost. Therefore, this drug has only been employed for the treatment of life-threatening infections in immunosuppressed patients. The use of ribavirin has not caused a significant decrease in mortality or duration of hospitalization in patients with RSV disease, so other alternatives for the treatment of RSV infections are being explored, but it will be several years until they are approved [62].

Unlike the previous viruses, there are currently no specific drugs approved for the prophylaxis and therapy of infections by HPIVs, HMPVs, HAdVs, HRVs, and HBoVs. In many cases, management of infections by these pathogens consists of supportive care to control symptoms or the off-label use of broad-spectrum antiviral agents, such as ganciclovir, cidofovir, or ribavirin for the treatment of HAdVs infections [63-67].

Likewise, there are no specific, effective, and clinically proven antiviral drugs against SARS-CoV and MERS-CoV, so therapy in patients infected with these viruses consists of supportive care, sometimes supplemented with different combinations of drugs. However, the efficacy of these treatments in SARS-CoV and MERS-CoV diseases remains unproven [68,69]. In this sense, although various research groups have made great efforts to develop an effective and safe treatment against COVID-19, a specific antiviral agent for the therapy of the disease caused by the novel SARS-CoV-2 has not yet been discovered [70]. Different studies have demonstrated that the drugs initially proposed for the treatment of COVID-19 are not effective against this disease, such as hydroxychloroquine, lopinavir/ritonavir, and ribavirin. Recently, Pfizer developed an antiviral drug called PF-07321332 (nirmatrelvir), which is an inhibitor of the 3C-like protease (3CL^{pro}, also known as main protease or M^{pro}) from SARS-CoV-2. The combination of nirmatrelvir and ritonavir (commercially known as PAXLOVID™) has been reported to reduce hospitalizations by 89% after administration within three days after symptom onset according to a phase II/III clinical trial [71,72]. Nevertheless, the development of additional effective and specific antivirals against SARS-CoV-2 proteins is important to provide therapies that reduce the severity of COVID-19, decrease the spread of the viral agent, and combat future pandemic CoVs [73,74]. The

chemical structures of the different drugs used in the treatment of respiratory viral infections are shown in Figure 1.

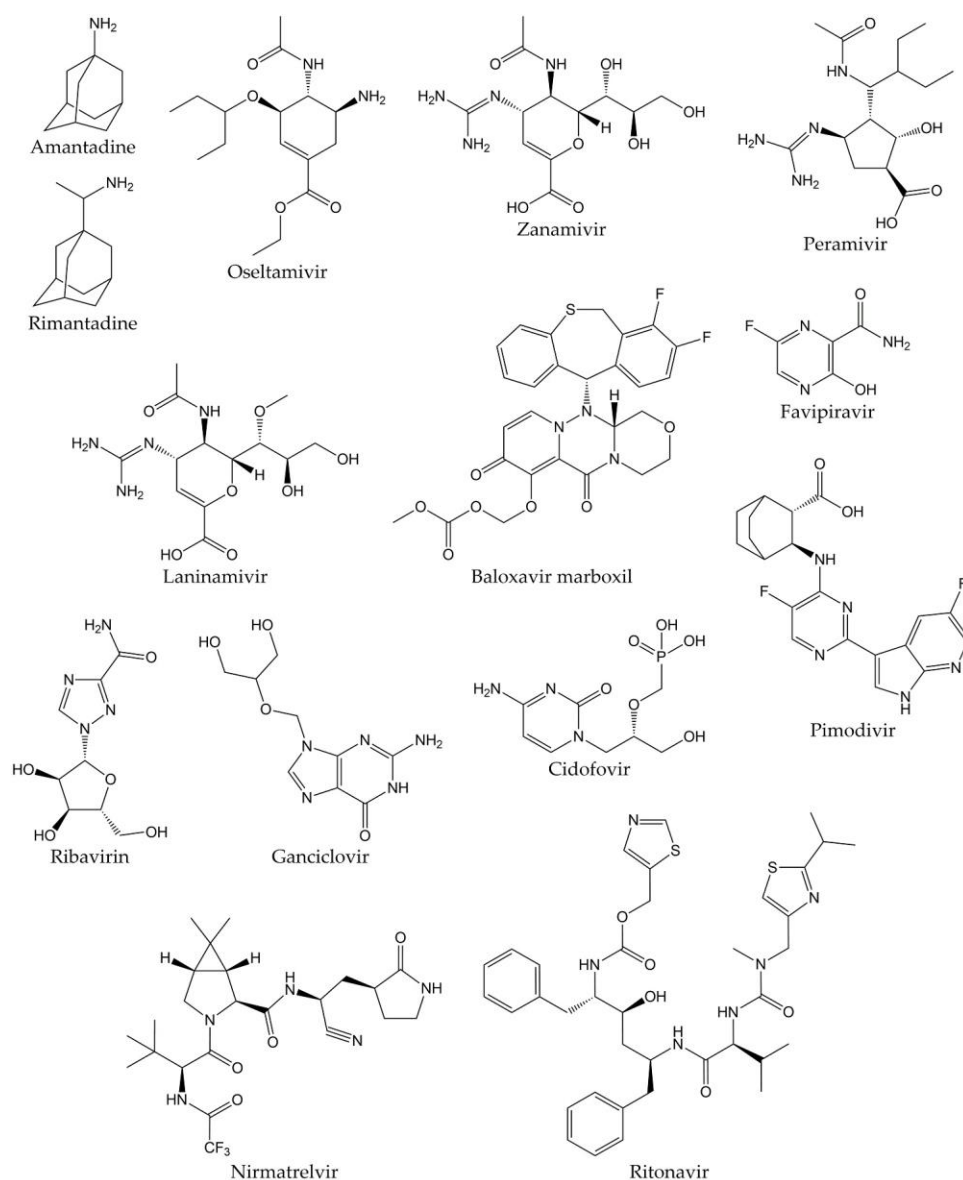


Figure 1. Chemical structures of antivirals against respiratory viruses.

Thus, the relatively limited number of approved antiviral drugs, the emergence of viral strains with resistance mutations to these therapeutic agents, and the associated side effects have increased the need to develop new alternative antiviral drugs. Antiviral strategies involve the search for molecules that block the stages of the viral lytic cycle, such as attachment and entry to the host cell, replication, transcription, and translation. Natural products isolated from plants and other sources have emerged as an important resource of biologically active compounds with novel

chemical structures, which have shown activity against several molecular targets of respiratory viruses [75-77]. Likewise, structural modification and chemical synthesis have emerged as additional strategies for the development of these natural products, as well as known and newly derived compounds [78,79]. Among the molecules with activity against respiratory viruses are alkaloids, flavonoids, glycosides, lignans, polyphenols, saponins, and terpenoids. Of particular note, various studies have reported that quinones also possess biological properties over respiratory viruses [80-82].

4. QUINONES

Quinones are molecules comprised of a basic benzoquinone chromophore, which is an unsaturated cyclic structure with two carbonyl groups. These compounds can be classified into three main classes: benzoquinones, naphthoquinones, and anthraquinones. As previously described, the benzoquinone-type structure forms the basic unit of quinones. Therefore, benzoquinones serve as an important building block in quinone biosynthesis. In nature, benzoquinones are found in flowering plants, fungi, lichens, and insects [83].

On the other hand, naphthoquinones are molecules structurally related to naphthalene. Naphthoquinone structure consists of a benzene ring linked to conjugated cyclic diketone, with the two carbonyl groups arranged in the *para* orientation (1,4-naphthoquinones) and rarely in the *ortho* orientation (1,2-naphthoquinones) [84,85]. It has been reported that 1,4-naphthoquinones can act as electrophiles in Michael-type additions due to the presence of a highly electron-deficient double bond in their structure [86]. Considering that the tautomeric forms of 1,4-naphthoquinones (named 1,4-naphthohydroquinones or 1,4-dihydroxynaphthalenes) can act as nucleophiles and couple with their corresponding naphthoquinones, dimeric naphthoquinones can also be found in nature [87]. Naphthoquinones are biosynthesized by a wide variety of organisms, including plants and fungi. Biosynthetic pathways include the *o*-succinylbenzoate pathway, the phenylpropanoid/mevalonic acid (MVA) pathway, the homogentisate/MVA pathway, the acetate-malonate pathway, and the futasine pathway. The 1,4-naphthalenoid ring of biosynthesized naphthoquinones is usually linked to one or more -CH₃, -OH, and/or -OCH₃ groups and, in some compounds, to a liposoluble side chain [88,89].

The third class of quinones is anthraquinones, which are compounds derived from anthracene. The structure of anthraquinones is comprised of a planar three-ring aromatic system, with two carbonyl groups in the central ring. So, the basic structure of these molecules is known as 9,10-

anthracenedione or 9,10-dioxoanthracene [83,90]. Among the natural quinones, anthraquinones are the largest group with about 700 reported compounds. Most of these molecules have been isolated from plants, lichens, and fungi, although they are also distributed in microorganisms, insects, and animals [91,92]. However, these organisms use different biosynthetic pathways for the production of anthraquinones. For example, plants employ the shikimate and acetate-malonate pathways for the synthesis of these compounds. In contrast, fungi use the acetate-malonate pathway primarily for the synthesis of polyketide precursors. In nature, these quinone-type compounds can be found in either free or glycosidic forms. Likewise, anthraquinones can have various substituents such as $-CH_3$, $-OCH_3$, $-OH$, $-CHO$, $-COOH$, $-CH_2OH$, and/or more complex groups. Anthraquinone derivatives include hydroanthraquinones (compounds obtained by the reduction of double bonds in the benzene ring), anthrols (analogs with one $-OH$ group in the central ring), anthrones (derivatives with one carbonyl group in the central ring), dimeric anthraquinones, and naphthodianthrones [93-95]. The chemical structures of the different types of quinones are represented in Figure 2.

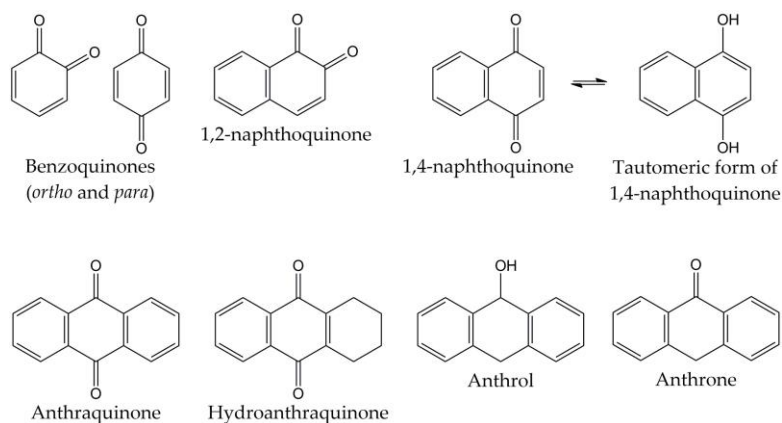


Figure 2. Chemical structures of the different types of quinones.

Quinones have interesting chemical and pharmacological properties. These molecules can undergo one- and two-electron reductions, generating semiquinones and hydroquinones, respectively. Subsequently, these structures can be oxidized and form quinones again, generating a cyclic redox system with the production of cytotoxic reactive oxygen species (ROS). Thus, quinones participate in various biological processes such as oxidative reactions and electron transport during metabolic pathways [96,97].

In addition, quinones are considered primary structures, since they have shown a wide variety of biological activities. Considering this, the quinone-type structure has been useful for the design

and synthesis of new compounds with potential pharmacological properties. Hence, as primary structures, quinones and their derivatives could serve as active and selective ligands for multiple biological targets. The wide range of quinone biological properties covers anti-inflammatory, immunomodulatory, cardioprotective, hepatoprotective, neuroprotective, antiseizure, anticancer, antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral activities. Several investigations have reported that quinones possess bioactivity over numerous viruses such as hepatitis B and C, dengue, herpes simplex, human immunodeficiency virus (HIV), coxsackievirus A16 (CVA16), and poliovirus. Finally, the activity of different types of quinones (both natural and synthetic) against respiratory viruses and their molecular viral targets has also been described, including various strains of influenza viruses and CoVs [81,82,98-100].

5. QUINONES AND RESPIRATORY VIRUSES

Several studies have exhibited the inhibitory properties of the different types of quinones against a wide variety of respiratory viruses and their molecular targets. These investigations focused on the activity of naphthoquinones, anthraquinones, and other quinone-type derivatives against influenza A and B viruses. Likewise, quinones also showed inhibitory properties against CoVs (SARS-CoV and SARS-CoV-2) and respiratory viruses such as PIV, RSV, and HRV. The antiviral activities of all types of quinones are summarized in Table 1 and fully described in the following sections.

Table 1. Quinones with activity against respiratory viruses and their protein viral targets.

Compound(s)	Source	Virus/Target	Effect	Ref.
Rhinacanthins C (1), D (2), N (3), and Q (4)	<i>Rhinacanthus nasutus</i> roots	A/PR/8/34 (H1N1) HRV-1B	IC ₅₀ = 0.30-23.7 µM IC ₅₀ = 0.24-5.35 µM	[101]
2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone (5), emodin (30), physcion (32), emodin-1-O-β-D-glucopyranoside (34), physcion-8-O-β-D-glucopyranoside (46), emodin-8-O-β-D-glucopyranoside (47)	<i>Polygonum cuspidatum</i> roots	NA (<i>Clostridium perfringens</i>)	IC ₅₀ = 0.43->200 µM	[102]
Shikometabolins E (6) and F (7)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> roots	NA (<i>C. perfringens</i>)	IC ₅₀ = 1.91 and 2.79 µg/mL (6 and 7)	[103]

Shikonin (8), acetylshikonin (9), isobutylshikonin (10), deoxyshikonin (11), β,β - dimethylacrylshikonin (12), β - hydroxyisovalerylshikonin (13)	<i>L. erythrorhizon</i> roots	NA (<i>C. perfringens</i>) NA (A/Bervig_Mission/1/18 H1N1)	IC ₅₀ = 1.9-63.4 μ M [104]
Lapachol (14), mompain (15), quambalarine B (16)	<i>Quambalaria</i> <i>cyanescens</i> fungus (15 and 16) and commercial compound (14)	PA (A/California/07/09 H1N1)	IC ₅₀ = 0.29-19 μ M Interaction of 16 with PA (<i>in silico</i>) [105]
Juglone (17)	Not given	HA and NA (H5N1)	Interaction with proteins (<i>in silico</i>) [106]
Plumbagin (18)	Not given	HA, NA, and M2 (A/2009 H1N1)	Interaction with proteins (<i>in silico</i>) [107]
Zeylanone epoxide (19)	<i>Diospyros anisandra</i> stem bark	A/Yucatan/2370/09 (H1N1)pdm A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1-H275Y)pdm A/Sydney/5/97 (H3N2) B/Yucatan/286/10 NP (H1N1 and H3N2)	IC ₅₀ = 0.65-2.77 μ M Decrease of RNA and inhibition of nuclear NP export [108]
Substituted naphthoquinones (20 and 21)	Synthesis	Influenza A virus	Inhibition of 52% and 50% (20 and 21) [109]
Fluoride derivative (24)	Synthesis	A/IOWA/15/30 (H1N1)	Inhibition of 35% [110]
Dimeric derivatives (26a-m)	Synthesis	NA (<i>C. perfringens</i>) NA (H5N1)	Inhibition of 70.9- 96.6% IC ₅₀ = 29 and 26.5 μ M (26a and 26b) Interaction of 26b with NA (<i>in silico</i>) [111]
Esterified derivative of 8 (27)	Synthesis	Infected A549 and MDCK cells A/PR/8/34 (H1N1)	CC ₅₀ = 316 and 730 μ g/mL [112]

		NA and NP (H1N1)	Reduction of viral yield Interaction of 27 with NA (<i>in silico</i>) Decrease of NP mRNA levels	
Aloe-emodin (28), emodin acetate (29)	<i>Cassia roxburghii</i> leaves	AWSN/33 (H1N1)	IC ₅₀ = 2.00 and 10.23 µg/mL (28 and 29)	[113]
Compounds 28 , 30 , chrysophanol (31)	Not given	A/Taiwan/CMUH01/07 (H1N1)	Reduction of CPE Up-regulation of galectin-3	[114]
Compounds 30 , 32 , polygodoquinone A (33)	<i>Polygonatum odoratum</i> roots	AWSN/33 (H1N1)	IC ₅₀ = 2.3-11.4 µM	[115]
Compounds 28 , 30 , 32 , 34 , chrysophanol 8-O-glucoside (35), rhein 8-glucoside (36), aloe-emodin-8-O-β-D-glucopyranoside (37)	Commercial compounds	A/PR/8/34 (H1N1)		
		A/ShanTou/16/09 (H1N1)	Inhibition of A/PR/8/34 (H1N1)	
		A/ShanTou/1233/06 (H1N1)	activity at 12.5-25 µg/mL (all compounds)	
		A/ShanTou/602/06 (H3N2)	Inhibition of influenza A viruses activities at 6.25-25 µg/mL (30)	[116]
		A/ShanTou/364/05 (H3N2)		
		A/Quail/HongKong/G1/97 (H9N2)	Regulation of several markers of PPARα/γ-AMPK pathway and fatty acid metabolism (30)	
Compound 30	Commercial compound	A/Chicken/Guangdong/A1/03 (H9N2)		
		A/Chicken/Guangdong/1/05 (H5N1).		
			EC ₅₀ = 4.25 µg/mL Regulation of several markers involved in oxidative stress, inflammation, and	[117]

			different signaling pathways during influenza infection	
6-O-demethyl-4-dehydroxyaltersolanol A (38), 4-dehydroxyaltersolanol A (39), altersolanol B (40)	<i>Nigrospora</i> sp. YE3033 from <i>Aconitum carmichaeli</i> root	A/PR/8/34 (H1N1)	IC ₅₀ = 2.59-8.35 µg/mL	[118]
Rhein (41)	Commercial compound	A/ShanTou/169/06 (H1N1)	EC ₅₀ = 1.51 µg/mL Regulation of several markers involved in oxidative stress, inflammation, and different signaling pathways during influenza infection	[119]
Derivatives of aloesaponarin-I 42 (44 and 45)	Synthesis	A/Yucatan/2370/09 (H1N1) A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1)	IC ₅₀ = 13.70-62.28 µM Decrease of viral yields	[120]
Hypericin (48)	Commercial compound	A/Brazil	Virucidal effect at 3.12-50 µg/mL	[121]
Compound 48 , dibromohypericin (49), tetrabromohypericin (50), gymnochrome B (51)	Commercial (48), synthetic (49 and 50), and natural (51) compounds	Influenza A virus strain	MIC ₁₀₀ = <5-250 nM	[122]
1,4-hydroquinone (52)	<i>Elaeocarpus tonkinensis</i> leaves	A/PR/8/34 (H1N1) A/HongKong/8/68 (H3N2) B/Lee/40	EC ₅₀ = 19.7-54.3 µg/mL	[123]
<i>tert</i> -butylhydroquinone (53)	Not given	H14 HA (A/mallard/Astrakhan/26 3/82)	Interaction with HA (<i>in silico</i>)	[124]

Compound 53 , <i>tert</i> -butylbenzoquinone (54)	Commercial compounds	Pseudovirus expressing H7 HA	IC ₅₀ = 6 and >50 µM (53 and 54) Interaction of 53 with HA (<i>in silico</i>)	[125]
Embelin (55)	<i>Embelia ribes</i> fruits	A/PR/8/34 (H1N1) A/California/07/09 (H1N1)pdm A/Vladivostok/02/09 (H1N1) A/Aichi/2/68 (H3N2) A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) B/Malaysia/2506/04 HA (H5N2)	IC ₅₀ = 0.1-0.6 µM Hemagglutination inhibitory effect (titer 1:32) Interaction with HA (<i>in silico</i>)	[126]
Compound 28	Commercial compound	3CL ^{pro} (SARS-CoV)	IC ₅₀ = 132 and 366 µM	[127]
Compounds 30 and 41	Commercial compounds	S protein (SARS-CoV) Pseudovirus expressing S protein	IC ₅₀ = 200 µM Inhibition of interaction Reduction of infectivity	[128]
Compound 30	Commercial compound	3a protein (SARS-CoV and HCoV-OC43)	Inhibition of viruses release	[129]
Tanshinone I (56), tanshinone IIA (57), tanshinone IIB (58), methyl tanshinonate (59), cryptotanshinone (60), dihydrotanshinone I (61), rosmariquinone (62)	<i>Salvia miltiorrhiza</i> roots	3CL ^{pro} (SARS-CoV) PL ^{pro} (SARS-CoV)	IC ₅₀ = 0.8-226.7 µM	[130]
Celastrol (63), pristimerin (64), tingenone (65), iguesterin (66), dihydrocelastrol (67)	<i>Triterygium regelii</i> bark (63 , 64 , 65 , and 66) and synthetic compound (67)	3CL ^{pro} (SARS-CoV)	IC ₅₀ = 2.6-21.7 µM Interaction with 3CL ^{pro} (<i>in silico</i>)	[131]

Compounds 30 , 55 , vitamin K1 (68), coenzyme Q10 (69), methylprednisolone (70), dexamethasone (71)	Not given	3CL ^{pro} (SARS-CoV-2)	Interaction with 3CL ^{pro} (<i>in silico</i>)	[132]
Compound 63	Commercial compound	3CL ^{pro} (SARS-CoV-2)	Interaction with 3CL ^{pro} (<i>in silico</i>)	[133]
Clovamide derivatives (72 , 73 , 74)	Not given	3CL ^{pro} (SARS-CoV-2)	Interaction with 3CL ^{pro} (<i>in silico</i>)	[134]
Terrequinone A (75), zeylanone (76), carminic acid (77)	Not given	3CL ^{pro} (SARS-CoV-2)	Interaction with 3CL ^{pro} (<i>in silico</i>)	[135]
Compound 17 , 7-methyl juglone ethyl acetate (78), 5- (benzyloxy)-7-methyl-1,4- naphthoquinone (79), propionyl juglone (80), 1,4- naphthoquinone (81), 2-acetyl- 8-methoxy-1,4-naphthoquinone (82)	Synthetic compounds	3CL ^{pro} (SARS-CoV-2) SARS-CoV-2	IC ₅₀ = 72.07-220.9 nM (78-82) Interaction with 3CL ^{pro} (<i>in silico</i> ; 17 , 80 , 82) Inhibition of SARS- CoV-2 (82 ; EC ₅₀ = 4.55 µM)	[136]
Compounds 28 , 30 , 31 , 32 , 41	Compounds present in herbal formulations	Pseudo-typed SARS- CoV-2	Inhibition of infectivity	[137]
Compounds 30 , 48 , emodin anthrone (84), emodin bianthrone (85)	Not given	PIV type-3	Reduction of viral titer	[138]
Compound 30	<i>Rheum palmatum</i>	RSV	Reduction of CPE Inhibition of RSV activity	[139]
Vitamin E quinone (86)	<i>Celastrus hindsii</i> stems	RSV A2	IC ₅₀ = 3.13 µM	[140]
Derivatives 87 and 88	Compounds reported in the Korea Chemical Bank	Recombinant 3C ^{pro} (HRV) 3C ^{pro} from HRV-14	IC ₅₀ = 0.85 and 8.4 µM (87 and 88) Interaction with 3C ^{pro} from HRV-14 (<i>in silico</i>)	[141]

IC₅₀: Mean inhibitory concentration. CC₅₀: Mean cytotoxic concentration. EC₅₀: Mean maximal effective concentration. MIC₁₀₀: Minimum 100% inhibitory concentration. NA: Neuraminidase. HA: Hemagglutinin. M2: Ion channel protein. PA: Polymerase acidic. NP: Nucleoprotein. CPE: Cytopathic effect. S protein: Spike protein. 3CL^{pro}: 3C-like protease. PL^{pro}: Papain-like cysteine protease.

