

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE LOS  
COMPONENTES PRESENTES EN *Diospyros anisandra*  
S. F. Blake CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIVIRAL A  
NIVEL HEMAGLUTININA Y NEURAMINIDASA

Tesis que presenta

MARI TOÑA JUÁREZ MÉNDEZ

En opción al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2021

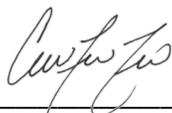
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Mari Toña Juárez Méndez** titulado “**Estudio fitoquímico biodirigido de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* S. F. Blake con potencial actividad antiviral a nivel hemaglutinina y neuraminidasa**” fue realizado en la **Unidad de Biotecnología**, en la línea de investigación de biotecnología de productos naturales en el laboratorio de epigenética y química de productos del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de la **Dra. Rocío Borges Argáez** y de la **Dra. Guadalupe Ayora Talavera** (Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”-UADY), dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de marzo de 2022

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



---

Mari Toña Juárez Méndez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y en el Centro de Investigaciones Regionales “Dr Hideyo Noguchi” de la UADY, y forma parte del proyecto titulado “estudio fitoquímico biodirigido de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* S. F. Blake con potencial actividad antiviral a nivel hemaglutinina y neuraminidasa” bajo la dirección de la Dra. Rocío Borges Argáez y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera (CIR-UADY)



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada N° Beca 222152, al proyecto sectorial salud clave 126763 y al A1-S-27652 CB 2017-2018.

Al CICY por las instalaciones para llevar a cabo mi estancia como estudiante de posgrado.

A la Dra. Rocío Borges Argáez por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y compartir parte de su conocimiento en la dirección de la tesis

A la Dra. Guadalupe Ayora Talavera por su dirección en este trabajo de investigación y permitirme un espacio en el Laboratorio de Virología del CIR "Dr. Hideyo Noguchi"-UADY.

A la QBB. Mirbella Cáceres Farfán por la capacitación para el uso adecuado de los equipos de laboratorio y análisis de muestras en el equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

A la M. E. Fabiola Erosa Escalante por la inyección de muestras en CG-EM de la Unidad de Biotecnología del CICY

A los Doctores Juan Cahuich Rodríguez y Nayeli Rodríguez Fuentes por facilitarnos el uso del lector de placas CITATYON bajo su responsabilidad y a la Dra. María Ortencia González Díaz por el uso del rotaevaporador automatizado marca Buchi de la Unidad de Materiales del CICY.

Al M. en C. Jesús Gilberto Gómez Carballo, a la M. en C. Lisseth Cetina Montejó y al QFB. Manuel Alejandro Parra Cardeña por su capacitación y apoyo en los bioensayos realizados en el CIR "Dr. Hideyo Noguchi"-UADY.

Al Dr. Sigfredo Edmundo Escalante por su experiencia y apoyo en la identificación y colecta del material vegetal.

A los integrantes de mi comité tutorial (Dra. Luisa Alhucema López Ochoa y Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata), ya que cada semestre contribuyó a la mejora de este trabajo.

A mis sínodos del examen predoctoral (Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, Dra. Nancy Santana Buzzy, Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, Dr. Luis Sáenz Carbonell y Dr. Ramiro

Quijano Quiñones-UADY) y examen de grado (Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, Dra. María Azucena Canto Aguilar, Dra. Tania Isolina Coral Martínez-UADY, Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y Dr. Luis Sáenz Carbonell) por el tiempo dedicado para contribuir a mi formación durante mi proceso de estudiante en el posgrado.

A todos aquellos que aportaron su granito de arena para el desarrollo de este trabajo como personal y compañeros del CICY y CIR “Dr Hideyo Noguchi”

## **LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS**

### **Artículos:**

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, 13: 152–155.

Juárez-Méndez, M. T., Borges-Argáez, R., Ayora-Talavera, G., Escalante-Rebolledo, S. E., Escalante-Erosa, F., & Cáceres-Farfán, M. (2021). *Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-hemagglutinin-neuraminidase activity on influenza AH1N1pdm09 virus. Natural product research, 1–6. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1917568>

### **Congresos:**

Participación con el trabajo en modalidad cartel: “Monitoreo de la inhibición de la hemaglutinación de extractos obtenidos a partir de *Diospyros anisandra*, planta cuasi-endémica de la Península de Yucatán” presentado en el “X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste”, llevado a cabo el 11 de febrero de 2021.

Participación con el trabajo en modalidad póster: “Phytochemical Analysis of *Diospyros anisandra* Endemic Plant of The Yucatan Peninsula of Mexico” en “XVIII National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress”, llevado a cabo del 28 al 31 de octubre de 2019.