5.1. Quinones with activity against influenza viruses

Various studies have reported the anti-influenza activity of naphthoquinone-type molecules isolated from different natural sources. The chemical structures of these natural quinones (compounds 1-19) are shown in Figure 3.

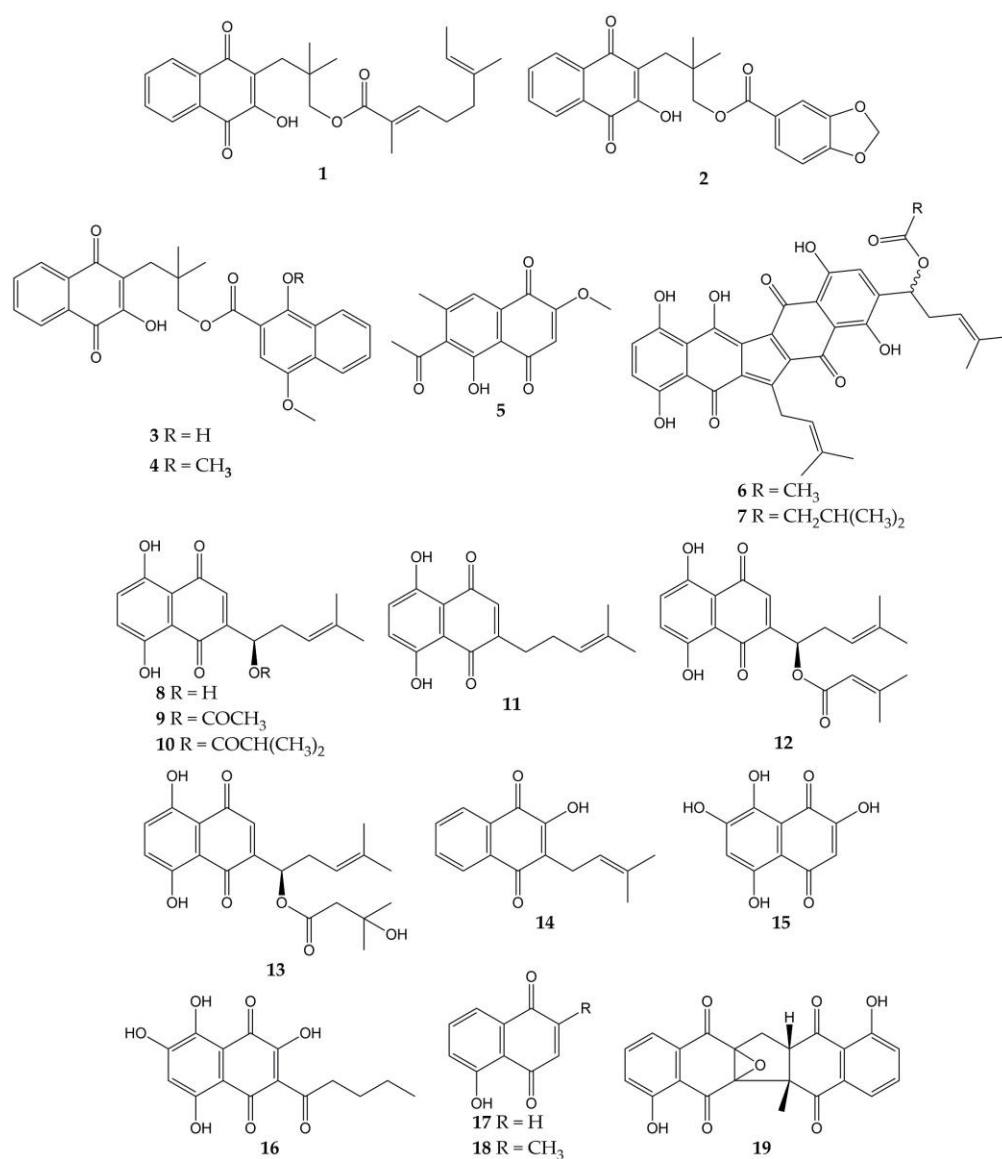


Figure 3. Chemical structures of natural naphthoquinones 1-19.

The antiviral activity of rhinacanthins C (**1**), D (**2**), N (**3**), and Q (**4**) from the roots of *Rhinacanthus nasutus* (a medicinal plant belonging to the Acanthaceae family and employed for the treatment of herpes virus infections) was assessed in infected cells. All compounds inhibited the activity of the influenza virus A/PR/8/34 (H1N1), with mean inhibitory concentration (IC₅₀) values of 0.30, 0.95, 1.95, and 23.7 μ M for **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively. Previously, the molecules did not show significant cytotoxicity in Vero cells, with mean cytotoxic concentration (CC₅₀) values of 25.89 (**1**) and >50 μ M (**2**, **3**, and **4**) [101].

Other works have investigated the potential of naphthoquinones in the inhibition of influenza virus molecular targets like the NA, a viral surface glycoprotein that facilitates the release of the newly synthesized virions from the host cell surface by removing sialic acids [142]. This enzyme is not specific to viruses and is also found in bacteria. Both bacterial and viral NAs recognize terminal sialic acid residues on the surface of host cells and cleave the α -2,3 glycosidic bonds of these residues. Therefore, some research groups use *in vitro* assays with NA from bacterial sources (for example, *Clostridium perfringens*) in the search for compounds with antiviral activity and employed tests with substrates that are recognized by viral and bacterial NAs. However, caution must be exercised when comparing the IC₅₀ values obtained in inhibition assays with both sources [143,144].

The monomeric naphthoquinone 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone (**5**) obtained from the roots of *Polygonum cuspidatum* (a Chinese medicinal herb from the Polygonaceae family with various uses) evidenced an inhibitory activity on NA from *C. perfringens*, with IC₅₀ of 8.9 μ M [102]. In another research, the anti-NA activity of shikometabolins E (**6**) and F (**7**) was evaluated. The results showed that these dimeric naphthoquinones isolated from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* (a perennial herb from the Boraginaceae family with red pigments that are used as dyestuffs in different products) inhibited the functions of the NA from *C. perfringens*, with IC₅₀ values of 1.91 μ g/mL for **6** and 2.79 μ g/mL for **7** [103]. *L. erythrorhizon* roots also contain 1,4-naphthoquinones such as shikonin (**8**) and its derivatives acetylshikonin (**9**), isobutylshikonin (**10**), deoxyshikonin (**11**), β,β -dimethylacrylshikonin (**12**), and β -hydroxyisovalerylshikonin (**13**). These molecules were tested in two NA inhibition assays with sialidases from glycosyl hydrolase (GH) family 33 (*C. perfringens*) and GH34 (influenza virus A/Bervig_Mission/1/18 H1N1). All the natural products exhibited inhibitory activity over the bacterial NA, with IC₅₀ of 53.8 (**8**), 2.5 (**9**), 2.9 (**10**), 27.5 (**11**), 1.9 (**12**), and 3.4 μ M (**13**). Likewise, these naphthoquinones inhibited the activity of recombinant viral sialidase, with IC₅₀ of 34.1 (**8**), 41.4 (**9**), 40.5 (**10**), 63.4 (**11**), 47.3 (**12**), and 40.5 μ M (**13**) [104].

In addition to NA glycoprotein, several investigations have explored the potential effect of naphthoquinones on other viral targets, either in computational tests or *in vitro* experiments. One of these targets is the PA (polymerase acidic) subunit of viral RNA polymerase, which contains an endonuclease active pocket in its N-terminal domain that participates in viral transcription and replication [145]. Recent work revealed the inhibitory activity of some molecules over N-terminal domain of the influenza A virus PA subunit (the protein was obtained from coding RNA DNA of viral strain A/California/07/09 H1N1) in a novel assay based on AlphaScreen technology (amplified luminescent proximity assay system). Among the evaluated compounds, an endonuclease inhibition was reported by lapachol (**14**), as well as mompain (**15**) and quambalarine B (**16**) obtained from the fungus *Quambalaria cyanescens* (IC₅₀ values of 19, 0.43, and 0.29 μ M, respectively). In the same study, an X-ray crystallography test evidenced that **16** binds to the N-terminal domain of the PA protein through its 7,8-dihydroxynaphthoquinone moiety and ketone moiety [105].

On the other hand, flexible docking and molecular dynamic simulations have demonstrated that juglone (**17**) was able to interact with active sites of the NA and HA (the most abundant glycoprotein on the viral surface; HA initiates infection by recognizing host cell-surface glycoconjugates with sialic acid as receptors and then by HA-mediated fusion of viral and host cellular membranes). The 2-cyclohexene-1,4-dione moiety of **17** bound to HA from the influenza A(H5N1) virus through hydrophobic interactions with residues Ile155, His183, and Tyr195. The 2-cyclohexene-1,4-dione ring was also bound to NA key binding site residues (Arg156 and Arg292) via electrostatic interactions. Besides, a strong H-bond interaction between the -OH group of **17** and the carboxylate group of Glu276 was observed [106,146,147]. According to *in silico* studies, plumbagin (**18**) can also bind specifically to the active sites of HA and NA proteins of influenza virus A/2009 (H1N1), as well as the M2 ion channel protein, which is involved in the virion entry and assembly of new infectious particles [107,148].

Likewise, our research group has contributed to the knowledge about the antiviral properties of naphthoquinones by isolating the zeylanone epoxide (**19**) and evaluating its activity against influenza A and B viruses. Secondary metabolite **19** was obtained from the stem bark of *Diospyros anisandra*, an endemic plant of the Yucatan Peninsula rich in quinone-type compounds, belonging to the Ebenaceae family and employed in traditional Mayan medicine for the treatment of skin problems [149]. Subsequently, *in vitro* assays showed that this dimeric naphthoquinone has no significant cytotoxicity on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells at concentrations $\leq 12.5 \mu$ M (CC₅₀ of 21.70 μ M) and has activity against four influenza viruses: A/Yucatan/2370/09 (H1N1)pdm

(IC₅₀ of 0.65 μ M), A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1-H275Y)pdm (IC₅₀ of 2.77 μ M), A/Sydney/5/97 (H3N2; IC₅₀ of 1.6 μ M), and B/Yucatan/286/10 (IC₅₀ of 2.22 μ M). Then, time-of-addition experiments were used to establish the replication cycle stage at which **19** acts. The results suggested that compound **19** could act either by direct binding to the virus or by blocking some stage after viral adsorption [108].

Finally, zeylanone epoxide **19** caused a decrease in the number of gene segment copies that encodes the viral nucleoprotein (NP). Therefore, the effect of **19** on the NP intracellular distribution was evaluated by indirect immunofluorescence assays (IFA) at 4, 6, and 8 h after infection with influenza A(H1N1) and A(H3N2) viruses. The results indicated that NP remained in the nucleus of the infected cells. However, the number of infected cells was lower in infection with influenza A(H1N1) viruses than A(H3N2) viruses [108]. NPs are important viral proteins since they confer stability to the viral ribonucleoprotein particles (vRNPs) and participate in their transport. In addition, since NP is the major protein component of vRNPs, the distribution of this viral protein functions as a localization marker for vRNPs, since NP is found predominantly in the nucleus of infected cells in the early stages of infection. In the late stages of infection, NP accumulates in large amounts in the cytoplasm [150-152]. Considering this, the authors highlighted that **19** could inhibit the formation of daisy-chain complexes, interrupting the export of vRNPs to the cytoplasm. Nevertheless, the investigation concluded that the evaluation of other proteins involved in the transport of vRNPs and their interaction with **19** is necessary [108].

Several studies have focused on the synthesis of naphthoquinones and the evaluation of their activity against influenza viruses. The structures of the anti-influenza synthetic naphthoquinones **20-27** are represented in Figure 4.

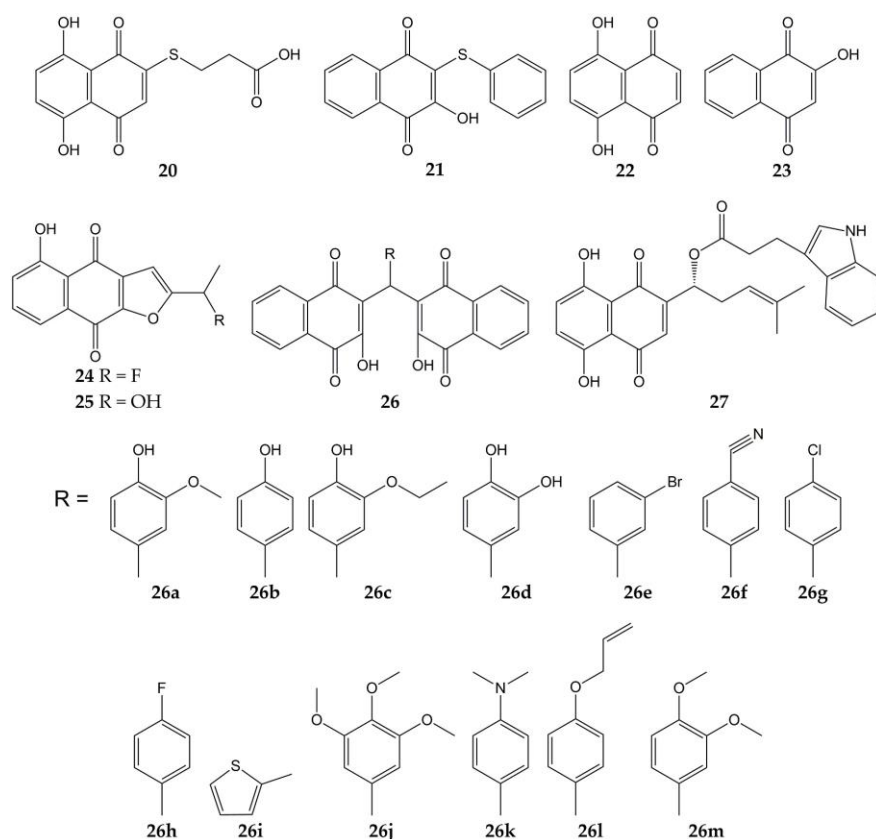


Figure 4. Chemical structures of synthetic naphthoquinones **20-27**.

Synthetic naphthoquinone derivatives **20** and **21** (2-substituted- and 2,3-disubstituted-1,4-naphthoquinones) were obtained from naphthazarin (**22**; a natural product present in plants of the families *Boraginaceae*, *Droseraceae*, and *Nepenthaceae*) and lawsone (**23**; a secondary metabolite found in leaves and flowers of *Lawsonia inermis*), respectively. Both synthetic compounds showed *in vitro* antiviral activity against a strain of influenza A virus (52% for **20** and 50% for **21**) [109,153]. Another molecule with anti-influenza activity is **24**, which was synthesized starting from **25** (a natural compound from *Tabebuia avellanae*). The fluoride-derivative **24** inhibited the infection of MDCK cells by swine influenza virus A/Iowa/15/30 (H1N1), with 35% of inhibition [110].

In another research, 3,3'-(arylmethylene)bis(2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) analogs (**26a-m**) were synthesized from **23** and substituted aromatic aldehydes. These dimeric derivatives were evaluated with *in vitro* assays against two NA (*C. perfringens* and influenza A H5N1 virus). All molecules inhibited bacterial NA (percentages of inhibition ranging from 70.9 to 96.6%). Then, the ten analogs with percentages of inhibition >80% were assessed in viral NA inhibition assay;

molecules **26a** and **26b** exhibited the lowest IC₅₀ values (29 and 26.5 μ M, respectively). Further, the docking simulation evidenced that compound **26b** interacts with amino acids of binding pocket from the NA of influenza A(H5N1) virus through H-bonds with Arg118, Arg371, Tyr406, Glu277, Asp151, and Arg152, as well as hydrophobic interactions with Tyr347 [111].

Likewise, the synthesis and antiviral activity of (R)-1-(5,8-dihydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-4-methylpent-3-en-1-yl-3-(1H-indol-3-yl) propanoate (**27**) has been reported. This esterified derivative of **8** promoted cell viability in A549 (human lung carcinoma) and MDCK cells infected with influenza virus A/PR/8/34 (H1N1), with CC₅₀ values of 316 and 730 μ g/mL, respectively. Compound **27** also reduced viral yield and inhibited influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) replication in a dose-dependent manner. Then, the authors evaluated the effect of the synthesized naphthoquinone on other viral targets and found that **27** inhibited the viral NA activity. Molecular docking analysis showed that **27** can bind specifically to the active site of NA through H-bond interactions with the -NH groups of Arg118, Arg152, and Arg371, and the -OH group of Glu227. Finally, **27** caused a decrement in expression levels of viral NP mRNA in infected cells [112,154].

The anti-influenza activity of several anthraquinones has also been investigated. The structures of these molecules (anthraquinones **28-47**) are shown in Figure 5.

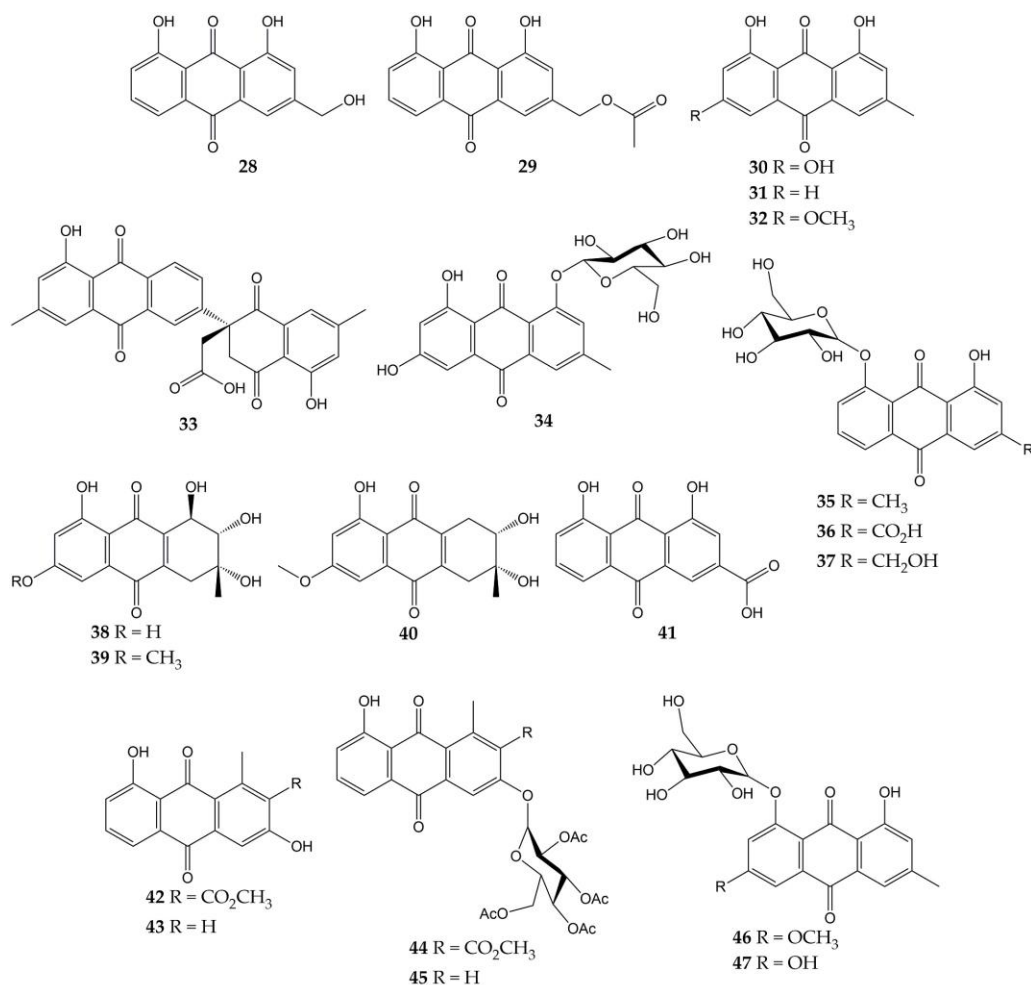


Figure 5. Chemical structures of natural and synthetic anthraquinones **28-47**.

In a previous study, the antiviral activity of aloe-emodin (**28**) and aloe-emodin acetate (**29**) was evaluated in infected MDCK cells. These anthraquinones were isolated from the leaves of *Cassia roxburghii* (a medicinal plant from the Fabaceae/Leguminosae family employed due to its laxative and purgative properties) and the results evidenced an inhibitory activity against influenza virus A/WSN/33 (H1N1), with IC₅₀ values of 2.00 (**28**) and 10.23 µg/mL (**29**), as well as CC₅₀ values of 0.47 (**28**) and 1.32 µg/mL (**29**). The authors concluded that the antiviral effect of **28** and **29** could be attributed to the number of -OH groups in these structures [113].

Moreover, the antiviral activity of anthraquinone **28** and two derivatives was assessed against another influenza virus strain (A/Taiwan/CMUH01/07 H1N1). After evaluation on MDCK cells, compounds exhibited CC₅₀ values of 76.6, 25.7, and 18.3 µg/mL for **28**, emodin (**30**), and chrysophanol (**31**), respectively. Although the three metabolites were demonstrated to reduce the

cytopathic effect (CPE) in infected MDCK cells, compound **28** showed the strongest inhibition of virus yield, with an IC_{50} value of less than 0.05 $\mu\text{g/mL}$. Proteomic analysis and Western blot (WB) indicated that **28** up-regulating galectin-3 in MDCK cells, which is involved in the induction of interferon γ (IFN- γ) and β (IFN- β). Quantitative PCR and WB confirmed that this anthraquinone also up-regulates the galectin-3 expression [114].

In another investigation, anthraquinone **30** was isolated from the roots of *Polygonatum odoratum* (an herbaceous plant belonging to the Liliaceae family and used to treat diabetes or rheumatic heart disease), along with physcion (**32**) and a new derivative called polygodoquinone A (**33**; a naphthoquinone analog linked to an anthraquinone via a C-C bond). The three anthraquinones showed inhibitory activity against influenza virus A/WSN/33 (H1N1), with IC_{50} values of 11.0, 11.4, and 2.3 μM for **30**, **33**, and **32**, respectively. The compounds exhibited CC_{50} values of 36.5 (**33**), 79.5 (**30**), and 94.0 μM (**32**) after cytotoxicity evaluation on 293 T-Gluc cells [115].

Furthermore, the cytotoxic and anti-influenza activities of **28**, **30**, **32**, emodin-1-O- β -D-glucopyranoside (**34**), chrysophanol 8-O-glucoside (**35**), rhein 8-glucoside (**36**), and aloe-emodin-8-O- β -D-glucopyranoside (**37**) have been determined. All compounds had no significant cytotoxicity in A549 and MDCK cells ($<25 \mu\text{g/mL}$). Likewise, these anthraquinones inhibited the activity of influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) at concentrations ranging from 12.5 to 25 $\mu\text{g/mL}$. Natural product **30** also demonstrated to inhibit the activity of several human and avian influenza A virus strains at 6.25-25 $\mu\text{g/mL}$, which were A/PR/8/34 (H1N1), A/ShanTou/16/09 (H1N1), A/ShanTou/1233/06 (H1N1), A/ShanTou/602/06 (H3N2), A/ShanTou/364/05 (H3N2), A/Quail/HongKong/G1/97 (H9N2), A/Chicken/Guangdong/A1/03 (H9N2), and A/Chicken/Guangdong/1/05 (H5N1). Finally, the authors concluded that the pharmacological mechanism of **30** could be attributed to the regulation of various markers involved in the PPAR α / γ -AMPK pathway and fatty acid metabolism after numerous biological tests [116].

Another work revealed that **30** had no cytotoxic effects on MDCK cells (IC_{50} of 182.95 $\mu\text{g/mL}$) and inhibited the activity of influenza virus A/ShanTou/169/06 (H1N1), with a mean maximal effective concentration (EC_{50}) of 4.25 $\mu\text{g/mL}$. This natural product significantly reduced influenza A virus-induced up-regulation of mRNA and protein expressions of MyD88, TRAF6, and Toll-like receptors (TLRs) such as TLR2, TLR3, TLR4, and TLR7. Metabolite **30** caused a decrement in phosphorylations of p38, MAPK/JNK, and translocation of nuclear factor κB (NF- κB), and regulated several markers involved in oxidative stress. Likewise, **30** inhibited viral replication, lung edema, and inflammatory response *in vivo*. Finally, anthraquinone **30** enhanced the activation of

the Nrf2 signaling pathway, which can inhibit oxidative stress and suppress the activation of the aforementioned signaling pathways during influenza infection [117]. In this sense, there is evidence that anthraquinones inhibited pro-inflammatory markers such as cytokines and nitric oxide (NO) in ovalbumin-induced asthma mouse models. Anthraquinones reduced the infiltration of inflammatory cells (macrophages and eosinophils) and pulmonary tissue injuries in these *in vivo* models, too. Thus, the effects of anthraquinones on the immune system may be related to other complications associated with viral respiratory infections, such as acute asthma [155].

A new hydroanthraquinone (6-O-demethyl-4-dehydroxyaltersolanol A, **38**) and four other known derivatives were isolated from the culture broth of the fungal strain *Nigrospora* sp. YE3033, previously obtained from *Aconitum carmichaeli* root. A CPE inhibition assay demonstrated that compound **38**, 4-dehydroxyaltersolanol A (**39**), and altersolanol B (**40**) inhibited the activity of influenza virus A/PR/8/34 (H1N1), with IC₅₀ values of 2.59, 8.35, and 7.82 µg/mL, respectively. Moreover, cytotoxicity on MDCK cells was determined and CC₅₀ values of 94.92 (**38**), 90.71 (**39**), and 33.62 µg/mL (**40**) were obtained [118].

Another anthraquinone with anti-influenza activity is rhein (**41**), which is found in traditional medicinal plants such as *Rheum palmatum*, *Aloe barbadensis*, *Cassia angustifolia*, and *Polygonum multiflorum*. This molecule showed a CC₅₀ of 64.59 µg/mL in A549 cells and inhibited the proliferation of influenza virus A/ShanTou/169/06 (H1N1) according to a plaque inhibition assay (EC₅₀ of 1.51 µg/mL). Time-of-addition test suggested that **41** could inhibit influenza virus adsorption and replication. Other biological experiments evidenced that **41** could suppress influenza virus-induced oxidative stress *in vitro* by reduction, increment, or up-regulation of various markers. Anthraquinone **41** decreased the expressions of several TLRs, phosphorylations of p38, Akt, MAPK/JNK, and translocation of NF-κB. In addition, **41** inhibited *in vitro* expression of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases, as well as pulmonary inflammation and histopathological changes *in vivo*. So, the authors concluded that **41** could inhibit viral replication by the suppression of oxidative stress and different signaling pathways induced by the influenza virus [119].

Previously, our research group isolated aloesaponarin-I (**42**) and aloesaponarin-II (**43**) from the roots of *Aloe vera* (a plant with diverse therapeutic properties) and synthesized analogs by methylation, acetylation, and O-glycosyl reactions starting from **42**. Although compounds had no significant cytotoxicity in MDCK cells (CC₅₀ >100 µM), only derivatives **44** and **45** showed a reduction in CPE against two influenza virus strains: A/Yucatan/2370/09 (H1N1), with IC₅₀ of

30.77 for **44** and 13.70 μM for **45**; A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1), with IC_{50} of 62.28 for **44** and 19.47 μM for **45**. Then, the authors carried out time-of-addition assays to assess the effect of these derivatives during one cycle of replication (0-10 h). Both anthraquinones caused a decrement in viral yields when added 6-10 h post-infection, so this study concluded that the tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl substituent at the C3 position of **44** and **45** might affect the activity of the influenza A(H1N1) viruses [120].

Finally, some anthraquinones have been investigated for their anti-NA activity, such as **30**, **32**, and **34**. These metabolites and anthraquinone glycosides physcion-8-O- β -D-glucopyranoside (**46**) and emodin-8-O- β -D-glucopyranoside (**47**) were obtained from the roots of *P. cuspidatum*. Anthraquinone glucosides **34**, **46**, and **47** showed much better inhibition of NA from *C. perfringens* than their aglycones. Compounds **30** and **32** had IC_{50} values of 5.4 and >200 μM , while **34**, **46**, and **47** had IC_{50} values of 0.43, 6.2, and 0.85 μM , respectively [102].

Several investigations have also focused on evaluating the anti-influenza activity of other types of quinones such as anthrones, hydroquinones, and benzoquinones. The structures of these quinone derivatives (compounds **48-55**) are shown in Figure 6.

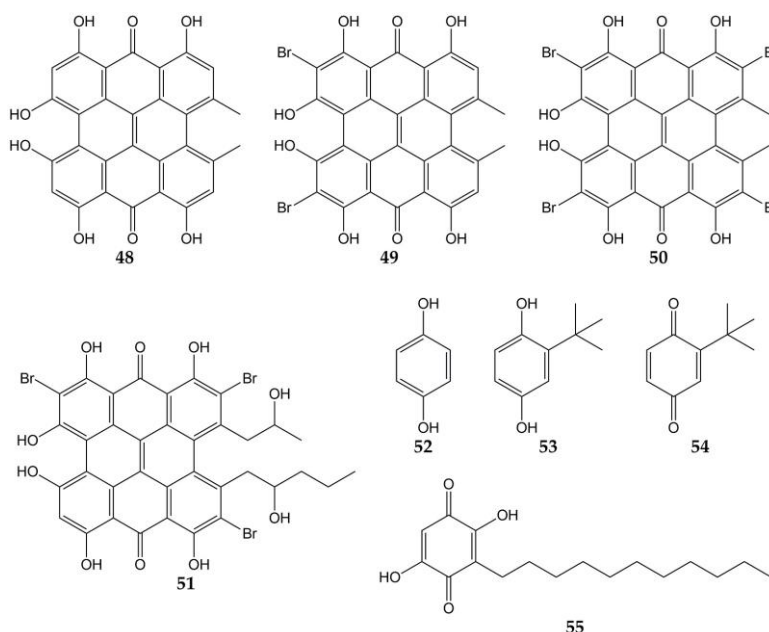


Figure 6. Chemical structures of quinones **48-55**.

In this sense, hypericin (**48**; an aromatic polycyclic anthrone present in *Hypericum triquetrfoliurn*) exhibited a virucidal effect against influenza virus A/Brazil at concentrations ranging from 3.12 to

50 µg/mL [121]. Compound **48** and its analogs dibromohypericin (**49**), tetrabromohypericin (**50**), and gymnochrome B (**51**) were evaluated against the influenza A virus. All molecules showed antiviral activity, with minimum 100% inhibitory concentrations (MIC_{100}) of 13 (**48**), <5 (**49**), 250 (**50**), and 78 nM (**51**) [122].

Other quinone derivatives with antiviral activity are hydroquinones, particularly 1,4-hydroquinone (**52**). This compound was isolated from the leaves of *Elaeocarpus tonkinensis* (a medicinal plant from Vietnam that belongs to the Elaeocarpaceae family) and inhibited the activity of influenza viruses A/PR/8/34 (H1N1), A/HongKong/8/68 (H3N2), and B/Lee/40, with EC_{50} values of 31.9, 19.7, and 54.3 µg/mL, respectively. Previously, **52** did not show significant cytotoxicity on MDCK cells (CC_{50} >300 µg/mL) [123].

In another study, *tert*-butylhydroquinone (**53**) was shown to form a complex with H14 from influenza virus A/mallard/Astrakhan/263/82. According to X-ray crystallography analyses, compound **53** was bound to the protein at the interface between two monomers that make up the HA trimer. Considering that HA is composed of three monomers (each monomer consists of HA1 and HA2 subunits bound by a disulfide bond), this viral protein has three binding sites for **53**. Quinone **53** was bound to HA mainly through hydrophobic interactions with interface residues, which consist of residues from the long HA2 α -helices of each monomer (Leu291, Leu982, Ala1012, Leu552, and Leu992) [124,146].

The cytotoxicity and anti-influenza activity of **53** and some derivatives have also been tested. Hydroquinone **53** and *tert*-butylbenzoquinone (**54**) exhibited antiviral effects against a pseudovirus expressing H7 HA protein in its viral envelope, although the antiviral activity was higher for **53** (IC_{50} of 6 µM) than for **54** (IC_{50} >50 µM), suggesting that -OH groups play an important role in the antiviral properties of **53**. Cytotoxicity assay with 293T cells evidenced a CC_{50} value >270 µM for **53**. Molecular dynamic simulations demonstrated that **53** was able to interact with active sites of H7 via H-bonds between the -OH groups with Arg54 and Glu97. Besides, the *tert*-butyl group of **53** was also bound to H7 through hydrophobic interactions with residues Leu55, Leu98, and Leu99 [125].

On the other hand, embelin (**55**) is a benzoquinone that has shown activity against the influenza virus A/PR/8/34 (H1N1). This natural product was isolated from the fruits of *Embelia ribes* (a plant from Myrsinaceae family and used to treat diabetic ulcers or bronchitis) and its cytotoxicity in MDCK cells and antiviral activity were assessed (CC_{50} of 3.1 µM and IC_{50} of 0.3 µM). Metabolite

55 was evaluated against five other influenza A and B viruses, obtaining IC_{50} values of 0.1 (A/mallard/Pennsylvania/10218/84 H5N2), 0.5 (A/California/07/09 H1N1pdm), 0.5 (A/Vladivostok/02/09 H1N1), 0.6 (A/Aichi/2/68 H3N2), and 0.2 μ M (B/Malaysia/2506/04). Time-of-addition experiments were carried out and results showed that **55** was most effective when added at the early stages of the viral replication cycle (0-1 h post-infection). Hemagglutination inhibition assay demonstrated that **55** prevent agglutination of erythrocytes induced by influenza virus A/PR/8/34 (H1N1; hemagglutination titer was 1:32), so *in silico* docking simulations were performed. Compound **55** was bound to avian H5 HA through H-bond between the -OH group with Tyr91. Likewise, the -OH and carbonyl groups of **55** interacted with Arg193, Ser227, Gly228, and Glu190 from human H5 HA protein through H-bonds, while a π -alkyl and π -anion interactions between Leu194, Glu190, and **55** were observed [126].

5.2. Quinones with activity against CoVs

Unlike influenza viruses, studies with quinones and their activity against CoVs are limited. Some quinones have exhibited inhibitory properties against SARS-CoV and its protein targets. The chemical structures of these compounds (quinones **56-67**) are represented in Figure 7.

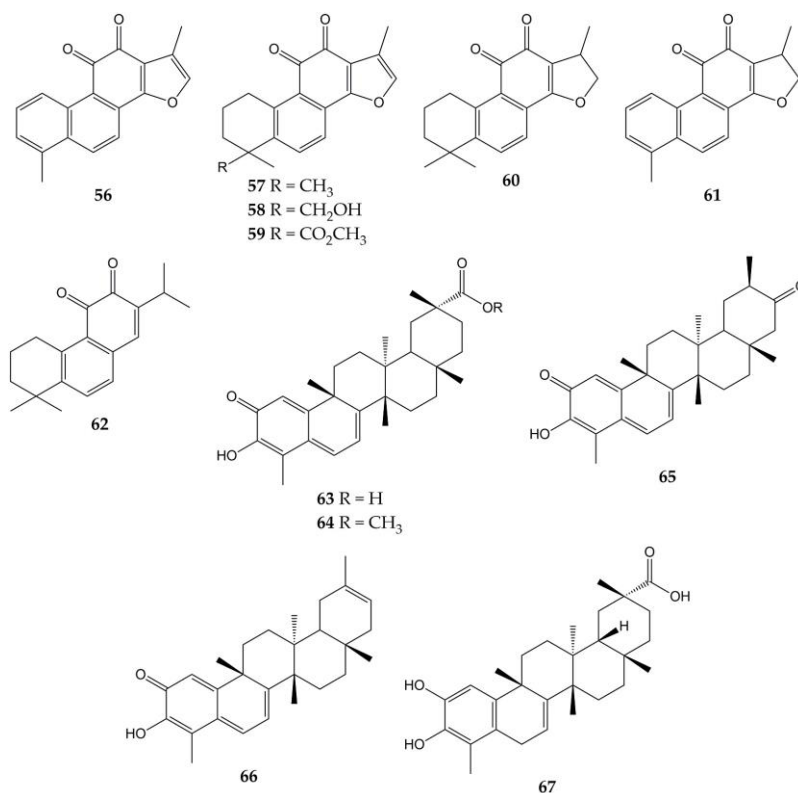


Figure 7. Chemical structures of quinones **56-67**.

One of the interesting molecular targets of SARS-CoV is 3CL^{pro}, which has a conserved structure among CoVs (despite sequence variation). 3CL^{pro} and another protease (papain-like cysteine protease or PL^{pro}) cleave two polyproteins (pp1a and pp1ab) and produce various nonstructural proteins implicated in viral genome transcription and replication [156]. The activity of aloe-emodin (**28**) against 3CL^{pro} has been previously reported. Anthraquinone **28** exerted inhibitory effects on the 3CL^{pro} cleavage activity from SARS-CoV by cell-free and cell-based cleavage assays, with IC₅₀ values of 132 and 366 μ M, respectively. This compound did not show significant cytotoxicity in Vero cells, with CC₅₀ of 11,592 μ M [127].

Spike (S) protein has been another attractive viral target of CoVs since it is involved in host cell entry. This glycoprotein consists of two subunits (the S1 subunit, which binds to the host cell receptor angiotensin-converting enzyme 2 or ACE2, and the S2 subunit which leads the fusion of the viral and host cell membranes) and requires to be cleaved by the transmembrane protease/serine subfamily member 2 (TMPRSS2) to trigger its functions [157]. Anthraquinones have also shown inhibitory effects on this protein. In this sense, emodin (**30**) inhibited the interaction of the S protein with ACE2 in a dose-dependent manner (IC₅₀ of 200 μ M), while rhein (**41**) slightly inhibited the interaction between the protein and the receptor. Then, the inhibitory effect of **30** on the interaction of SARS-CoV S protein with Vero E6 cell receptors was determined using an S protein-pseudotyped retrovirus. Compound **30** blocked the interaction between protein S and Vero E6 cells, as well as reduced infectivity of S protein-pseudotyped retrovirus in a dose-dependent manner [128].

Another work showed that molecule **30** was able to inhibit the functions of the SARS-CoV and HCoV-OC43 3a ion channels (a cation-selective channel comprised of the 3a protein that plays an important role in SARS-CoV release from the infected cells) expressed in *Xenopus* oocytes. Likewise, **30** inhibited HCoV-OC43 release from infected Rhabdomyosarcoma (RD) cells [129].

Other quinone-type derivatives have been demonstrated to inhibit the activity of the above-mentioned viral targets of SARS-CoV. For example, tanshinone I (**56**), tanshinone IIA (**57**), tanshinone IIB (**58**), methyl tanshinonate (**59**), cryptotanshinone (**60**), dihydrotanshinone I (**61**), and rosmariquinone (**62**) exerted an inhibitory effect over 3CL^{pro} in a dose-dependent manner (except for **60**), with IC₅₀ values of 38.7, 89.1, 24.8, 21.1, 226.7, 14.4, and 21.1 μ M, respectively. These tanshinones (diterpene quinolones) were previously isolated from the roots of *Salvia miltiorrhiza* (an Asian medicinal plant belonging to the Lamiaceae family and employed to treat coronary heart disease) and also inhibited the activity of PL^{pro} from SARS-CoV in a time-

dependent manner. These natural products evidenced potent inhibition after 60 min of preincubation (IC_{50} of 8.8 for **56**, 1.6 for **57**, 10.7 for **58**, 9.2 for **59**, 0.8 for **60**, 4.9 for **61**, and 30.0 μ M for **62**) [130].

Celastrol (**63**), pristimerin (**64**), tingenone (**65**), iguesterin (**66**), and dihydrocelastrol (**67**) are quinone methide triterpenes with activity against 3CL^{pro}. Compounds **63**, **64**, **65**, and **66** were obtained from the bark of *Triterygium regelii* (a plant from the Celastraceae family used in traditional Chinese medicine to treat inflammatory and autoimmune diseases), while **67** was synthesized from **63**. All quinone methide triterpenes exhibited inhibitory activity over 3CL^{pro}, with IC_{50} values of 10.3 (**63**), 5.5 (**64**), 9.9 (**65**), 2.6 (**66**), and 21.7 μ M (**67**). In the same investigation, molecular docking simulation showed that the -OH group of **66** bound to the active site of 3CL^{pro} from SARS-CoV via H-bonds with the carbonyl group of Cys44 and -OH group of Thr25 [131].

Due to the global health emergency derived from the current pandemic, various studies have focused on the search for compounds with activity against the novel SARS-CoV-2 and its molecular targets. Among the molecules evaluated are quinones and the chemical structures of these compounds (quinones **68-83**) are shown in Figure 8.

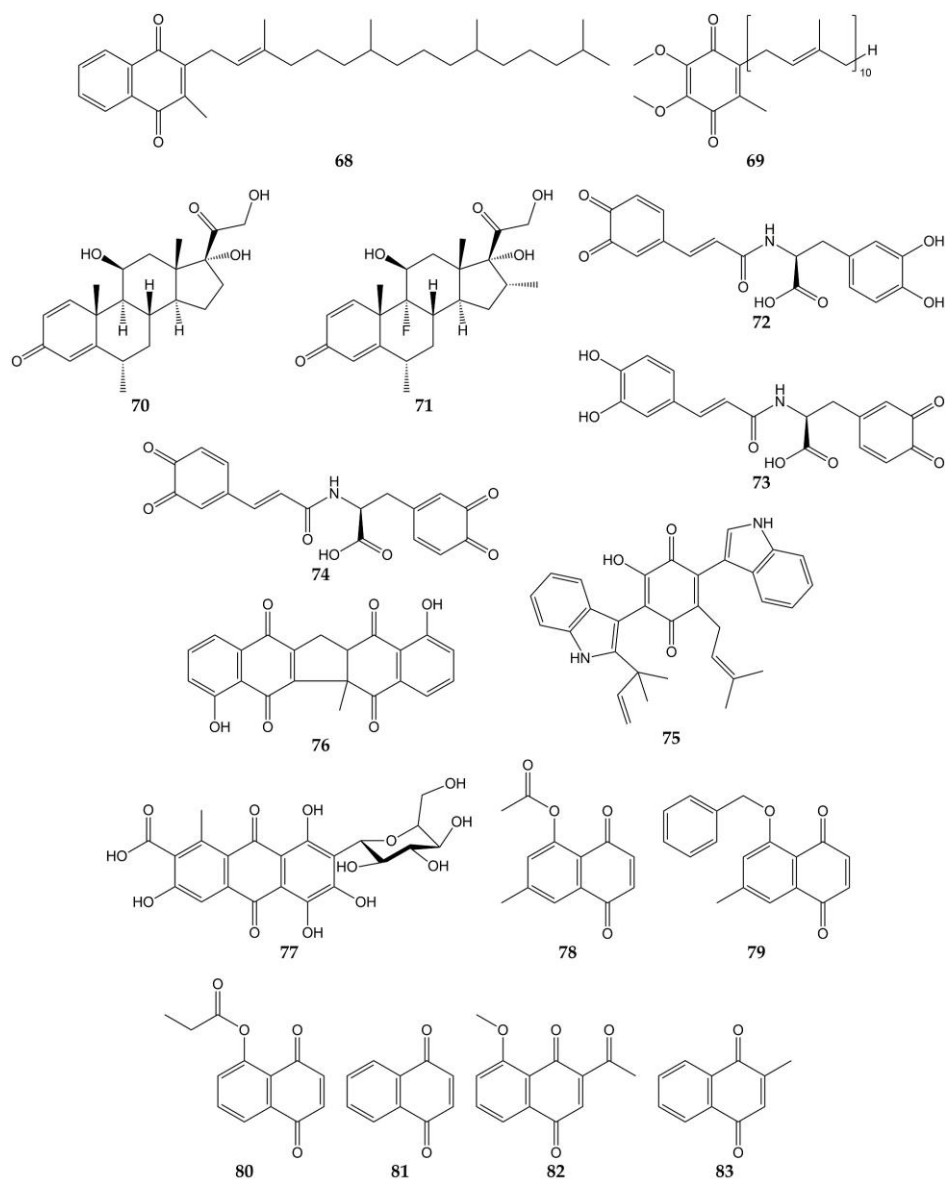


Figure 8. Chemical structures of quinones **68-83**.