## DEDICATORIAS

A Jehová, por permitirme el tiempo y proporcionarme las fuerzas necesarias para lograr esta meta, porque inmerecidamente me provee cosas buenas. *“Tuyos, oh, Jehová, son la grandeza, el poder, la hermosura, el esplendor y la majestad, porque todo lo que hay en los cielos y en la tierra es tuyo... Pues todo proviene de ti, y lo que te hemos dado viene de tus propias manos”* (1 Crónicas 29:11-14).

A mis amados padres Isabel y Abelardo, porque siempre han tenido palabras sabias para ayudarme a sobrellevar días difíciles cuando las cosas no salen como uno espera. *“Estas palabras que te estoy mandando hoy tienen que estar en tu corazón, y tienes que inculcarlas en tus hijos...”* (Deuteronomio 6:6-7).

A mis abuelos y tíos por compartir sus consejos y experiencias, porque la familia está ahí para recordarnos que el amor, el respeto, la imparcialidad, la empatía, la responsabilidad, el esfuerzo y el compromiso deben ser valores de todos los días. *“Como manzanas de oro en adornos de plata, así es la palabra dicha en el momento oportuno”* (Proverbios 25:11).

A todas esas personas maravillosas (hermanos, amigos, compañeros) que, con sus palabras de ánimo, sus conocimientos y su compañía suman cosas bellas a mi vida. *“Así como el hierro afila el hierro, un hombre hace mejor a su amigo”* (Proverbios 27:17).

---

---

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1 <b>IMPORTANCIA DEL USO DE LAS PLANTAS</b> .....	<b>3</b>
1.2. <i>DIOSPYROS SPP.</i> .....	<b>5</b>
1.2.1. <i>DIOSPYROS ANISANDRA</i> S.F. BLAKE .....	<b>6</b>
1.3 <b>INFLUENZA. CARACTERÍSTICAS GENERALES</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 <b>INFLUENZA TIPO A. ESTRUCTURA</b> .....	<b>11</b>
1.3.1.2 <b>HEMAGLUTININA</b> .....	<b>12</b>
1.3.1.2 <b>NEURAMINIDASA</b> .....	<b>15</b>
1.3.2 <b>CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL</b> .....	<b>16</b>
1.3.3 <b>EVOLUCIÓN DEL VIRUS</b> .....	<b>17</b>
1.3.4 <b>TRATAMIENTOS</b> .....	<b>18</b>
1.3.4.1 <b>VACUNAS</b> .....	<b>18</b>
1.3.4.2 <b>FÁRMACOS ANTIVIRALES</b> .....	<b>20</b>
1.4. <b>COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN PLANTAS</b> .....	<b>24</b>
1.4.1 <b>EPÓXIDO DE ZEYLANONA</b> .....	<b>29</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>32</b>

---

---

OBJETIVOS PARTICULARES .....	32
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>35</b>
ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDOS A PARTIR DE HOJA, FRUTO, TALLO Y RAÍZ DE <i>DIOSPYROS ANISANDRA</i> MEDIANTE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS Y ESPECTROSCÓPICOS .....	35
2.1 INTRODUCCIÓN.....	35
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
2.3 RESULTADOS .....	47
2.4 DISCUSIÓN.....	62
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>65</b>
<i>DIOSPYROS ANISANDRA</i> PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTI-HEMAGGLUTININ-NEURAMINIDASE ACTIVITY ON INFLUENZA AH1N1PDM09 VIRUS.....	65
3.1 INTRODUCTION .....	66
3.2 RESULTS AND DISCUSSION.....	66
3.3 EXPERIMENTAL .....	70
<b>CAPITULO IV. ....</b>	<b>75</b>
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN SUBFRACCIONES ACTIVAS DE <i>DIOSPYROS ANISANDRA</i> CONTRA INFLUENZA AH1N1 .....	75
4.1 INTRODUCCIÓN.....	75
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	77
4.3 RESULTADOS .....	81
4.4 DISCUSIÓN.....	90

---

---

---

<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>93</b>
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	93
5.1 DISCUSIÓN.....	93
5.2 CONCLUSIONES GENERALES.....	95
5.3 PERSPECTIVAS .....	96
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO(S) .....</b>	<b>121</b>
APÉNDICES.....	121
APÉNDICE A. MATERIAL ADICIONAL CAPÍTULO I .....	121
APÉNDICE B: PERFILES CROMATOGRÁFICOS: CCD, HPLC Y CG-EM .....	123
APÉNDICE C. METODOLOGÍAS.....	131
APÉNDICE D. MATERIAL ADICIONAL CAPÍTULO IV.....	139
APÉNDICE S. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	140