Molecular docking analyses have demonstrated that different types of quinones are able to interact with 3CL^{pro} residues from SARS-CoV-2. The -OH and carbonyl groups of embelin (**55**) bound to Leu141, Gly143, Ser144, His163, and Glu166 through H-bonds, while π -sulfur, alkyl, and π -alkyl interactions between Cys145 and His41 residues with **55** were observed. On the other hand, anthraquinone **30** was bound to 3CL^{pro} through H-bond between its carbonyl group with Glu166, as well as Asn142 through its two hydrogen atoms. Vitamin K1 (**68**; phyloquinone form of vitamin K) and coenzyme Q10 (**69**) also interacted with Gly143 and Asn142 through H-bonds,

while H-bond interactions were noted between the carbonyl group of the quinone methides methylprednisolone (**70**) and dexamethasone (**71**) and the -NH group of Gly143 [132].

In another study, molecular mechanics and dynamics calculations evidenced that -OH and carbonyl groups of quinone methide **63** were able to interact with 3CL^{pro} active site via H-bonds with Thr25 and His41. Furthermore, Cys145, Met49, and Pro168 residues were bound to **63** through covalent and π bonds [133]. *In silico* simulations showed that *ortho*-quinone derivatives **72**, **73**, and **74** of clovamide (a caffeoyl conjugate found in *Theobroma cacao*) bound to 3CL^{pro} residues. The -OH and carbonyl groups of **72** interacted with Gly143, Ser144, Cys145, Glu166, and Val186 through H-bonds, while a π -sulfur interaction between Cys145 and the quinone ring was observed. Similar to **72**, analog **73** was bound to 3CL^{pro} through H-bonds between Asn142, Gly143, His163, Glu166, and Thr190 with -OH and carbonyl groups. Pro168 and Gln189 bound to the quinone ring of **73** by π interactions. Finally, the -OH and carbonyl groups of derivative **74** interacted with amino acids His41, Cys145, His163, and Phe140 through H-bonds; besides, Cys145 and Pro168 were able to bind to quinone rings through π -alkyl interactions [134].

Docking simulations have also shown that terrequinone A (**75**), zeylanone (**76**), and carminic acid (**77**) interact with the active site of 3CL^{pro} from SARS-CoV-2. Quinone **75** was bound to Gly143, Glu166, Arg188, and Gln189 through H-bonds. Compound **75** was docked to 3CL^{pro} through van der Waals (Thr26, Asn142, and His163), π -alkyl (His41, Cys145, Glu166, and Gln189), and hydrophobic (Met49 and Met165) interactions. Dimeric naphthoquinone **76** was able to interact with His163, His164, and Glu166 through H-bonds, as well as Gly143, Cys145, and Gln189 by van der Waals-type interactions. In the same work, anthraquinone **77** was demonstrated to bind 3CL^{pro} by H-bond (Glu166), van der Waals (Thr24, Thr26, Asn142, and Gly143) and hydrophobic (Met49) interactions, while quinone methide triterpene **66** interacted with Glu166 from the protease through H-bond [135].

In addition to *in silico* studies, *in vitro* assays have shown that quinones possess activity against SARS-CoV-2 and 3CL^{pro}. The 3CL^{pro} inhibitory effects of synthetic naphthoquinones and anthraquinones were determined, and compounds 7-methyl juglone ethyl acetate (**78**), 5-(benzyloxy)-7-methyl-1,4-naphthoquinone (**79**), propionyl juglone (**80**), 1,4-naphthoquinone (**81**), and 2-acetyl-8-methoxy-1,4-naphthoquinone (**82**) exhibited potent inhibition, with IC₅₀ values of 220.9, 160.68, 129.77, 110.13, and 72.07 nM, respectively. Later, the authors performed molecular docking analyses with juglone (**17**), **80**, and the most potent 3CL^{pro} inhibitor **82**. The phenolic -OH and the carbonyl group of **17** interacted with Gly143 and Glu166 from 3CL^{pro} through

H-bonds, while **80** was bound to the protease by H-bond interactions between the -NH group of Gly143 and the -OH group of Ser144 with the carbonyl group of **80**. Naphthoquinone **82** was bound to imidazole moiety of His41, -NH group of Gly143, and -NH group of Glu166 through H-bonds with the carbonyl, acetyl, and methoxy groups, respectively. Cytotoxicity of naphthoquinones was also tested over human normal fibroblast cells (HFF-1) and the least cytotoxic molecules were lawsone (**23**), vitamin K3 (**83**), **79**, **81**, and **82** (IC₅₀ values of >50, >50, 32.9, 26.7, and 41.2 μ M). Besides, **82** did not show significant cytotoxicity on Vero E6 cells at concentrations <20 μ M (cell viability >90%). Considering this, the activity of **82** against SARS-CoV-2 was assessed in infected cells, obtaining an EC₅₀ of 4.55 μ M [136].

Finally, the antiviral activity of five herbal formulations containing anthraquinones **28**, **30**, **41**, chrysophanol (**31**), physcion (**32**), and other compounds was evaluated against pseudo-typed SARS-CoV-2 in infected HEK293T cells. Three formulations inhibited the activity of the pseudo-typed viral particles, with percentages of infectivity ranging from 0.00 to 0.03% [137].

5.3. Quinones with activity against other respiratory viruses

In addition to influenza viruses and CoVs, there are some studies that reported the antiviral effect of quinones on other respiratory viruses. The structures of these molecules (quinones **84-88**) are represented in Figure 9.

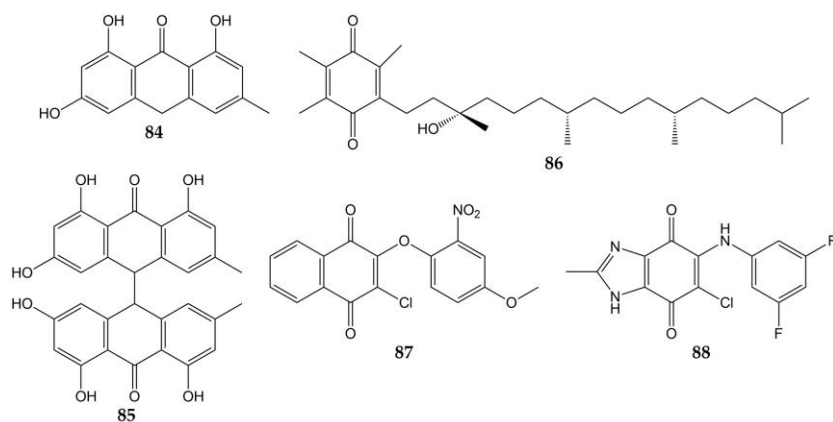


Figure 9. Chemical structures of quinones **84-88**.

Previously, the activity of emodin (**30**) and the anthraquinone derivatives hypericin (**48**), emodin anthrone (**84**), and emodin bianthrone (**85**) were evaluated against PIV type-3. The concentrations required to reduce the virus titer (1 log₁₀) were 0.1 (**48**), >10 (**30** and **84**), and 4 μ g/mL (**85**) [138]. Compound **30** has been demonstrated to inhibit RSV activity. This

anthraquinone from *R. palmatum* had no significant cytotoxicity on human laryngeal carcinoma cells (HEp-2) at low concentrations (CC_{50} of 76.783 $\mu\text{mol/L}$). The natural product **30** reduced CPE in infected HEp-2 cells (>80% of inhibition in replication of RSV at 30 $\mu\text{mol/L}$). Furthermore, when **30** was added post-infection, this metabolite inhibited RSV activity according to the results of MTT and plaque reduction assays (EC_{50} values of 14.27 and 13.06 $\mu\text{mol/L}$, respectively). Time-of-addition experiments demonstrated that **30** inhibited the replication of RSV when added 0-4 h post-inoculation, so this compound could affect the early stages of the viral replication cycle. Quantitative PCR also showed that **30** increased mRNA levels of IFN- γ and decreased tumor necrosis factor α (TNF- α) mRNA expression in infected HEp-2 cells [139]. Vitamin E quinone (**86**) obtained from the stems of *Celastrus hindsii* also decreased the CPE in infected HEp-2 cells with RSV A2 strain (IC_{50} of 3.13 μM) [140].

Finally, the anti-HRV activity of several quinones has been reported. The aforementioned rhinacanthins C (**1**), D (**2**), N (**3**), and Q (**4**) from the roots of *R. nasutus* caused an inhibition on the HRV-1B activity, with IC_{50} values of 0.29, 0.24, 0.97, and 5.35 μM , respectively [101]. Later, the effect of quinones against 3C^{pro} from HRV have been demonstrated, since quinone analogs **87** and **88** inhibited the activity of recombinant 3C^{pro} (IC_{50} of 0.85 for **87** and 8.4 μM for **88**), while SDS-PAGE analysis verified that **87** and **88** completely suppressed the catalytic activity of the protease (5 μM for **87** and 50 μM for **88**). Then, flexible docking simulations were carried out and showed that these derivatives interacted with the active site of 3C^{pro} from HRV-14 [141].

6. FUTURE TRENDS

In the present review, the activity of a large number of quinones against various respiratory viruses and their molecular targets has been described. Among the evaluated pathogens were influenza viruses and CoVs. On the other hand, investigations with PIVs, RSVs, and HRVs were very limited, while no studies were found showing that quinones inhibit the activity of HMPVs, AdVs, and BoVs. Some quinones demonstrated activity against more than one virus. Then, considering that these compounds possess a wide variety of chemical structures, it is likely that quinones or their derivatives also inhibit the replication of less common respiratory viruses for which there are no reports.

As previously described, various types of quinones have been evidenced to be active against a wide range of influenza viruses and CoVs. Besides, several investigations have shown that quinone-type molecules inhibit protein targets of influenza viruses (NA, HA, M2, PA, and NP) and

CoV (3CL^{pro}, PL^{pro}, and S protein). However, it is necessary to broaden the spectrum of viral targets, determining whether quinones inhibit the synthesis or activity of other proteins involved in the replication cycle of influenza viruses (PB1, PB2, NEP, NS1, and M1), CoVs (membrane protein, nucleocapsid protein, and other accessory molecules), and other respiratory viruses, either through *in silico* models or *in vitro* tests. In this sense, there are many computational tools and molecular modeling studies that could be useful to assess the interaction mode of compounds with their therapeutic target. Likewise, it is important to establish whether the evaluated quinone participates in other cellular processes, which could allow the cell to protect itself from viral infection or secrete molecules that eliminate the infectious agent.

In summary, *in silico* analyses, and *in vitro* assays would help to establish the mechanism of action of the evaluated quinones, identifying at which stage of the viral replication cycle they act. Later, research needs to be carried to *in vivo* tests and clinical trials, with pharmacokinetics, toxicity, and efficacy studies. Structure-activity relationship studies can also be performed to find the molecule with optimal activity. Moreover, it is very important to continue the search for quinones with potential activity against respiratory viruses (whether in plants, marine organisms, or other natural sources), characterize their structures completely, determine their antiviral activity with the models already described and, as a consequence, develop quinones with improved activity through chemical synthesis or other methods.

7. CONCLUSIONS

For many years, respiratory viruses have represented a global public health problem, resulting in annual economic losses and numerous pandemics, including the current pandemic caused by SARS-CoV-2. This situation has motivated researchers to search for new and promising antiviral molecules from natural sources or synthetics. Although a large number of quinones with potent antiviral activity have been reported, none of them are currently used as drugs to treat viral respiratory diseases. There is still research to be done in the field of quinones with activity against respiratory viruses. Therefore, it is important to continue the work at different levels (*in silico*, *in vitro*, and *in vivo*) until reaching the clinical trials, taking advantage of the versatile quinone scaffold for the development of future drugs against respiratory viruses.

Author Contributions: Conceptualization, R.B.-A., I.C.-Z and G.A.-T.; formal analysis, I.C.-Z.; funding acquisition, R.B.-A.; investigation, R.B.-A., I.C.-Z and G.A.-T.; resources, R.B.-A., I.C.-Z and G.A.-T.; supervision; R.B.-A. and G.A.-T.; visualization, R.B.-A., I.C.-Z and G.A.-T.; writing—

original draft I.C.-Z.; writing—review and editing, 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.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: I.C.-Z. is grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship awarded (grant number: 787552).

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

REFERENCES

1. Khomich, O.A.; Kochetkov, S.N.; Bartosch, B.; Ivanov, A.V. Redox Biology of Respiratory Viral Infections. *Viruses* **2018**, *10*, 392:1-392:27, doi:10.3390/v10080392.
2. Rodgers, L.; Sheppard, M.; Smith, A.; Dietz, S.; Jayanthi, P.; Yuan, Y.; Bull, L.; Wotiz, S.; Schwarze, T.; Azondekon, R.; et al. Changes in Seasonal Respiratory Illnesses in the United States During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. *Clin Infect Dis* **2021**, *73*, S110-S117, doi:10.1093/cid/ciab311.
3. Leung, N.H.L. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 528-545, doi:10.1038/s41579-021-00535-6.
4. Kutter, J.S.; Spronken, M.I.; Fraaij, P.L.; Fouchier, R.A.; Herfst, S. Transmission routes of respiratory viruses among humans. *Curr Opin Virol* **2018**, *28*, 142-151, doi:10.1016/j.coviro.2018.01.001.
5. Desforges, M.; Le Coupanec, A.; Dubeau, P.; Bourgouin, A.; Lajoie, L.; Dubé, M.; Talbot, P.J. Human Coronaviruses and Other Respiratory Viruses: Underestimated Opportunistic Pathogens of the Central Nervous System? *Viruses* **2019**, *12*, 14:1-14:28, doi:10.3390/v12010014.

6. World Health Organization. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. Available online: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> (accessed on February 11 2023).
7. Zhang, D.; He, Z.; Xu, L.; Zhu, X.; Wu, J.; Wen, W.; Zheng, Y.; Deng, Y.; Chen, J.; Hu, Y.; et al. Epidemiology characteristics of respiratory viruses found in children and adults with respiratory tract infections in southern China. *Int J Infect Dis* **2014**, *25*, 159-164, doi:10.1016/j.ijid.2014.02.019.
8. Berry, M.; Gamiieldien, J.; Fielding, B.C. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses* **2015**, *7*, 996-1019, doi:10.3390/v7030996.
9. Zhang, N.; Wang, L.; Deng, X.; Liang, R.; Su, M.; He, C.; Hu, L.; Su, Y.; Ren, J.; Yu, F.; et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J Med Virol* **2020**, *92*, 408-417, doi:10.1002/jmv.25674.
10. Liu, W.K.; Chen, D.H.; Tan, W.P.; Qiu, S.Y.; Xu, D.; Zhang, L.; Gu, S.J.; Zhou, R.; Liu, Q. Paramyxoviruses respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and human metapneumovirus infection in pediatric hospitalized patients and climate correlation in a subtropical region of southern China: a 7-year survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2019**, *38*, 2355-2364, doi:10.1007/s10096-019-03693-x.
11. Borchers, A.T.; Chang, C.; Gershwin, M.E.; Gershwin, L.J. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* **2013**, *45*, 331-379, doi:10.1007/s12016-013-8368-9.
12. Chatterjee, A.; Mavunda, K.; Krilov, L.R. Current State of Respiratory Syncytial Virus Disease and Management. *Infect Dis Ther* **2021**, *10*, 5-16, doi:10.1007/s40121-020-00387-2.
13. Shao, N.; Liu, B.; Xiao, Y.; Wang, X.; Ren, L.; Dong, J.; Sun, L.; Zhu, Y.; Zhang, T.; Yang, F. Genetic Characteristics of Human Parainfluenza Virus Types 1-4 From Patients With Clinical Respiratory Tract Infection in China. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 679246:1-679246:14, doi:10.3389/fmicb.2021.679246.
14. Pinky, L.; Burke, C.W.; Russell, C.J.; Smith, A.M. Quantifying dose-, strain-, and tissue-specific kinetics of parainfluenza virus infection. *PLoS Comput Biol* **2021**, *17*, e1009299:1-e1009299:19, doi:10.1371/journal.pcbi.1009299.

15. Kumar, P.; Srivastava, M. Prophylactic and therapeutic approaches for human metapneumovirus. *Virusdis* **2018**, *29*, 434-444, doi:10.1007/s13337-018-0498-5.
16. Russell, C.J.; Penkert, R.R.; Kim, S.; Hurwitz, J.L. Human Metapneumovirus: A Largely Unrecognized Threat to Human Health. *Pathogens* **2020**, *9*, 109:1-109:8, doi:10.3390/pathogens9020109.
17. Gray, G.C.; Robie, E.R.; Studstill, C.J.; Nunn, C.L. Mitigating Future Respiratory Virus Pandemics: New Threats and Approaches to Consider. *Viruses* **2021**, *13*, 637:1-637:20, doi:10.3390/v13040637.
18. Gallardo, J.; Pérez-Illana, M.; Martín-González, N.; San Martín, C. Adenovirus Structure: What Is New? *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 5240:1-5240:16, doi:10.3390/ijms22105240.
19. Wen, S.; Lin, Z.; Zhang, Y.; Lv, F.; Li, H.; Zhang, X.; Lin, L.; Zhu, H.H.; Xu, Z.; Li, C.; et al. The Epidemiology, Molecular, and Clinical of Human Adenoviruses in Children Hospitalized With Acute Respiratory Infections. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 629971:1-629971:8, doi:10.3389/fmicb.2021.629971.
20. Shen, K.; Wang, Y.; Li, P.; Su, X. Clinical features, treatment and outcomes of an outbreak of type 7 adenovirus pneumonia in centralized residence young adults. *J Clin Virol* **2022**, *154*, 105244:1-105244:8, doi:10.1016/j.jcv.2022.105244.
21. Stobart, C.C.; Nosek, J.M.; Moore, M.L. Rhinovirus Biology, Antigenic Diversity, and Advancements in the Design of a Human Rhinovirus Vaccine. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 2412:1-2412:8, doi:10.3389/fmicb.2017.02412.
22. Esneau, C.; Duff, A.C.; Bartlett, N.W. Understanding Rhinovirus Circulation and Impact on Illness. *Viruses* **2022**, *14*, 141:1-141:23, doi:10.3390/v14010141.
23. Zhang, Z.; Tan, L.; Tan, M.; Zhang, X.; He, W.; Li, M.; He, J.; Pan, Y.; Xu, B.; Bin, S.; et al. Molecular Characterization of the Viral Structural Genes of Human Rhinovirus A11 from Children Hospitalized with Lower Respiratory Tract Infection in Kunming. *Int J Infect Dis* **2022**, *117*, 274-283, doi:10.1016/j.ijid.2022.01.066.