---

---

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Fármacos aprobados por la FDA en el periodo 1981-2019. ....	4
<b>Figura 1.2</b> <i>Diospyros anisandra</i> (A) y su distribución en la península de Yucatán (CICY, 2022) (B).....	6
<b>Figura 1.3</b> Compuestos aislados de la fracción <i>n</i> -hexánica de la corteza de tallo de <i>Diospyros anisandra</i> .....	7
<b>Figura 1.4</b> Esquema de la composición proteica del virión. ....	12
<b>Figura 1.5</b> Estructura en tercera dimensión del monómero y trímero de la hemaglutinina. ....	13
<b>Figura 1.6</b> Estructura del ácido N-acetilneuramínico y la orientación de sus enlaces (A). La presentación de N-glicanos con enlaces $\alpha$ -2,3 que carece de complejidad para interacciones multivalentes con un trímero de HA (B).....	14
<b>Figura 1.7</b> Vista lateral y sitio activo de la neuraminidasa. ....	16
<b>Figura 1.8</b> Ciclo de replicación del virus .....	17
<b>Figura 1.9</b> Cambios Shift y Drift antigénico en el virus de la Influenza tipo A.....	18
<b>Figura 1.10</b> Actividad de los antivirales en distintas etapas de la replicación del virus .....	21
<b>Figura 1.11</b> Estructura química de compuestos que interactúan en los sitios de la NA .....	22
Fuente: tomado y modificado de Shen et al., 2015. ....	22
<b>Figura 1.12</b> Sitios activos de la neuramidasa y la interacción de oseltamivir en las posiciones 150 y 430 loop.....	23
<b>Figura 1.13</b> Estructura química del baloxavir marboxil (A). Sitio de acción del baloxavir marboxil en la endonucleasa PA de influenza A H1N1 (B).....	24
<b>Figura 1.14</b> Alcaloides aislados de plantas con actividad antiviral contra el virus de influenza .	26
<b>Figura 1.15</b> Flavonoides aislados de plantas con actividad antiviral contra el virus de influenza	

---

.....	27
<b>Figura 1.16</b> Acido clorogénico aislado de <i>Locinera japónica</i> Thumb. (42) y ácido caféico (43) que han mostrado actividad antiviral a nivel neuraminidasa del virus de la influenza. ....	28
<b>Figura 1.17</b> Terpenos aislados y sintetizados con actividad antiviral contra el virus de la influenza.....	28
<b>Figura 1.18</b> Compuestos de naturaleza tipo quinona aisladas y sintetizadas para el estudio de actividad antiviral.....	29
<b>Figura 1.19</b> Inmunofluorescencia indirecta del proceso de exportación nuclear de las ribonucleoproteínas virales en ausencia y presencia de EPZ.....	30
<b>Figura 1.20</b> Diagrama de flujo de la estrategia experimental. ....	33
<b>Figura 2.1</b> Diagrama general del procesamiento del material vegetal y obtención de los extractos y fracciones de hoja, fruto, corteza, tallo secundario y raíz a partir de <i>D. anisandra</i> . ....	39
<b>Figura 2.2</b> Diagrama de obtención de extractos <i>n</i> -hexánicos (n-Hx), de acetato de etilo (AcOEt) y acuosos (W) a partir de extractos crudos metanólicos (MeOH) de hojas (H), frutos (F), corteza (C), tallo (T) y raíces (R) de <i>D. anisandra</i> . ....	44
<b>Figura 2.3</b> Diagrama de obtención de fracciones a partir de extractos <i>n</i> -hexánicos (n-Hx) de fruto mediante distintas técnicas cromatográficas .....	45
<b>Figura 2.4</b> Diagrama de obtención de fracciones a partir de extractos de acetato de etilo (AcOEt) de hoja y raíz mediante distintas técnicas cromatográficas.....	46
<b>Figura 2.5</b> CCD de hoja, tallo y raíz observadas a onda corta (A), onda larga (B), revelada en KOH en etanol (C) y en ácido fosfomolibdico (D) de extractos metanolicos a partir de <i>D. anisandra</i> . ....	47
<b>Figura 2.6</b> CCD de 14 subfracciones obtenidas a partir de de la fracción F3 de fruto mediante CCG, comparada con $\beta$ -amirina ( $\beta$ ), betulina (B), campesterol (C), estigmasterol (E), lupeol (L) y sitosterol (S). ....	48