-
24. Polo, D.; Lema, A.; Gándara, E.; Romalde, J.L. Prevalence of human bocavirus infections in Europe. A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis* **2022**, *69*, 2451-2461, doi:10.1111/tbed.14233.
25. Bakir, A.; Karabulut, N.; Alacam, S.; Mese, S.; Somer, A.; Agacfidan, A. Investigation of human bocavirus in pediatric patients with respiratory tract infection. *J Infect Dev Ctries* **2020**, *14*, 1191-1196, doi:10.3855/jidc.12553.
26. Abdelqader, R.; Hasan, H.; Alanagreh, L. Epidemiology of Human Bocavirus in the Middle East and North Africa: Systematic Review. *Pathogens* **2021**, *10*, 1456:1-1456:15, doi:10.3390/pathogens10111456.
27. Javanian, M.; Barary, M.; Ghebrehewet, S.; Koppolu, V.; Vasigala, V.; Ebrahimpour, S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol* **2021**, *93*, 4638-4646, doi:10.1002/jmv.26990.
28. Seah, A.; Loo, L.H.; Jamali, N.; Maiwald, M.; Aik, J. The influence of air quality and meteorological variations on influenza A and B virus infections in a paediatric population in Singapore. *Environ Res* **2023**, *216*, 114453:1-114453:14, doi:10.1016/j.envres.2022.114453.
29. Zaraket, H.; Hurt, A.C.; Clinch, B.; Barr, I.; Lee, N. Burden of influenza B virus infection and considerations for clinical management. *Antiviral Res* **2021**, *185*, 104970:1-104970:13, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104970.
30. Byrd-Leotis, L.; Cummings, R.D.; Steinhauer, D.A. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 1541:1-1541:22, doi:10.3390/ijms18071541.
31. Shao, W.; Li, X.; Goraya, M.U.; Wang, S.; Chen, J.L. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 1650:1-1650:13, doi:10.3390/ijms18081650.
32. Schrauwen, E.J.; Fouchier, R.A. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerg Microbes Infect* **2014**, *3*, e9:1-e9:11, doi:10.1038/emi.2014.9.
33. Lu, L.; Lycett, S.J.; Leigh Brown, A.J. Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. *BMC Evol Biol* **2014**, *14*, 16:1-16:15, doi:10.1186/1471-2148-14-16.
-

-
34. Rewar, S.; Mirdha, D.; Rewar, P. Treatment and Prevention of Pandemic H1N1 Influenza. *Ann Glob Health* **2015**, *81*, 645-653, doi:10.1016/j.aogh.2015.08.014.
35. White, M.C.; Lowen, A.C. Implications of segment mismatch for influenza A virus evolution. *J Gen Virol* **2018**, *99*, 3-16, doi:10.1099/jgv.0.000989.
36. Li, H.; Cao, B. Pandemic and Avian Influenza A Viruses in Humans: Epidemiology, Virology, Clinical Characteristics, and Treatment Strategy. *Clin Chest Med* **2017**, *38*, 59-70, doi:10.1016/j.ccm.2016.11.005.
37. Blagodatski, A.; Trutneva, K.; Glazova, O.; Mityaeva, O.; Shevkova, L.; Kegeles, E.; Onyanov, N.; Fede, K.; Maznina, A.; Khavina, E.; et al. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens* **2021**, *10*, 630:1-630:23, doi:10.3390/pathogens10050630.
38. Ma, H.X.; Wang, R.L.; Nie, Y.F.; Su, J.; Li, D.X.; Li, Y.; DU, Y.H.; Wei, H.Y.; Li, X.L.; Wang, Z.; et al. Distribution of Avian Influenza A Viruses in Poultry-Related Environment and Its Association with Human Infection in Henan, 2016 to 2017. *Biomed Environ Sci* **2019**, *32*, 797-803, doi:10.3967/bes2019.101.
39. World Health Organization. Avian Influenza Weekly Update Number 874. Available online: https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20221209.pdf?Status=Master&sfvrsn=22ea0816_21 (accessed on December 11 2022).
40. Sharma, L.; Rebaza, A.; Dela Cruz, C.S. When "B" becomes "A": the emerging threat of influenza B virus. *Eur Respir J* **2019**, *54*, 1901325:1-1901325:3, doi:10.1183/13993003.01325-2019.
41. World Health Organization. Influenza (Seasonal). Available online: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed on December 15 2022).
42. Synowiec, A.; Szczepański, A.; Barreto-Duran, E.; Lie, L.K.; Pyrc, K. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. *Clin Microbiol Rev* **2021**, *34*, e0013320:1-e0013320:32, doi:10.1128/CMR.00133-20.
-

43. Flerlage, T.; Boyd, D.F.; Meliopoulos, V.; Thomas, P.G.; Schultz-Cherry, S. Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 425-441, doi:10.1038/s41579-021-00542-7.
44. Jiang, C.; Yao, X.; Zhao, Y.; Wu, J.; Huang, P.; Pan, C.; Liu, S. Comparative review of respiratory diseases caused by coronaviruses and influenza A viruses during epidemic season. *Microbes Infect* **2020**, *22*, 236-244, doi:10.1016/j.micinf.2020.05.005.
45. Abdelrahman, Z.; Li, M.; Wang, X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Front Immunol* **2020**, *11*, 552909:1-552909:14, doi:10.3389/fimmu.2020.552909.
46. Cheng, V.C.; Lau, S.K.; Woo, P.C.; Yuen, K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev* **2007**, *20*, 660-694, doi:10.1128/CMR.00023-07.
47. Rabaan, A.A.; Al-Ahmed, S.H.; Sah, R.; Alqumber, M.A.; Haque, S.; Patel, S.K.; Pathak, M.; Tiwari, R.; Yattoo, M.I.; Haq, A.U.; et al. MERS-CoV: epidemiology, molecular dynamics, therapeutics, and future challenges. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **2021**, *20*, 8:1-8:14, doi:10.1186/s12941-020-00414-7.
48. Tang, D.; Comish, P.; Kang, R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog* **2020**, *16*, e1008536:1-e1008536:24, doi:10.1371/journal.ppat.1008536.
49. Li, J.; Lai, S.; Gao, G.F.; Shi, W. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature* **2021**, *600*, 408-418, doi:10.1038/s41586-021-04188-6.
50. Chadha, J.; Khullar, L.; Mittal, N. Facing the wrath of enigmatic mutations: a review on the emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants amid coronavirus disease-19 pandemic. *Environ Microbiol* **2022**, *24*, 2615-2629, doi:10.1111/1462-2920.15687.
51. Cilloniz, C.; Luna, C.M.; Hurtado, J.C.; Marcos, M.; Torres, A. Respiratory viruses: their importance and lessons learned from COVID-19. *Eur Respir Rev* **2022**, *31*, 220051:1-220051:18, doi:10.1183/16000617.0051-2022.

-
52. Acuti Martellucci, C.; Flacco, M.E.; Cappadona, R.; Bravi, F.; Mantovani, L.; Manzoli, L. SARS-CoV-2 pandemic: An overview. *Adv Biol Regul* **2020**, *77*, 100736:1-100736:11, doi:10.1016/j.jbior.2020.100736.
53. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int/measures> (accessed on December 17 2022).
54. Abed, Y.; Boivin, G. Treatment of respiratory virus infections. *Antiviral Res* **2006**, *70*, 1-16, doi:10.1016/j.antiviral.2006.01.006.
55. Mahajan, S.; Choudhary, S.; Kumar, P.; Tomar, S. Antiviral strategies targeting host factors and mechanisms obliging +ssRNA viral pathogens. *Bioorg Med Chem* **2021**, *46*, 116356:1-116356:17, doi:10.1016/j.bmc.2021.116356.
56. Tompa, D.R.; Immanuel, A.; Srikanth, S.; Kadhivel, S. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *Int J Biol Macromol* **2021**, *172*, 524-541, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.076.
57. Toots, M.; Plemper, R.K. Next-generation direct-acting influenza therapeutics. *Transl Res* **2020**, *220*, 33-42, doi:10.1016/j.trsl.2020.01.005.
58. Farrukhee, R.; Hurt, A.C. Antiviral Drugs for the Treatment and Prevention of Influenza. *Curr Treat Options Infect Dis* **2017**, *9*, 318-332, doi:10.1007/s40506-017-0129-5.
59. Lackenby, A.; Besselaar, T.G.; Daniels, R.S.; Fry, A.; Gregory, V.; Gubareva, L.V.; Huang, W.; Hurt, A.C.; Leang, S.K.; Lee, R.T.C.; et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. *Antiviral Res* **2018**, *157*, 38-46, doi:10.1016/j.antiviral.2018.07.001.
60. Lina, B.; Boucher, C.; Osterhaus, A.; Monto, A.S.; Schutten, M.; Whitley, R.J.; Nguyen-Van-Tam, J.S. Five years of monitoring for the emergence of oseltamivir resistance in patients with influenza A infections in the Influenza Resistance Information Study. *Influenza Other Respir Viruses* **2018**, *12*, 267-278, doi:10.1111/irv.12534.
61. Mifsud, E.J.; Hayden, F.G.; Hurt, A.C. Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral Res* **2019**, *169*, 104545:1-104545:9, doi:10.1016/j.antiviral.2019.104545.

62. Domachowske, J.B.; Anderson, E.J.; Goldstein, M. The Future of Respiratory Syncytial Virus Disease Prevention and Treatment. *Infect Dis Ther* **2021**, *10*, 47-60, doi:10.1007/s40121-020-00383-6.
63. Chibanga, V.P.; Dirr, L.; Guillon, P.; El-Deeb, I.M.; Bailly, B.; Thomson, R.J.; von Itzstein, M. New antiviral approaches for human parainfluenza: Inhibiting the haemagglutinin-neuraminidase. *Antiviral Res* **2019**, *167*, 89-97, doi:10.1016/j.antiviral.2019.04.001.
64. Van Den Bergh, A.; Bailly, B.; Guillon, P.; von Itzstein, M.; Dirr, L. Antiviral strategies against human metapneumovirus: Targeting the fusion protein. *Antiviral Res* **2022**, *207*, 105405:1, doi:10.1016/j.antiviral.2022.105405.
65. Dodge, M.J.; MacNeil, K.M.; Tessier, T.M.; Weinberg, J.B.; Mymryk, J.S. Emerging antiviral therapeutics for human adenovirus infection: Recent developments and novel strategies. *Antiviral Res* **2021**, *188*, 105034:1-105034:13, doi:10.1016/j.antiviral.2021.105034.
66. Bizot, E.; Bousquet, A.; Charpié, M.; Coquelin, F.; Lefevre, S.; Le Lorier, J.; Patin, M.; Sée, P.; Sarfati, E.; Walle, S.; et al. Rhinovirus: A Narrative Review on Its Genetic Characteristics, Pediatric Clinical Presentations, and Pathogenesis. *Front Pediatr* **2021**, *9*, 643219:1-643219:8, doi:10.3389/fped.2021.643219.
67. Alkhalf, H.; Almutairi, A.R.; Almutairi, A.; Almutairi, R.K.; AlGhnam, S.; Aljohani, S.; Alqanatish, J.T.; Babiker, A. Prevalence and Clinical Characterization of Bocavirus Infection in a Specialized Children's Hospital in Saudi Arabia. *Cureus* **2022**, *14*, e22127:1-e22127:9, doi:10.7759/cureus.22127.
68. de Wit, E.; van Doremalen, N.; Falzarano, D.; Munster, V.J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **2016**, *14*, 523-534, doi:10.1038/nrmicro.2016.81.
69. Aherfi, S.; Pradines, B.; Devaux, C.; Honore, S.; Colson, P.; Scola, B.; Raoult, D. Drug repurposing against SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and MERS-CoV. *Future Microbiol* **2021**, *16*, 1341-1370, doi:10.2217/fmb-2021-0019.

70. Anand, U.; Jakhmola, S.; Indari, O.; Jha, H.C.; Chen, Z.S.; Tripathi, V.; Pérez de la Lastra, J.M. Potential Therapeutic Targets and Vaccine Development for SARS-CoV-2/COVID-19 Pandemic Management: A Review on the Recent Update. *Front Immunol* **2021**, *12*, 658519:1-658519:27, doi:10.3389/fimmu.2021.658519.
71. Drożdżal, S.; Rosik, J.; Lechowicz, K.; Machaj, F.; Szostak, B.; Przybyciński, J.; Lorzadeh, S.; Kotfis, K.; Ghavami, S.; Łos, M.J. An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment. *Drug Resist Updat* **2021**, *59*, 100794:1-100794:27, doi:10.1016/j.drug.2021.100794.
72. Marzi, M.; Vakil, M.K.; Bahmanyar, M.; Zarenezhad, E. Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and *In Silico* Study. *Biomed Res Int* **2022**, *2022*, 7341493:1-7341493:16, doi:10.1155/2022/7341493.
73. Santos, I.A.; Grosche, V.R.; Bergamini, F.R.G.; Sabino-Silva, R.; Jardim, A.C.G. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? *Front Microbiol* **2020**, *11*, 1818:1-1818:23, doi:10.3389/fmicb.2020.01818.
74. Tao, K.; Tzou, P.L.; Nouhin, J.; Bonilla, H.; Jagannathan, P.; Shafer, R.W. SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. *Clin Microbiol Rev* **2021**, *34*, e0010921:1-e0010921:35, doi:10.1128/CMR.00109-21.
75. Papadopoulos, N.G.; Megremis, S.; Kitsioulis, N.A.; Vangelatou, O.; West, P.; Xepapadaki, P. Promising approaches for the treatment and prevention of viral respiratory illnesses. *J Allergy Clin Immunol* **2017**, *140*, 921-932, doi:10.1016/j.jaci.2017.07.001.
76. Das, G.; Heredia, J.B.; de Lourdes Pereira, M.; Coy-Barrera, E.; Rodrigues Oliveira, S.M.; Gutiérrez-Grijalva, E.P.; Cabanillas-Bojórquez, L.A.; Shin, H.S.; Patra, J.K. Korean traditional foods as antiviral and respiratory disease prevention and treatments: A detailed review. *Trends Food Sci Technol* **2021**, *116*, 415-433, doi:10.1016/j.tifs.2021.07.037.
77. Musarra-Pizzo, M.; Pennisi, R.; Ben-Amor, I.; Mandalari, G.; Sciortino, M.T. Antiviral Activity Exerted by Natural Products against Human Viruses. *Viruses* **2021**, *13*, 828:1-828:30, doi:10.3390/v13050828.
78. Wang, S.; Dong, G.; Sheng, C. Structural Simplification of Natural Products. *Chem Rev* **2019**, *119*, 4180-4220, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00504.

79. de la Torre, M.C.; Sierra, M.A. Comments on recent achievements in biomimetic organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 160-181, doi:10.1002/anie.200200545.
80. Timalisina, D.; Pokhrel, K.P.; Bhusal, D. Pharmacologic Activities of Plant-Derived Natural Products on Respiratory Diseases and Inflammations. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, 1636816:1-1636816:23, doi:10.1155/2021/1636816.
81. Zhang, Z.J.; Morris-Natschke, S.L.; Cheng, Y.Y.; Lee, K.H.; Li, R.T. Development of anti-influenza agents from natural products. *Med Res Rev* **2020**, *40*, 2290-2338, doi:10.1002/med.21707.
82. Vougiotiannopoulou, K.; Corona, A.; Tramontano, E.; Alexis, M.N.; Skaltsounis, A.L. Natural and Nature-Derived Products Targeting Human Coronaviruses. *Molecules* **2021**, *26*, 448:1-448:29, doi:10.3390/molecules26020448.
83. Dulo, B.; Phan, K.; Githaiga, J.; Raes, K.; De Meester, S. Natural Quinone Dyes: A Review on Structure, Extraction Techniques, Analysis and Application Potential. *Waste Biomass Valorization* **2021**, *12*, 6339-6374, doi:10.1007/s12649-021-01443-9.
84. Meyer, G.W.; Bahamon Naranjo, M.A.; Widhalm, J.R. Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking, and resistance to their allelopathic effects. *J Exp Bot* **2021**, *72*, 167-176, doi:10.1093/jxb/eraa462.
85. Babula, P.; Adam, V.; Havel, L.; Kizek, R. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones-their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Curr Pharm Anal* **2009**, *5*, 47-68, doi:10.2174/157341209787314936.
86. Skrzyńska, A.; Romaniszyn, M.; Pomikło, D.; Albrecht, Ł. The Application of 2-Benzyl-1,4-naphthoquinones as Pronucleophiles in Aminocatalytic Synthesis of Tricyclic Derivatives. *J Org Chem* **2018**, *83*, 5019-5026, doi:10.1021/acs.joc.8b00170.
87. Kamo, S.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. Recent topics in total syntheses of natural dimeric naphthoquinone derivatives. *Tetrahedron Lett* **2018**, *59*, 224-230, doi:10.1016/j.tetlet.2017.12.040.

-
88. Widhalm, J.R.; Rhodes, D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic Res* **2016**, *3*, 16046:1-16046:17, doi:10.1038/hortres.2016.46.
89. Suttiyut, T.; Auber, R.P.; Ghaste, M.; Kane, C.N.; McAdam, S.A.M.; Wisecaver, J.H.; Widhalm, J.R. Integrative analysis of the shikonin metabolic network identifies new gene connections and reveals evolutionary insight into shikonin biosynthesis. *Hortic Res* **2022**, *9*, uhab087:1-uhab087:16, doi:10.1093/hr/uhab087.
90. Malik, E.M.; Müller, C.E. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. *Med Res Rev* **2016**, *36*, 705-748, doi:10.1002/med.21391.
91. Duval, J.; Pecher, V.; Poujol, M.; Lesellier, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind Crops Prod* **2016**, *94*, 812-833, doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.056.
92. Cheemalamarri, C.; Batchu, U.R.; Thallamapuram, N.P.; Katragadda, S.B.; Reddy Shetty, P. A review on hydroxy anthraquinones from bacteria: crosstalk's of structures and biological activities. *Nat Prod Res* **2022**, *36*, 6186-6205, doi:10.1080/14786419.2022.2039920.
93. Gessler, N.N.; Egorova, A.S.; Belozerskaya, T.A. Fungal anthraquinones. *Appl Biochem Microbiol* **2013**, *49*, 85-99, doi:10.1134/S000368381302004X.
94. Hafez Ghoran, S.; Taktaz, F.; Ayatollahi, S.A.; Kijjoa, A. Anthraquinones and Their Analogues from Marine-Derived Fungi: Chemistry and Biological Activities. *Mar Drugs* **2022**, *20*, 474:1-474:69, doi:10.3390/md20080474.
95. Rainha, N.; Lima, E.; Baptista, J.; Fernandes-Ferreira, M. Content of hypericins from plants and *in vitro* shoots of *Hypericum undulatum* Schousb. ex Willd. *Nat Prod Res* **2013**, *27*, 869-879, doi:10.1080/14786419.2012.688051.
96. Dias, G.G.; King, A.; de Moliner, F.; Vendrell, M.; da Silva Júnior, E.N. Quinone-based fluorophores for imaging biological processes. *Chem Soc Rev* **2018**, *47*, 12-27, doi:10.1039/c7cs00553a.
97. Patel, O.P.S.; Beteck, R.M.; Legoabe, L.J. Antimalarial application of quinones: A recent update. *Eur J Med Chem* **2021**, *210*, 113084:1-113084:27, doi:10.1016/j.ejmech.2020.113084.

98. Zhang, L.; Zhang, G.; Xu, S.; Song, Y. Recent advances of quinones as a privileged structure in drug discovery. *Eur J Med Chem* **2021**, 223, 113632:1-113632:15, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113632.
99. Aminin, D.; Polonik, S. 1,4-Naphthoquinones: Some Biological Properties and Application. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2020**, 68, 46-57, doi:10.1248/cpb.c19-00911.
100. Dar, U.A.; Kamal, M.; Shah, S.A. 1,4-Naphthoquinone: A Privileged Structural Framework in Drug Discovery. In *Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds*; Shahid-ul-Islam, Banday, J.A., Eds.; Scrivener Publishing LLC: MA, United States, 2021; pp. 133-153.
101. Ngoc, T.M.; Phuong, N.T.T.; Khoi, N.M.; Park, S.; Kwak, H.J.; Nhiem, N.X.; Trang, B.T.T.; Tai, B.H.; Song, J.H.; Ko, H.J.; et al. A new naphthoquinone analogue and antiviral constituents from the root of *Rhinacanthus nasutus*. *Nat Prod Res* **2019**, 33, 360-366, doi:10.1080/14786419.2018.1452004.
102. Uddin, Z.; Song, Y.H.; Curtis-Long, M.J.; Kim, J.Y.; Yuk, H.J.; Park, K.H. Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from *Polygonum cuspidatum* and their inhibitory mechanism. *J Ethnopharmacol* **2016**, 193, 283-292, doi:10.1016/j.jep.2016.08.026.
103. Yang, Y.; Zhao, D.; Yuan, K.; Zhou, G.; Wang, Y.; Xiao, Y.; Wang, C.; Xu, J.; Yang, W. Two new dimeric naphthoquinones with neuraminidase inhibitory activity from *Lithospermum erythrorhizon*. *Nat Prod Res* **2015**, 29, 908-913, doi:10.1080/14786419.2014.957695.
104. Kim, J.Y.; Jeong, H.J.; Park, J.Y.; Kim, Y.M.; Park, S.J.; Cho, J.K.; Park, K.H.; Ryu, Y.B.; Lee, W.S. Selective and slow-binding inhibition of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on glycosyl hydrolase 33 and 34 sialidases. *Bioorg Med Chem* **2012**, 20, 1740-1748, doi:10.1016/j.bmc.2012.01.011.
105. Zima, V.; Radilová, K.; Kožíšek, M.; Albiñana, C.B.; Karlukova, E.; Brynda, J.; Fanfrlík, J.; Flieger, M.; Hodek, J.; Weber, J.; et al. Unraveling the anti-influenza effect of flavonoids: Experimental validation of luteolin and its congeners as potent influenza endonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem* **2020**, 208, 112754:1-112754:23, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112754.

-
106. Yang, Z.; Yang, Y.; Wu, F.; Feng, X. Computational investigation of interaction mechanisms between juglone and influenza virus surface glycoproteins. *Mol Simul* **2013**, *39*, 788-795, doi:10.1080/08927022.2013.769683.
107. Chavan, R.; Shinde, P.; Girkar, K.; Mandage, R.; Chowdhary, A. Identification of Potent Natural Inhibitors against H1N1/A/2009 Virus using *In Silico* Subtractive Genomics Approach and Docking Technology. *Int J Pharm Res* **2014**, *6*, 105-113.
108. 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, doi:10.1007/s00705-019-04223-y.
109. Tandon, V.K.; Singh, R.V.; Yadav, D.B. Synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antiviral, antifungal and anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 2901-2904, doi:10.1016/j.bmcl.2004.03.047.
110. Yamashita, M.; Sawano, J.; Umeda, R.; Tatsumi, A.; Kumeda, Y.; Iida, A. Structure-Activity Relationship Studies of Antimicrobial Naphthoquinones Derived from Constituents of *Tabebuia avellanedae*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2021**, *69*, 661-673, doi:10.1248/cpb.c21-00208.
111. Sharma, G.; Vasanth Kumar, S.; Wahab, H.A. Molecular docking, synthesis, and biological evaluation of naphthoquinone as potential novel scaffold for H5N1 neuraminidase inhibition. *J Biomol Struct Dyn* **2018**, *36*, 233-242, doi:10.1080/07391102.2016.1274271.
112. Zhang, Y.; Han, H.; Qiu, H.; Lin, H.; Yu, L.; Zhu, W.; Qi, J.; Yang, R.; Pang, Y.; Wang, X.; et al. Antiviral activity of a synthesized shikonin ester against influenza A (H1N1) virus and insights into its mechanism. *Biomed Pharmacother* **2017**, *93*, 636-645, doi:10.1016/j.biopha.2017.06.076.
113. Mohammed, M.M.D.; El-Souda, S.S.; El-Hallouty, S.M.; Kobayashi, N. Antiviral and cytotoxic activities of anthraquinones isolated from *Cassia roxburghii* Linn. leaves. *Herba Pol* **2014**, *59*, 33-44, doi:doi:10.2478/hepo-2013-0022.
114. Li, S.W.; Yang, T.C.; Lai, C.C.; Huang, S.H.; Liao, J.M.; Wan, L.; Lin, Y.J.; Lin, C.W. Antiviral activity of aloe-emodin against influenza A virus via galectin-3 up-regulation. *Eur J Pharmacol* **2014**, *738*, 125-132, doi:10.1016/j.ejphar.2014.05.028.

-
115. Pang, X.; Zhao, J.Y.; Liu, N.; Chen, M.H.; Zheng, W.; Zhang, J.; Chen, X.J.; Cen, S.; Yu, L.Y.; Ma, B.P. Anthraquinone analogues with inhibitory activities against influenza A virus from *Polygonatum odoratum*. *J Asian Nat Prod Res* **2021**, *23*, 717-723, doi:10.1080/10286020.2020.1779707.
116. Bei, Y.; Tia, B.; Li, Y.; Guo, Y.; Deng, S.; Huang, R.; Zeng, H.; Li, R.; Wang, G.F.; Dai, J. Anti-influenza A Virus Effects and Mechanisms of Emodin and Its Analogs via Regulating PPAR α / γ -AMPK-SIRT1 Pathway and Fatty Acid Metabolism. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, 9066938:1-9066938:17, doi:10.1155/2021/9066938.
117. Dai, J.P.; Wang, Q.W.; Su, Y.; Gu, L.M.; Zhao, Y.; Chen, X.X.; Chen, C.; Li, W.Z.; Wang, G.F.; Li, K.S. Emodin Inhibition of Influenza A Virus Replication and Influenza Viral Pneumonia via the Nrf2, TLR4, p38/JNK and NF-kappaB Pathways. *Molecules* **2017**, *22*, 1754:1-1754:17, doi:10.3390/molecules22101754.
118. Zhang, S.P.; Huang, R.; Li, F.F.; Wei, H.X.; Fang, X.W.; Xie, X.S.; Lin, D.G.; Wu, S.H.; He, J. Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora* sp. from *Aconitum carmichaeli*. *Fitoterapia* **2016**, *112*, 85-89, doi:10.1016/j.fitote.2016.05.013.
119. Wang, Q.W.; Su, Y.; Sheng, J.T.; Gu, L.M.; Zhao, Y.; Chen, X.X.; Chen, C.; Li, W.Z.; Li, K.S.; Dai, J.P. Anti-influenza A virus activity of rhein through regulating oxidative stress, TLR4, Akt, MAPK, and NF- κ B signal pathways. *PLoS One* **2018**, *13*, e0191793:1-e0191793:19, doi:10.1371/journal.pone.0191793.
120. 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, doi:10.1016/j.indcrop.2019.02.056.
121. Tang, J.; Colacino, J.M.; Larsen, S.H.; Spitzer, W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res* **1990**, *13*, 313-325, doi:10.1016/0166-3542(90)90015-y.
122. Hudson, J.B.; Delaey, E.; de Witte, P.A. Bromohypericins are potent photoactive antiviral agents. *Photochem Photobiol* **1999**, *70*, 820-822.
-

123. Dao, N.; Jang, Y.; Kim, M.; Nguyễn, H.; Pham, D.; Dang, Q.; Nguyen, J.; Yun, B.-S.; Pham, Q.; Kim, J.-C.; et al. Chemical Constituents and Anti-influenza Viral Activity of the Leaves of Vietnamese Plant *Elaeocarpus tonkinensis*. *Rec Nat Prod* **2018**, *13*, 71-80, doi:10.25135/rnp.76.18.04.266.
124. Russell, R.J.; Kerry, P.S.; Stevens, D.J.; Steinhauer, D.A.; Martin, S.R.; Gamblin, S.J.; Skehel, J.J. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 17736-17741, doi:10.1073/pnas.0807142105.
125. Antanasijevic, A.; Hafeman, N.J.; Tundup, S.; Kingsley, C.; Mishra, R.K.; Rong, L.; Manicassamy, B.; Wardrop, D.; Caffrey, M. Stabilization and Improvement of a Promising Influenza Antiviral: Making a PAIN PAINless. *ACS Infect Dis* **2016**, *2*, 608-615, doi:10.1021/acsinfecdis.6b00046.
126. Hossan, M.S.; Fatima, A.; Rahmatullah, M.; Khoo, T.J.; Nissapatorn, V.; Galochkina, A.V.; Slita, A.V.; Shtro, A.A.; Nikolaeva, Y.; Zarubaev, V.V.; et al. Antiviral activity of *Embelia ribes* Burm. f. against influenza virus *in vitro*. *Arch Virol* **2018**, *163*, 2121-2131, doi:10.1007/s00705-018-3842-6.
127. Lin, C.W.; Tsai, F.J.; Tsai, C.H.; Lai, C.C.; Wan, L.; Ho, T.Y.; Hsieh, C.C.; Chao, P.D. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. *Antiviral Res* **2005**, *68*, 36-42, doi:10.1016/j.antiviral.2005.07.002.
128. Ho, T.Y.; Wu, S.L.; Chen, J.C.; Li, C.C.; Hsiang, C.Y. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res* **2007**, *74*, 92-101, doi:10.1016/j.antiviral.2006.04.014.
129. Schwarz, S.; Wang, K.; Yu, W.; Sun, B.; Schwarz, W. Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. *Antiviral Res* **2011**, *90*, 64-69, doi:10.1016/j.antiviral.2011.02.008.
130. Park, J.Y.; Kim, J.H.; Kim, Y.M.; Jeong, H.J.; Kim, D.W.; Park, K.H.; Kwon, H.J.; Park, S.J.; Lee, W.S.; Ryu, Y.B. Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 5928-5935, doi:10.1016/j.bmc.2012.07.038.

-
131. Ryu, Y.B.; Park, S.J.; Kim, Y.M.; Lee, J.Y.; Seo, W.D.; Chang, J.S.; Park, K.H.; Rho, M.C.; Lee, W.S. SARS-CoV 3CL^{pro} inhibitory effects of quinone-methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 1873-1876, doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.152.
132. Caruso, F.; Rossi, M.; Pedersen, J.Z.; Incerpi, S. Computational studies reveal mechanism by which quinone derivatives can inhibit SARS-CoV-2. Study of embelin and two therapeutic compounds of interest, methyl prednisolone and dexamethasone. *J Infect Public Health* **2020**, *13*, 1868-1877, doi:10.1016/j.jiph.2020.09.015.
133. Caruso, F.; Singh, M.; Belli, S.; Berinato, M.; Rossi, M. Interrelated Mechanism by Which the Methide Quinone Celastrol, Obtained from the Roots of *Tripterygium wilfordii*, Inhibits Main Protease 3CL^{pro} of COVID-19 and Acts as Superoxide Radical Scavenger. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 9266:1-9266:20, doi:10.3390/ijms21239266.
134. Ye, N.; Caruso, F.; Rossi, M. Mechanistic Insights into the Inhibition of SARS-CoV-2 Main Protease by Clovamide and Its Derivatives: In Silico Studies. *Biophysica* **2021**, *1*, 377-404.
135. Semenov, V.A.; Krivdin, L.B. Combined Computational NMR and Molecular Docking Scrutiny of Potential Natural SARS-CoV-2 M^{pro} Inhibitors. *J Phys Chem B* **2022**, *126*, 2173-2187, doi:10.1021/acs.jpcc.1c10489.
136. Cui, J.; Jia, J. Discovery of juglone and its derivatives as potent SARS-CoV-2 main proteinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **2021**, *225*, 113789:1-113789:8, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113789.
137. Sharad, S.; Kapur, S. Indian Herb-Derived Phytoconstituent-Based Antiviral, Antimicrobial and Antifungal Formulation: An Oral Rinse Candidate for Oral Hygiene and the Potential Prevention of COVID-19 Outbreaks. *Pathogens* **2021**, *10*, 1130:1-1130:15, doi:10.3390/pathogens10091130.
138. Wood, S.; Huffman, J.; Weber, N.; Andersen, D.; North, J.; Murray, B.; Sidwell, R.; Hughes, B. Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Planta Med* **1990**, *56*, 651-652.
139. Liu, Z.; Ma, N.; Zhong, Y.; Yang, Z.Q. Antiviral Effect of Emodin from *Rheum palmatum* against Coxsackievirus B₅ and Human Respiratory Syncytial Virus *In Vitro*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **2015**, *35*, 916-922, doi:10.1007/s11596-015-1528-9.
-

140. Luo, D.; Xiong, S.; Li, Q.G.; Jiang, L.; Niu, Q.W.; He, L.J.; Li, Y.L.; Zhang, Y.B.; Wang, G.C. Terpenoids from the stems of *Celastrus hindsii* and their anti-RSV activities. *Fitoterapia* **2018**, *130*, 118-124, doi:10.1016/j.fitote.2018.08.018.
141. Jung, E.; Lee, J.Y.; Kim, H.J.; Ryu, C.K.; Lee, K.I.; Kim, M.; Lee, C.K.; Go, Y.Y. Identification of quinone analogues as potential inhibitors of picornavirus 3C protease *in vitro*. *Bioorg Med Chem Lett* **2018**, *28*, 2533-2538, doi:10.1016/j.bmcl.2018.05.046.
142. McAuley, J.L.; Gilbertson, B.P.; Trifkovic, S.; Brown, L.E.; McKimm-Breschkin, J.L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 39:1-39:13, doi:10.3389/fmicb.2019.00039.
143. Grienke, U.; Schmidtke, M.; von Grafenstein, S.; Kirchmair, J.; Liedl, K.R.; Rollinger, J.M. Influenza neuraminidase: a druggable target for natural products. *Nat Prod Rep* **2012**, *29*, 11-36, doi:10.1039/c1np00053e.
144. Glanz, V.Y.; Myasoedova, V.A.; Grechko, A.V.; Orekhov, A.N. Inhibition of sialidase activity as a therapeutic approach. *Drug Des Devel Ther* **2018**, *12*, 3431-3437, doi:10.2147/DDDT.S176220.
145. Meng, X.; Wang, Y. Drug Repurposing for Influenza Virus Polymerase Acidic (PA) Endonuclease Inhibitor. *Molecules* **2021**, *26*, 7326:1-7326:10, doi:10.3390/molecules26237326.
146. Kadam, R.U.; Juraszek, J.; Brandenburg, B.; Buyck, C.; Schepens, W.B.G.; Kesteleyn, B.; Stoops, B.; Vreeken, R.J.; Vermond, J.; Goutier, W.; et al. Potent peptidic fusion inhibitors of influenza virus. *Science* **2017**, *358*, 496-502, doi:10.1126/science.aan0516.
147. Gamblin, S.J.; Vachieri, S.G.; Xiong, X.; Zhang, J.; Martin, S.R.; Skehel, J.J. Hemagglutinin Structure and Activities. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2021**, *11*, a038638:1-a038638:20, doi:10.1101/cshperspect.a038638.
148. Wohlgemuth, N.; Lane, A.P.; Pekosz, A. Influenza A Virus M2 Protein Apical Targeting Is Required for Efficient Virus Replication. *J Virol* **2018**, *92*, e0142518:1-e0142518:17, doi:10.1128/JVI.01425-18.

-
149. Uc-Cachón, A.H.; Molina-Salinas, G.M.; Said-Fernández, S.; Méndez-González, M.; Cáceres-Farfán, M.; Borges-Argáez, R. A new dimeric naphthoquinone from *Diospyros anisandra*. *Nat Prod Res* **2013**, *27*, 1174-1178, doi:10.1080/14786419.2012.718770.
150. Te Velthuis, A.J.; Fodor, E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol* **2016**, *14*, 479-493, doi:10.1038/nrmicro.2016.87.
151. Chaimayo, C.; Hayashi, T.; Underwood, A.; Hodges, E.; Takimoto, T. Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein. *Virology* **2017**, *505*, 23-32, doi:10.1016/j.virol.2017.02.008.
152. Portela, A.; Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **2002**, *83*, 723-734, doi:10.1099/0022-1317-83-4-723.
153. Rudnicka, M.; Ludynia, M.; Karcz, W. Effects of Naphthazarin (DHNQ) Combined with Lawsone (NQ-2-OH) or 1,4-Naphthoquinone (NQ) on the Auxin-Induced Growth of *Zea mays* L. Coleoptile Segments. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 1788:1-1788:17, doi:10.3390/ijms20071788.
154. Wang, X.M.; Lin, H.Y.; Kong, W.Y.; Guo, J.; Shi, J.; Huang, S.C.; Qi, J.L.; Yang, R.W.; Gu, H.W.; Yang, Y.H. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic carboxylic acyl shikonin derivatives. *Chem Biol Drug Des* **2014**, *83*, 334-343, doi:10.1111/cbdd.12247.
155. Xin, D.; Li, H.; Zhou, S.; Zhong, H.; Pu, W. Effects of Anthraquinones on Immune Responses and Inflammatory Diseases. *Molecules* **2022**, *27*, 3831:1-3831:25, doi:10.3390/molecules27123831.
156. Xiong, M.; Su, H.; Zhao, W.; Xie, H.; Shao, Q.; Xu, Y. What coronavirus 3C-like protease tells us: From structure, substrate selectivity, to inhibitor design. *Med Res Rev* **2021**, *41*, 1965-1998, doi:10.1002/med.21783.
157. Sternberg, A.; Naujokat, C. Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sci* **2020**, *257*, 118056:1-118056:17, doi:10.1016/j.lfs.2020.118056
-

ANEXO II: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

- Chan-Zapata, I., Ayora-Talavera, G., Borges-Argáez, R., Cetina-Montejo, L., Escalante-Erosa, F., Aguilar-Hernández, V., Brito-Argáez, L. Synthesis, cytotoxicity, and anti-influenza evaluation of zeylanone epoxide and derivatives. Estatus: En revisión en *Journal of Asian Natural Products Research*.

SYNTHESIS, CYTOTOXICITY, AND ANTI-INFLUENZA EVALUATION OF ZEYLANONE EPOXIDE AND DERIVATIVES

Ivan Chan-Zapata^a, Rocío Borges-Argáez^{a*}, Guadalupe Ayora-Talavera^b, Lisseth Cetina-Montejo^a, Fabiola Escalante-Erosa^a, Víctor Aguilar-Hernández^{c,d}, Ligia Brito-Argáez^d

^aUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México;

^bDepartamento de Virología, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Mérida, México; ^cCatedrático CONAHCYT, Unidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México; ^dUnidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México

*Corresponding author: Rocío Borges-Argáez; rborges@cicy.mx; Tel.: +52-99-99-42-83-30

Abstract

Zeylanone epoxide (**1**) is a natural naphthoquinone with activity against influenza viruses. In this research, we analyzed the effects of metabolite **1** on influenza A H1N1 and H3N2 protein expression. We also synthesized (**±**)-**1**, (**±**)-zeylanone (**2**), and a protected dimer (**±**)-**5**, with the evaluation of their cytotoxic and antiviral properties against influenza A and B viruses. Natural product **1** decreased the abundance of the hemagglutinin (HA) and matrix (M1) proteins from influenza A viruses. Synthetic molecules (**±**)-**1**, (**±**)-**2**, and (**±**)-**5** showed CC₅₀ values of 33.23, 19.37, and >50 µM, respectively, but only (**±**)-**1** caused a reduction of the cytopathic effect (CPE) at 25 µM in cells infected with viruses at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 (IC₅₀ >12.5 µM). Results demonstrated that natural **1** is a compound with promising anti-influenza activity, but more studies are necessary to elucidate the antiviral mechanism of **1** and the potential anti-influenza properties of the enantiomers from the synthetic racemate.

Keywords: naphthoquinones; natural products; influenza viruses

1. INTRODUCTION

Influenza viruses cause acute respiratory infections that are responsible for seasonal epidemics [1]. However, some viral strains have caused influenza pandemics for over a century [2]. Currently, influenza A H1N1 and H3N2, and B viruses are responsible for seasonal outbreaks, resulting in about 3-5 million cases of severe illness and 290,000-650,000 deaths [3]. Antiviral drugs play an important role in the treatment of influenza, although they can contribute to antiviral resistance [4]. Quinones have emerged as an alternative in the search for new anti-influenza therapies based on natural products [5].

Zeylanone epoxide (**1**) is a dimeric naphthoquinone that was first isolated from *Diospyros anisandra* S. F. Blake (an endemic medicinal plant from the Yucatan peninsula) and displayed activity against influenza A and B viruses [6,7]. Natural product **1** is also found in *Plumbago zeylanica* L. (a medicinal plant used traditionally in Africa and Asia) along with zeylanone (**2**). The first isolation of **2** from *P. zeylanica* L. is over three decades and recently it was shown that **2** is found in *Diospyros maritima* Blume (another plant used in Asian folk medicine) [8-10]. However, there is no evidence that **2** has any anti-influenza activity. Besides, both quinones are produced in small amounts by these plant sources [7,9,10]. This is problematic when transferring the biological activity from compounds available in small amounts to practical applications. Thus, chemical synthesis of natural products has emerged as a strategy to produce these metabolites [11,12]. The synthesis of **1** and **2** have been reported, which were synthesized as proposed in their hypothetical biosynthesis pathway by sequential Michael reactions. Plumbagin (**3**) was used as the starting product and the dimers were obtained as racemic mixtures [13].

The aim of this study was to synthesize and determine the cytotoxicity and anti-influenza activity of ($\pm$)-**1**, ($\pm$)-**2**, and a protected analog ($\pm$)-**5**. Considering the antiviral properties of **1**, we also examined if this natural product affected the abundance of proteins involved in the replication cycle of influenza viruses.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Chemical synthesis of naphthoquinones

The synthesis of the naphthoquinone-type derivatives was carried out according to the strategy shown in Figure 1. The compounds were synthesized and purified according to previous procedures [7,10,13].

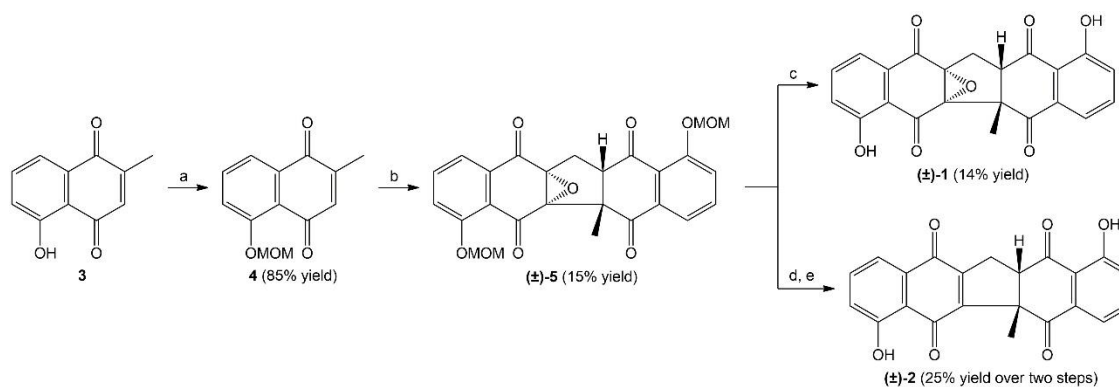


Figure 1. General procedure for the synthesis of (±)-zealanone epoxide (**1**), (±)-zealanone (**2**), and (±)-**5**. Reagents and conditions: a) 60% NaH in paraffin oil, dry DMF, MOMCl, 0°C; b) 1 M KOH in MeOH, CH₂Cl₂/MeOH (1:1), O₂, 0°C; c) AcOH, 100°C; d) KI, AcOH, N₂, 100°C; e) *p*-TsOH·H₂O, toluene, 70°C.

Compound **4** was obtained by protecting the hydroxyl group of **3** with methoxymethyl chloride (MOMCl). The authors emphasized the importance of the protective reaction since **3** decomposes under the basic conditions suitable for dimerization [13]. In our work, an 85% yield (0.54 g) was obtained from similar reaction conditions. The spectrometric and spectroscopic data agreed with those reported for **4** (Figure S1). This compound was used in the next step of the (±)-**1** and (±)-**2** synthesis, which consisted of Michael additions since the proposed biosynthetic pathway for these molecules would involve dimerization reactions from **3** [8,10,13]. Dimerization occurs because 1,4-naphthoquinones contain an electron-deficient double bond, so they act as electrophiles in Michael additions and couple with their tautomeric forms (1,4-naphthohydroquinones) [14,15].

The synthesis of an analog with the hydroxyl groups protected as methoxymethyl ether (MOMO) has been reported. This analog (±)-**5** was synthesized by dimerization under basic conditions and an O₂ atmosphere. The authors obtained (±)-**5** in 63% yield (21.0 mg) from **4** (32.0 mg) [13]. We used a larger amount of **4** (0.20 g) but the reaction crude solid was not purified by column chromatography since in previous tests done in our laboratory we observed a drastic decrease in yield. The crude solid was washed with acetone to remove impurities, and the spectroscopic data for the solid resulting from a 15% yield (62.7 mg) were in agreement with those described for (±)-**5** (Figure S2).

The synthesis of (±)-**1** was carried out by hydrolysis of (±)-**5** in acetic acid (AcOH) at 100°C, while (±)-**2** was synthesized after two steps: a deprotection reaction in an acidic medium with (±)-**5** and potassium iodide (KI), followed by a reaction with *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (*p*-TsOH·H₂O) and toluene to induce the epoxide ring opening and form a double bond. The products

were synthesized as racemates and the absolute configurations were established after separating the two enantiomers of **(±)-2** [13]. We synthesized **(±)-1** in 14% yield (14.8 mg) from **(±)-5** (0.13 g), while **(±)-2** was obtained from **(±)-5** (0.16 g) in 25% yield (30.7 mg) after two steps. The spectrometric and spectroscopic data were in accordance with those reported for natural and synthetic **1** and **2** (Figures S3 and S4) [7,9,13].

2.2. Cytotoxicity and antiviral activity

As previously reported, natural product **1** showed a CC₅₀ value of 21.70 μ M after a toxicity assay with Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and inhibited the replication of influenza strains A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2), and B/Yucatan/286/10 (Victoria lineage) in infected cells with a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 (IC₅₀ = 0.65-2.22 μ M). Compound **1** (12.5 μ M) decreased the transcripts of the NP gene that encodes for the viral nucleoprotein (NP) and affected the nuclear export of this protein [7]. We determined whether **1** isolated from *D. anisandra* S. F. Blake stem bark affected the abundance of other viral proteins. Western Blot results showed that **1** (12.5 μ M) decreased the abundance of the hemagglutinin (HA) and matrix (M1) proteins in MDCK cells infected with influenza A H1N1 and H3N2 viruses (Figure 2). HA and M1 signals were observed in the viral controls and are determinative of viral activity.

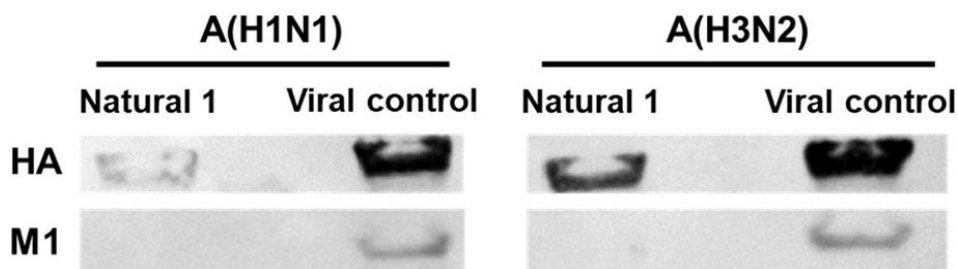


Figure 2. Effect of natural zeylanone epoxide (**1**) on the abundance of HA and M1 proteins.

HA and M1 are important proteins in influenza virus replication. HA is the most abundant protein on the viral particle surface and initiates the infectious process, while M1 is the most abundant protein within the viral envelope membrane and forms the matrix layer [16,17]. After the replication process, the M1 protein interacts with viral ribonucleoproteins (vRNPs) through the NP protein. M1 protein also links to viral nuclear export protein (NEP) and forms the daisy chain complex (vRNP-M1-NEP). NEP interacts with chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein and RanGTP protein, which results in the vRNP protein complex exportation to the cytoplasm for virion assembly [18,19].

Considering that **1** affected the gene expression and extranuclear translocation of NP protein, it has been suggested that **1** could inhibit the formation and cytoplasmic export of the daisy chain complex [7]. In our study, we determined that **1** alters the abundance of M1 protein, a key protein of this complex. Therefore, it is probable that this metabolite inhibits other proteins of the daisy chain complex, which would confirm this hypothesis. Inhibition of the production of M1 and HA proteins could block the formation of new virions, but it is necessary to evaluate if **1** is able to inhibit the production of other viral proteins.

The cytotoxicity and antiviral properties of the synthetic naphthoquinones **(±)-1**, **(±)-2**, and **(±)-5** were determined following previously reported protocols [20,21]. Cytotoxicity was evaluated in MDCK cells and subsequently, the antiviral effects of the dimers were determined in cells infected with influenza A and B viruses (Table 1). All compounds did not exert a reduction of the cytopathic effect (CPE) in MDCK cells infected at a MOI of 0.01. Naphthoquinone **(±)-1** caused a significant antiviral effect at 25 μ M in cells infected at a MOI of 0.001, with percentages of CPE reduction (%RCPE) ranging from 78.57 to 94.28% (Figures S5-7).

Table 1. Cytotoxicity and activity of **(±)**-zeylanone epoxide (**1**), **(±)**-zeylanone (**2**), and **(±)-5** against influenza A and B viruses.

Compound	CC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
		Influenza A and B viruses
(±)-1	33.23 $\pm$ 3.64	>25 ^a
		>12.5 ^b
(±)-2	19.37 $\pm$ 3.57	>12.5 ^a
(±)-5	>50	>50 ^a

Data represent the mean $\pm$ SD of three experiments in quadruplicate. CC₅₀: Mean (50%) cytotoxic concentration. IC₅₀: Mean (50%) inhibitory concentration. ^aMOI = 0.01. ^bMOI = 0.001.

Generally, natural products are biosynthesized in an enantiomerically pure form (+ or -), although some metabolites are produced as racemates [22]. It has been determined by optical rotation that **2** is found in *P. zeylanica* L. as a racemic mixture [8]. However, it has not been reported whether **1** is biosynthesized as an enantiomer or a racemate. Likewise, the absolute configurations of **1** and **2** have not been established [6,9].

CC₅₀ value of **(±)-1** synthesized in our work and natural **1** were different. In contrast to **1** isolated from *D. anisandra* S. F. Blake, **(±)-1** only induced a reduction of CPE in cells infected with influenza viruses at a lower MOI and at the highest concentration tested. These results suggest

that metabolite **1** was isolated in an enantiomerically pure form, subject to the absolute configuration assignment of its structure.

In racemic mixtures, one of the enantiomers is active and another is inactive, less active, toxic, or may have other pharmacological properties. The enantiomers of a compound can also show the same biological activity or produce a synergistic effect [23,24]. Hence, several hypotheses can be proposed to explain the results for **(±)-1**: it is possible that **(±)-1** displayed an antiviral effect up to 25 μ M because one of the two enantiomers is active, considering that a greater amount of the bioactive enantiomer would be found at this concentration. It is probable that the other enantiomer is less active or inactive against influenza viruses.

On the other hand, the resulting data of **(±)-2** and **(±)-5** allows us to suggest that both enantiomers of each naphthoquinone do not have anti-influenza activity, considering that these synthetic dimers exhibited significant cytotoxicity at concentrations higher than 12.5 and 50 μ M, respectively. The epoxide ring (lacking in **(±)-2**) and hydroxyl groups (lacking in **(±)-5**) also appear to be fundamental in the antiviral activity of **1**, but more studies are necessary.

Unlike other metabolites, evidence regarding the antiviral properties of natural or synthetic racemic quinones is very limited [25,26]. Chirality and stereochemistry are key concepts to consider in the evaluation of the antiviral effects of these molecules. Thus, the absolute configuration assignment of metabolite **2** and the determination of its toxicity in MDCK cells and anti-influenza activity are relevant to identify potential differences with natural **1**, **(±)-1**, **(±)-2**, and **(±)-5**. Furthermore, the separation of the enantiomers belonging to these racemates and the evaluation of their biological activity are also important to confirm the proposed hypotheses [27,28]. After identifying the enantiomer of **(±)-1** with similar activity as natural product **1**, it is essential to perform other experiments to establish the mechanism of action by which **1** exerts its anti-influenza activity, as well as pharmacological and toxicological assays to ensure that **1** does not induce harmful health effects [23].

In conclusion, the obtained results provide further information on the role of natural products and racemic mixtures of naphthoquinones in the search for anti-influenza molecules. This data establishes the basis for future research to confirm the suggested hypotheses and validate the therapeutic efficacy of the naphthoquinones evaluated in our study.

3. EXPERIMENTAL

The detailed methods are listed in the supplementary material.

Acknowledgements

Chan-Zapata is grateful to CONAHCYT for a scholarship (grant number: 787552).

Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

Funding

This research was supported by CONAHCYT (grant number: 27652).

REFERENCES

- [1] M. Javanian, M. Barary, S. Ghebrehewet, V. Koppolu, V. Vasigala, and S. Ebrahimpour, *J. Med. Virol.* **93**, 4638 (2021).
- [2] A. D'Adamo, A. Schnake-Mahl, P.H. Mullachery, M. Lazo, A.V. Diez Roux, and U. Bilal, *SSM Popul. Health* **21**, 101314 (2023).
- [3] World Health Organization. Influenza (Seasonal) (2018). Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- [4] E.A. Govorkova, E. Takashita, R.S. Daniels, S. Fujisaki, L.D. Presser, M.C. Patel, W. Huang, A. Lackenby, H.T. Nguyen, D. Pereyaslov, A. Rattigan, S.K. Brown, M. Samaan, K. Subbarao, S. Wong, D. Wang, R.J. Webby, H.L. Yen, W. Zhang, A. Meijer, and L.V. Gubareva, *Antiviral Res.* **200**, 105281 (2022).
- [5] I. Chan-Zapata, R. Borges-Argáez, and G. Ayora-Talavera, *Molecules* **28**, 4 (2023).
- [6] A.H. Uc-Cachón, G.M. Molina-Salinas, S. Said-Fernández, M. Méndez-González, M. Cáceres-Farfán, and R. Borges-Argáez, *Nat. Prod. Res.* **27**, 1174 (2013).
- [7] L. Cetina-Montejo, G. Ayora-Talavera, and R. Borges-Argáez, *Arch. Virol.* **164**, 1543 (2019).

- [8] A.V.B. Sankaram, A.S. Rao, and J.N. Shoolery, *Tetrahedron* **35**, 1777 (1979).
- [9] J.Q. Gu, T.N. Graf, D. Lee, H.B. Chai, Q. Mi, L.B.S. Kardono, F.M. Setyowati, R. Ismail, S. Riswan, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, S.M. Swanson, D.J. Kroll, J.O. Falkinham III, M.E. Wall, M.C. Wani, A.D. Kinghorn, and N.H. Oberlies, *J. Nat. Prod.* **67**, 1156 (2004).
- [10] C. Ito, T. Matsui, M. Takano, T.S. Wu, and M. Itoigawa, *Nat. Prod. Res.* **32**, 2127 (2018).
- [11] L. Li, Z. Chen, X. Zhang, and Y. Jia, *Chem. Rev.* **118**, 3752 (2018).
- [12] A.G. Atanasov, B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E.H. Heiss, J.M. Rollinger, D. Schuster, J.M. Breuss, V. Bochkov, M.D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V.M. Dirscha, and H. Stuppner, *Biotechnol. Adv.* **33**, 1582 (2015).
- [13] S. Maruo, K. Nishio, T. Sasamori, N. Tokitoh, K. Kuramochi, and K. Tsubaki, *Org. Lett.* **15**, 1556 (2013).
- [14] A. Skrzyńska, M. Romaniszyn, D. Pomikło, and Ł. Albrecht, *J. Org. Chem.* **83**, 5019 (2018).
- [15] S. Kamo, K. Kuramochi, and K. Tsubaki, *Tetrahedron Lett.* **59**, 224 (2018).
- [16] N.C. Wu and I.A. Wilson, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **10**, 8 (2020).
- [17] L. Lin, X. Wang, Z. Chen, T. Deng, Y. Yan, W. Dong, Y. Huang, and J. Zhou, *PLoS Pathog.* **19**, e1011472 (2023).
- [18] E.C. Hutchinson and E. Fodor, *Viruses* **5**, 2424 (2013).
- [19] C. Chaimayo, T. Hayashi, A. Underwood, E. Hodges, and T. Takimoto, *Virology* **505**, 23 (2017).
- [20] M.T. Juárez-Méndez, R. Borges-Argáez, G. Ayora-Talavera, S.E. Escalante-Rebolledo, F. Escalante-Erosa, and M. Cáceres-Farfán, *Nat. Prod. Res.* **36**, 2666 (2022).
- [21] R. Borges-Argáez, R. Chan-Balan, L. Cetina-Montejo, G. Ayora-Talavera, P. Sansores-Peraza, J. Gómez-Carballo, and M. Cáceres-Farfán, *Ind. Crops Prod.* **132**, 468 (2019).

- [22] A. Zask and G. Ellestad, *Chirality* **30**, 157 (2018).
- [23] N. Casado, J. Valimaña-Traverso, M. García, and M.L. Marina, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **50**, 554 (2020).
- [24] G.T.M. Bitchagno, V.A. Nchiozem-Ngnitedem, D. Melchert, and S.A. Fobofou, *Nat. Rev. Chem.* **6**, 806 (2022).
- [25] J.H. Yu, Z.P. Yu, R.J. Capon, and H. Zhang, *Molecules* **27**, 4 (2022).
- [26] T.M. Ngoc, N.T.T. Phuong, N.M. Khoi, S.J. Park, H.J. Kwak, N.X. Nhiem, B.T.T. Trang, B.H. Tai, J.H. Song, H.J. Ko, and S.H. Kim, *Nat. Prod. Res.* **33**, 360 (2019).
- [27] A.N.L. Batista, F.M. Dos Santos, J.M. Batista, and Q.B. Cass, *Molecules* **23**, 2 (2018).
- [28] C. Fernandes, M.E. Tiritan, and M.M.M. Pinto, *Symmetry* **9**, 206 (2017).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Experimental

Synthesis of compounds

Reagents and instrumentation

All starting materials, reagents, and solvents were purchased from various commercial suppliers (Sigma-Aldrich, Fermont, and CTR Scientific). The solvents were used after purification by distillation. Column chromatography with silica gel 60 (200-400 mesh) was used to purify the synthetic compounds (Sigma-Aldrich). Preparative thin layer chromatography (TLC) glass plates and TLC aluminum sheets with silica gel 60F254 were also employed for the purification of the molecules and to examine the purity of compounds, respectively (Merck KGaA).

Gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS) analyses were done on an Agilent Technologies 7840A gas chromatographer coupled to an Agilent Technologies 5975C mass detector, with an Agilent Technologies 19091S-433HP-5MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 5% phenyl- 95% methylpolysiloxane). The samples were dissolved in dichloromethane (CH_2Cl_2) and 1.5 μ L was injected. Ultra-high purity helium as carrier gas was used (flow rate of 1 mL/min)

and the temperature conditions were: 80°C for 5 min, then it was increased 10°C/min to 110°C for 1 min and 6°C/min to 270°C for 15 min. Mass spectra were analyzed with MestReNova[®] version 14.2.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain) and the mass spectra fragmentation patterns were compared with those reported in the NIST 11 library (Standard Reference Data, Maryland, USA).

Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)-MS analyses were done on a Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC instrument coupled to a Thermo Scientific LTQ Orbitrap Fourier Transform mass spectrometer equipped with an electrospray ionization probe (HESI-II). Chromatographic separations were carried out on a Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ column (100 mm x 2.1 mm x 3 µm). The samples were dissolved with 0.1% formic acid in methanol (MeOH) and 2 µL was injected. A flow rate of 0.2 mL/min was used, with a gradient of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B): 5% B at 0 min, 20% B at 1 min, 100% B at 10 min (holding for 0.5 min), and 10% B at 11 min (holding for 11.7 min). Mass spectra were analyzed with the Xcalibur[®] and MassFrontier[®] programs (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian/Agilent 600 MHz AR PremiumCOMPACT spectrometer at a frequency of 600 MHz. Deuterated chloroform (CDCl₃) was used as a solvent. Chemical shifts (δ) were given in parts per million (ppm) in relation to the CDCl₃ peak (δ 7.26 ppm for ¹H-NMR). Multiplicities were reported as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), doublet of doublets (dd), and multiplet (m). Coupling constant (J) values were shown in Hz. ¹H-NMR spectra were analyzed with MestReNova[®] version 14.2.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

5-methoxymethoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (4)

A solution of 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (plumbagin, **3**, 0.52 g, 2.8 mmol) in anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF, 20 mL) was added to a mixture of 60% sodium hydride (NaH) in paraffin oil (0.17 g, 4.2 mmol) and anhydrous DMF (5.0 mL). The resulting mixture was stirred for 5 min at 0°C and methoxymethyl chloride (MOMCl, 0.30 mL, 4.0 mmol) was also added. The reaction mixture was continuously stirred at 0°C for 1.5 h. Water (25 mL) was then added to quench the reaction and the resulting mixture was extracted with ethyl acetate (EtOAc, 3 x 50 mL). The combined organic phases were washed with a 5% sodium chloride (NaCl) solution (4 x 100 mL), dried with anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄), filtered, and concentrated under reduced

pressure. The crude solid was subjected to flash column chromatography (2.5 x 40 cm) and eluted with hexane (Hx)/EtOAc 6:1. Fractions (93) were collected and compared using TLC. Fractions 60-93 were purified through a new flash column chromatography (2.5 x 40 cm, Hx/EtOAc 6:1). Four fractions were collected and compared on TLC plates. Fractions 3 and 4 gave **4** (0.54 g, 85% yield): Yellow solid, soluble in CH₂Cl₂. R_F: 0.350 (Hx/EtOAc 3:1). GC-MS *m/z*: 232.1 [M]⁺ (C₁₃H₁₂O₄⁺). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-8), 7.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.72 (q, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-3), 5.34 (s, 2H, H-12), 3.53 (s, 3H, H-13), 2.13 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, H-11).

(±)-12,12a-dihydro-1,7-bis(methoxymethoxy)-5a-methyl-5b,11a-epoxy-5H-dibenzo[b,h]fluorene-5,6,11,13(5aH)-tetrone (5)

A solution of 1 M potassium hydroxide (KOH) in MeOH (4.4 mL) and anhydrous CH₂Cl₂/MeOH 1:1 (25 mL) was prepared at 0°C in an O₂ atmosphere. Subsequently, **4** (0.20 g, 0.86 mmol) dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise to the solution and the resulting mixture was left stirring for 26 h (0°C and O₂ atmosphere). After this time, water (40 mL) was added to quench the reaction. The obtained mixture was extracted with CH₂Cl₂ (7 x 80 mL) and the combined organic phases were washed with a 5% NaCl solution (5 x 100 mL), dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude solid was washed with acetone and the obtained white solid was compared on TLC sheets. The white solid was **(±)-5** (62.7 mg, 15% yield) and was used for the synthesis of compounds **(±)-1** and **(±)-2**. R_F: 0.375 (Hx/EtOAc 1:1). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H-9), 7.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.55 (dd, *J* = 11.6, 7.7 Hz, 1H, H-8'), 7.54 (s, 1H, H-9'), 7.47 (m, 2H, H-7, 7'), 5.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-12'b), 5.25 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-12'a), 5.22 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-12b), 5.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-12a), 3.51 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, H-11'b), 3.49 (s, 3H, H-13'), 3.46 (s, 3H, H-13), 2.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 2.75 (dd, *J* = 14.8, 7.9 Hz, 1H, H-11'a), 1.68 (s, 3H, H-11).

(±)-12,12a-dihydro-1,7-dihydroxy-5a-methyl-5b,11a-epoxy-11H-dibenzo[b,h]fluorene-5,6,11,13(5aH)-tetrone (zeylanone epoxide, 1)

Synthetic product **(±)-5** (0.13 g, 0.27 mmol) from the previous reaction was dissolved in acetic acid (AcOH, 10.7 mL) and stirred for 5 h at 100°C. Water (10 mL) was then added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). The combined organic phases were dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude solid was subjected to flash column chromatography (1.5 x 25 cm) with an elution system consisting of Hx/EtOAc 5:1,

4:1, and 3:1. Fractions (35) were collected and compared on TLC sheets. Fractions 18-34 were purified using preparative TLC (Hx/acetone 7:3) and **(±)-1** was recovered with 100% CH₂Cl₂ (14.8 mg, 14% yield): Pale yellow solid, soluble in acetone, chloroform (CHCl₃), and CH₂Cl₂. R_F: 0.275 (Hx/acetone 7:3). UHPLC-FTMS *m/z*: 391.07 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₅O₇⁺). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 12.14 (s, 1H, OH-6), 11.16 (s, 1H, OH-6'), 7.67 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H-9), 7.63 (m, 2H, H-8, 8'), 7.54 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H-9'), 7.23 (m, 2H, H-7, 7'), 3.62 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, H-11'b), 3.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 2.75 (dd, *J* = 15.0, 7.7 Hz, 1H, H-11'a), 1.63 (s, 3H, H-11).

(±)-12,12a-dihydro-1,7-dihydroxy-5a-methyl-5H-dibenzo[b,h]fluorene-5,6,11,13(5aH)-tetrone (zeylanone, 2)

A solution of **(±)-5** (0.16 g, 0.33 mmol) in AcOH (17 mL) was prepared. Subsequently, potassium iodide (KI, 0.27 g, 1.6 mmol) was added to the solution under an N₂ atmosphere at room temperature. The mixture was stirred for 1 h (100°C and N₂ atmosphere) and concentrated under reduced pressure. The obtained crude solid was dissolved in toluene (46 mL) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (*p*-TsOH·H₂O, 0.10 g, 0.57 mmol) was added at room temperature. The resulting mixture was continuously stirred at 70°C for 20 h and water (45 mL) was then added to quench the reaction. The phases were separated and the organic phase was recovered, washed with a 5% NaCl solution (10 x 45 mL), dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under low pressure. The crude solid was purified by flash column chromatography (1.5 x 30 cm) with Hx/EtOAc 5:1 as eluent. Fractions (93) were collected and compared using TLC plates. Fractions 19-39 yielded **(±)-2** (30.7 mg, 25% yield after two steps): Orange powder, soluble in acetone and CH₂Cl₂. R_F: 0.325 (Hx/EtOAc 5:1). UHPLC-FTMS *m/z*: 375.08 [M+H]⁺ (C₂₂H₁₅O₆⁺). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 12.16 (s, 1H, OH-6), 12.05 (s, 1H, OH-6'), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 1H, H-8), 7.59 (m, 2H, H-8', 9'), 7.54 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H-9), 7.28 (m, 2H, H-7, 7'), 3.45 (m, 2H, H-3, 11'b), 3.09 (dd, *J* = 17.3, 7.2 Hz, 1H, H-11'a), 1.83 (s, 3H, H-11).

Biological assays

Cells and viruses

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (donated by Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico, InDRE) were maintained in 1X Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO) and 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/mL penicillin-10,000 µg/mL streptomycin, GIBCO). Influenza viral strains

A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, A/Sydney/5/97 (H3N2), and B/Yucatan/286/10 (Victoria lineage) were provided by the Virology Laboratory of the Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” from the Universidad Autonoma de Yucatan (UADY). Viruses were propagated in MDCK cells with DMEM and 1 µg/mL of trypsin treated with N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, GIBCO). Viruses were stored at -70°C until use and the viral titers were determined by plaque formation assays. Cell maintenance and viral propagation were carried out on a humidified incubator New Brunswick Galaxy 170S at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere.

Cytotoxicity assay

MDCK cells were seeded in 96-well plates at a density of 1x10⁵ cells/well in supplemented DMEM (100 µL/well). Cells were incubated for 24 h (37°C and 5% CO₂) and washed twice with a 1X phosphate-buffered saline (PBS, Gibco) solution. Later, cells were treated with serial dilutions of (**±**)-1, (**±**)-2, and (**±**)-5 (1.562-100 µM) in quadruplicate. Previously, the naphthoquinones were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and then diluted in DMEM at the concentrations used in the bioassays. A cell control (cells without treatment in DMEM) and a DMSO control (cells with 1% DMSO in DMEM) were included in quadruplicate. Cells were incubated for 72 h (37°C and 5% CO₂), washed twice with PBS, and stained with 0.4% crystal violet in MeOH. The plates were incubated at room temperature for 30 min and washed with water. The optical densities (OD) were measured at 490 nm in a VICTOR X3 2030 Perkin Elmer microplate reader and the percentage of cell viability (%CV) was calculated as follows: %CV = (OD_T/OD_{CC}) x 100 (OD_T: OD of treated cells or DMSO control; OD_{CC}: OD of the cell control and was considered as 100% cell viability). The concentration required to reduce cell viability by 50% (mean cytotoxic concentration, CC₅₀) was determined by non-linear regression analysis, plotting the compound concentration (µM) versus the %CV.

Antiviral assay

MDCK cells were seeded in 96-well plates with supplemented DMEM (100 µL/well) and incubated for 24 h (37°C and 5% CO₂). Cells were washed twice with 1X PBS and then infected with the influenza A or B viruses at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 or 0.001 for 1 h (37°C and 5% CO₂). After infection time, serial dilutions of the synthetic naphthoquinones were added in quadruplicate (the range of concentrations of each compound was determined according to their respective CC₅₀ value). All concentrations were prepared in DMEM with TPCK-trypsin at 1 µg/mL.

A viral control (cells infected with influenza A or B viruses) and a cell control (cells without treatment or infection in DMEM) were also added in quadruplicate. Cells were incubated for 72 h (37°C and 5% CO₂) and the cytopathic effect (CPE) was observed under a microscope. Cells were washed twice with PBS and stained with 0.4% crystal violet in MeOH. Finally, the plates were incubated for 30 min at room temperature and washed with water. The OD were measured in the microplate reader at 490 nm and the percentage of CPE reduction (%RCPE) was estimated by the formula: $\%RCPE = [(A-B)/(C-B)] \times 100$ (A: OD of treated cells; B: OD of the viral control and was considered as the maximum observable CPE; C: OD of the cell control and was considered as 100% cell viability). Likewise, the concentration required to inhibit viral CPE by 50% (mean inhibitory concentration, IC₅₀) was calculated by non-linear regression analysis, plotting the compound concentration (μM) versus the %RCPE.

Western Blot

MDCK cells were seeded in 24-well plates at a density of 5x10⁵ cells/well in supplemented DMEM (500 μL/well) and incubated for 24 h (37°C and 5% CO₂). Cells were washed twice with 1X PBS and infected with influenza strains A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm and A/Sydney/5/97 (H3N2) at an MOI of 1 for 1 h (37°C and 5% CO₂). Then, cells were treated with natural compound **1** at 12.5 μM in DMEM with TPCK-trypsin (1 μg/mL). A viral control (cells infected with influenza A viruses) was also included and both the treatments and viral controls were added in triplicate. Cells were incubated for 8 h (37°C and 5% CO₂), detached with trypsin, centrifuged, and washed twice with 1X PBS. Later, cells were lysed using RIPA buffer on ice for 15 min, protein concentrations of lysates were determined with a NanoDrop, and equal amounts of proteins in 2X protein-loading buffer were boiled for 5 min. The protein samples were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in 1X PBS for 30 min and washed twice with 0.05% Tween in 1X PBS. The membranes were incubated overnight with the primary antibodies of goat anti-influenza A hemagglutinin (HA) or mouse anti-influenza matrix (M1) protein (AbD Serotec) at 1:1,000 dilution. After washing thrice with 0.05% Tween in 1X PBS, the membranes were also incubated for 2 h with secondary antibodies rabbit anti-goat IgG or goat anti-mouse IgG (AbD Serotec) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated at 1:1,000 dilution. The membranes were washed thrice with 0.05% Tween in 1X PBS and revealed using the Vector NovaRED® (SK-4800) kit.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments. Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's *post hoc* test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant in contrast to the control group. CC_{50} and IC_{50} calculations and statistical analyses were performed using the GraphPad Prism[®] version 8.2.1 software (GraphPad Software Inc., California, USA).

Results

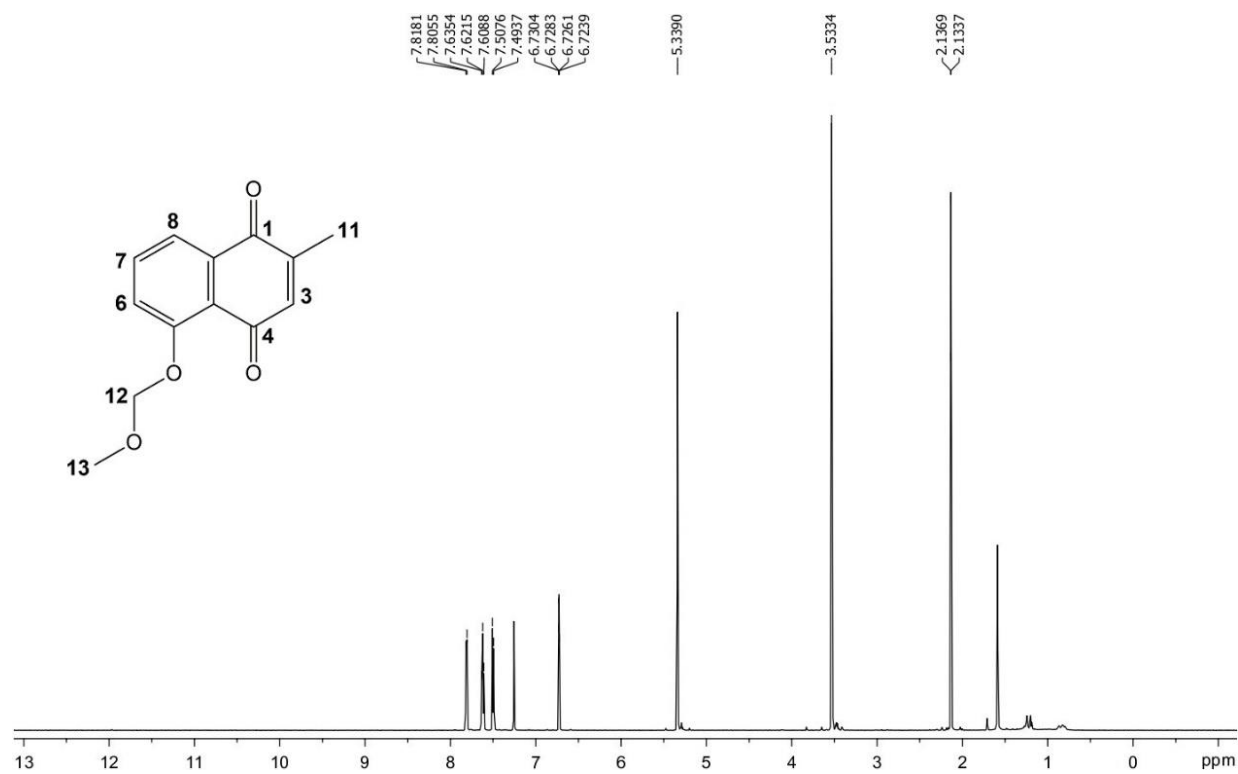


Figure S1. ¹H-NMR spectrum (600 MHz, CDCl₃) of 5-methoxymethoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (4).

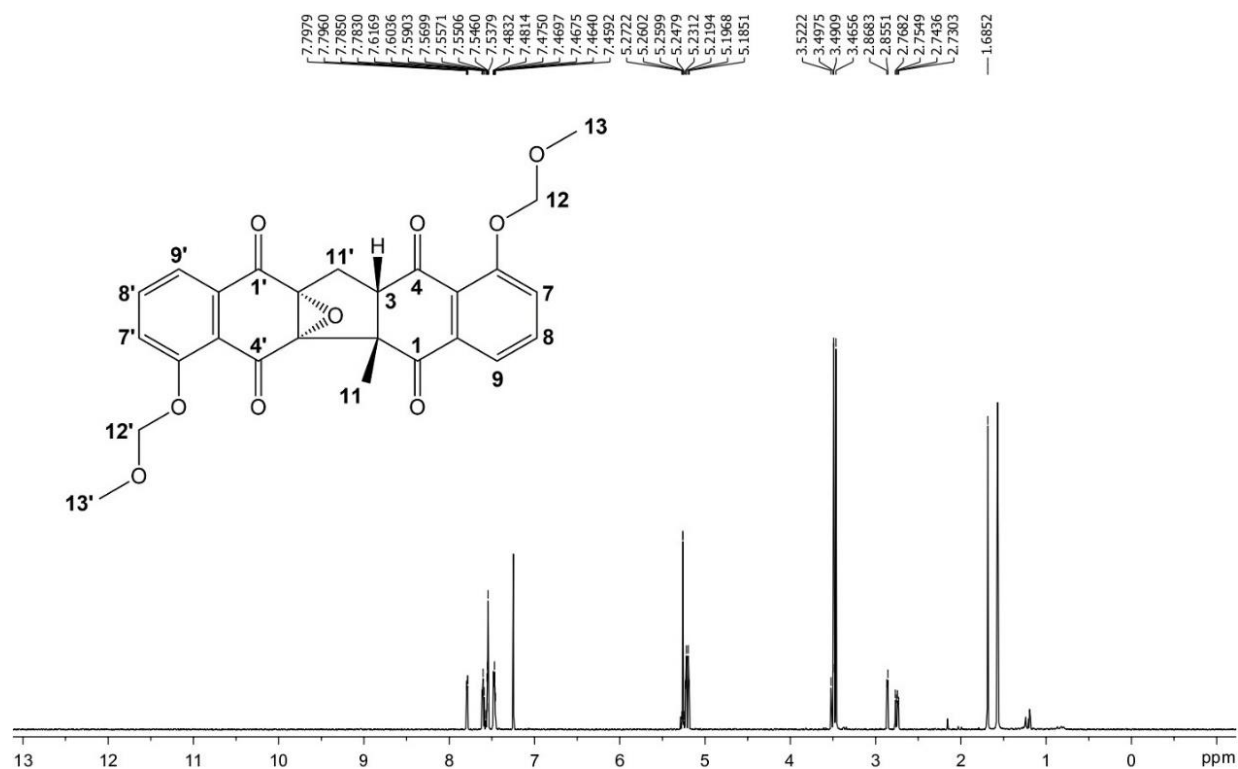


Figure S2. ¹H-NMR spectrum (600 MHz, CDCl₃) of the naphthoquinone (±)-5.

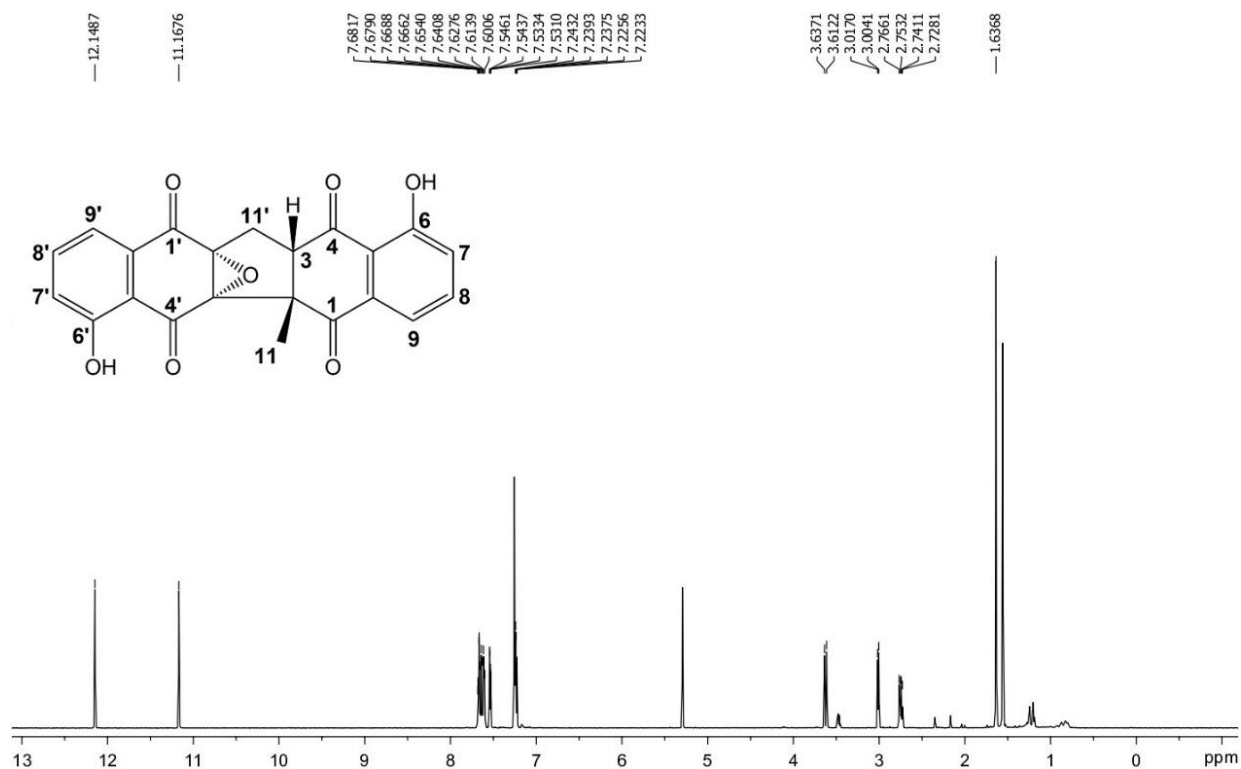


Figure S3. ¹H-NMR spectrum (600 MHz, CDCl₃) of (±)-zeylanone epoxide (1).

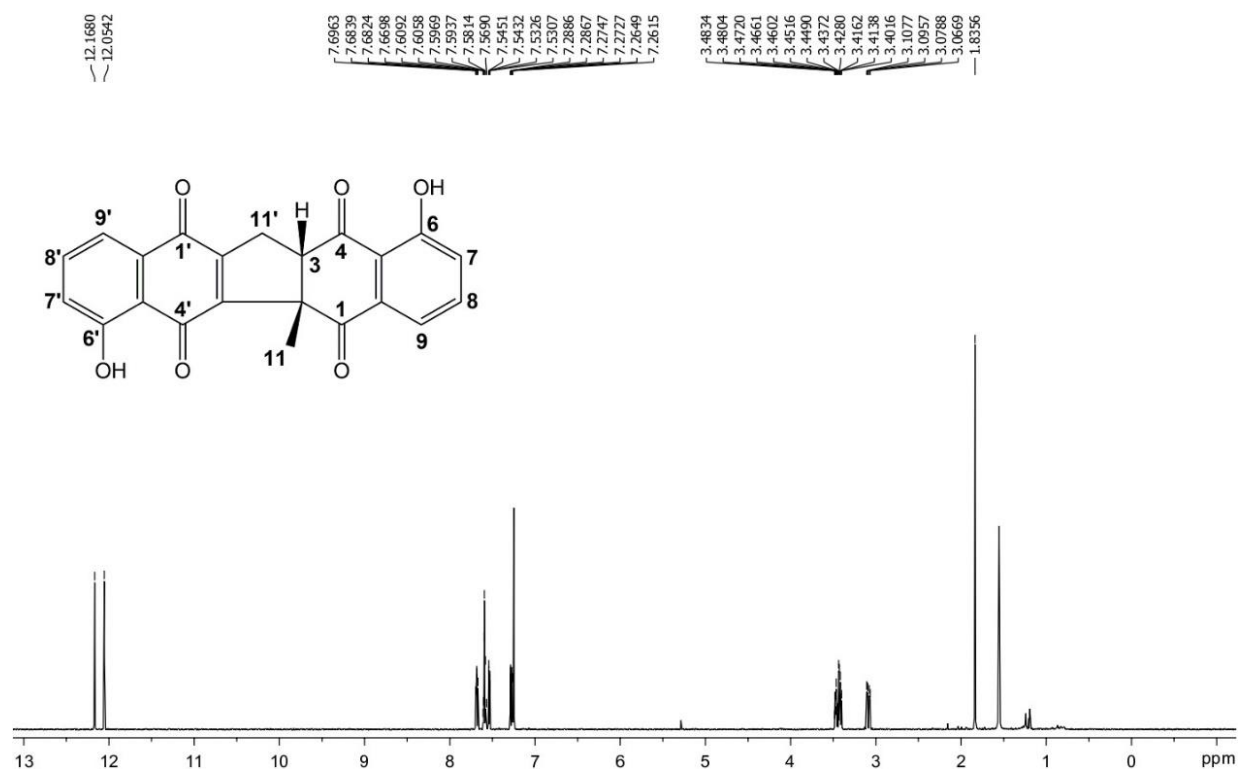


Figure S4. ¹H-NMR spectrum (600 MHz, CDCl₃) of (±)-zeylanone (2).

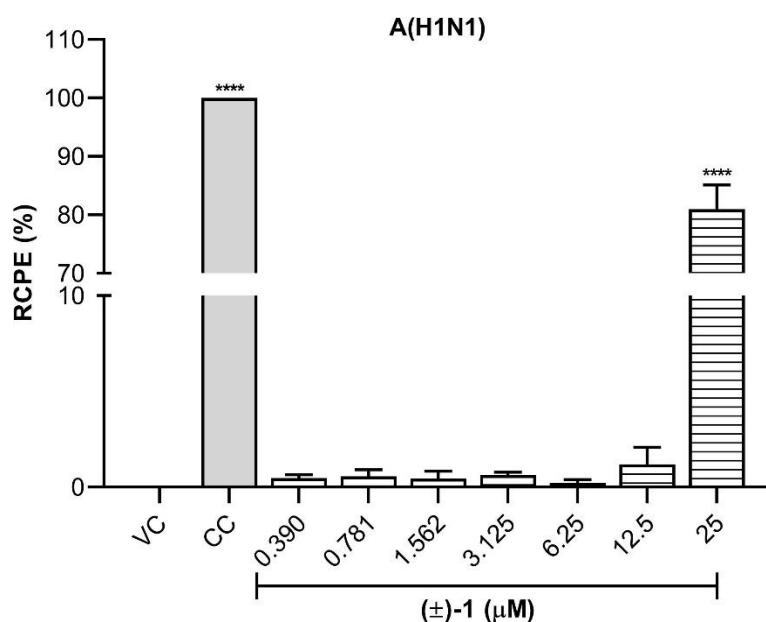


Figure S5. Antiviral effect of (±)-zeylanone epoxide (**1**) in MDCK cells infected with influenza A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm virus (MOI = 0.001). The results represent the mean $\pm$ SD of three experiments in quadruplicate. Data were compared by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test. Values with * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001 were considered statistically significant in contrast to VC. VC: viral control. CC: cell control. MOI: multiplicity of infection. %RCPE: percentage of cytopathic effect reduction.

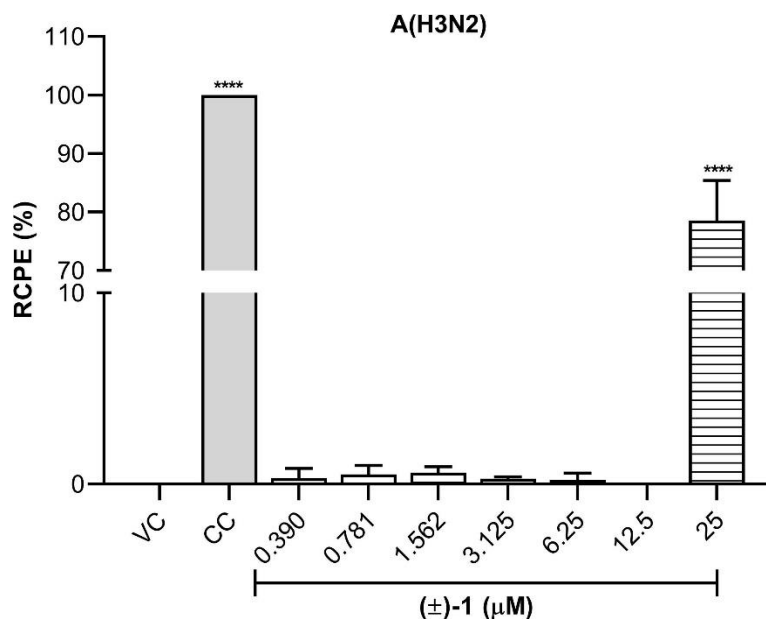


Figure S6. Antiviral effect of (±)-zeylanone epoxide (**1**) in MDCK cells infected with influenza A/Sydney/5/97 (H3N2) virus (MOI = 0.001). The results represent the mean $\pm$ SD of three experiments in quadruplicate. Data were compared by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test. Values with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ were considered statistically significant in contrast to VC. VC: viral control. CC: cell control. MOI: multiplicity of infection. %RCPE: percentage of cytopathic effect reduction.

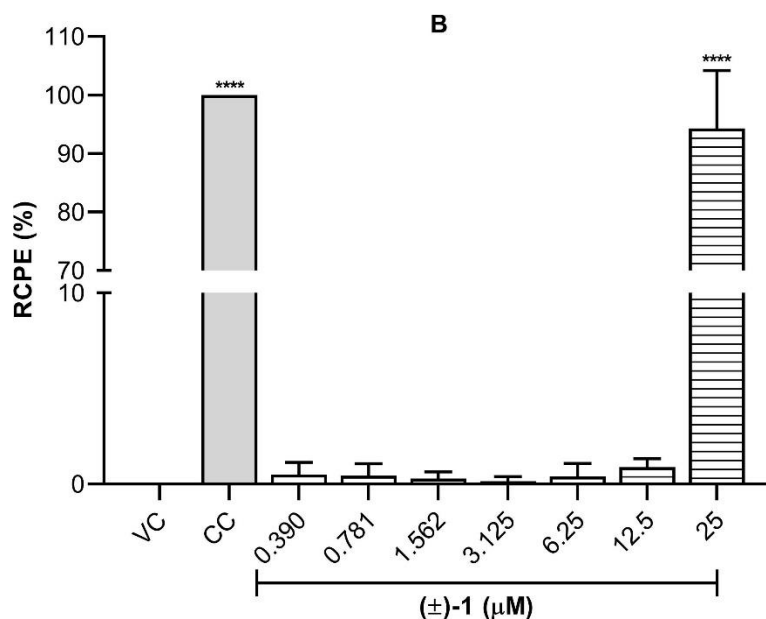


Figure S7. Antiviral effect of (±)-zeylanone epoxide (**1**) in MDCK cells infected with influenza B/Yucatan/286/10 (Victoria lineage) virus (MOI = 0.001). The results represent the mean $\pm$ SD of three experiments in quadruplicate. Data were compared by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test. Values with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ were considered statistically significant in contrast to VC. VC: viral control. CC: cell control. MOI: multiplicity of infection. %RCPE: percentage of cytopathic effect reduction.