---

---

<b>Figura 2.7</b> Comparación de la fracción 3F23 de fruto (23) y 4R34 de raíz (34) con campesterol (C), $\beta$ -amirina ( $\beta$ ), ácido betulínico (ab), betulina (B), uvaol (U), sitosterol (S), estigmasterol (E) y lupeol (L).....	49
<b>Figura 2.8</b> Comparación de la fracción 3F23 de fruto (F23) y 4R34 de raíz (R34) con ácido betulínico (ab), betulina (B) y uvaol (U), adicionalmente se compararon las fracciones, 4H23 (1), ccgR27(2) y R11 (3).....	49
<b>Figura 2.9</b> Patrón de fragmentación de la plumbagina (5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona). ..	52
<b>Figura 2.10</b> Análisis por cromatografía de gases y por CCD de la fracción F23 (A) y F3-2-5i (B). En cada cromatograma se observan las estructuras de la betulina (9), el uvaol (15) y la plumbagina (1). .....	54
<b>Figura 2.11</b> Análisis por cromatografía de gases y CCD de la fracción HxF6 (A) y 3F48 (B)....	55
<b>Figura 2.12</b> Análisis por cromatografía de gases y CCD de las fracciones obtenidas mediante cromatografía flash.....	56
<b>Figura 2.13</b> Análisis por cromatografía de gases de FIT (A) y FIQ (B) obtenidas por fraccionamiento ácido-base donde se identificó lupeol (5) y $\alpha$ -amirina (16).....	57
<b>Figura 2.14</b> Análisis por cromatografía de gases de la fracción 4R34 (A) y R9i (B). .....	58
<b>Figura 2.15</b> Perfil cromatográfico por CCD (A) y por HPLC (B) de subfracciones (4R34, 4R35 y 4R36) obtenidas por cromatografía de gravedad a partir de la fracción R4 de raíces de <i>D. anisandra</i> .....	60
<b>Figura 2.16</b> Perfil cromatográfico por CCD (A) y por HPLC (B) de subfracciones (4R50, 4R51 y 4R64) obtenidas por cromatografía de gravedad a partir de la fracción R4 de raíces de <i>D. anisandra</i> .....	61
<b>Figure 3.1</b> Haemagglutination and neuraminidase inhibition assay. ....	69
<b>Figura 4.1</b> Interpretación visual del ensayo de hemaglutinación.....	79
<b>Figura 4.2</b> Ensayo de citotoxicidad.....	82
<b>Figura 4.3</b> Ensayo de Inhibición de la hemaglutinación. ....	83

---

---

---

<b>Figura 4.4</b> Ensayo de inhibición de la actividad de la neuraminidasa utilizando una técnica quimioluminiscente.....	85
<b>Figura 4.5</b> Evaluación de la actividad relativa de la neuraminidasa en función de tiempo mediante un ensayo fluorescente.....	86
<b>Figura 4.6</b> Evaluación de la actividad relativa de la neuraminidasa.....	87
<b>Figura 4.7</b> Ensayo de reducción del efecto citopático (REC) de las células MDCK.....	88
<b>Figura 4.8</b> Título viral obtenido a partir del ensayo de hemaglutinación (A) y cuantificación de partículas virales en función del ensayo TCID <sub>50</sub> (B).....	90
<b>Figura A1</b> Fraccionamiento de los extractos obtenidos de <i>D. anisandra</i> utilizando una columna a) CLV, b) cromatografía de permeación en gel y c) un sistema de purificación flash automatizado.....	121
<b>Figura A2</b> Diagrama de obtención de fracciones a partir de extractos <i>n</i> -hexánicos (a) y de AcOEt (b) mediante fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (CLV).....	122
<b>Figura B1</b> Monitoreo por CCD de hoja, raíz y fruto <i>n</i> -hexánicos de <i>D. anisandra</i> .....	123
<b>Figura B2</b> Monitoreo de CCD de subfracciones obtenidas a partir de 40 mg de la fracción tres (F3) de fruto de <i>D. anisandra</i> .....	124
<b>Figura B3</b> Análisis por CCD.....	124
<b>Figura B4</b> Perfil cromatográfico de CG/EM de extractos <i>n</i> -hexánicos.....	125
<b>Figura B5</b> Perfil cromatográfico de CG/EM de las fracciones F2, F3, HxR2, HxR4 y HxR5 obtenidas por CLV de los extractos <i>n</i> -hexánicos de fruto y de raíz de <i>D. anisandra</i> .....	128
<b>Figura B6</b> Perfil cromatográfico de CG/EM de fracciones obtenidas de raíz.....	128
<b>Figura B7</b> Perfil cromatográfico por HPLC de los compuestos presentes en extractos de AcOEt de corteza (A), fruto (B), hoja (C) y tallo secundario (D) de <i>D. anisandra</i> .....	129
<b>Figura B8</b> Perfil cromatográfico por HPLC de los compuestos presentes en extractos acuosos de fruto (A), hoja (B), tallo secundario (C) y raíz (D) de <i>D. anisandra</i> .....	130

---

<b>Figura C1.1</b> Reacción enzimática del ensayo de inhibición de la neuraminidasa mediante fluorescencia. ....	132
<b>Figura C2.1</b> Distribución de las pruebas realizadas en una placa 96 pozos. ....	133
<b>Figura C2.2</b> Evaluación de la actividad neuraminidasa a dos concentraciones de enzima (0.2 U y 0.1 U) y de sustrato (1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.09375 y 0.046875 mM). ....	133
<b>Figura C2.3</b> Establecimiento de las condiciones del protocolo del ensayo de inhibición de la neuraminidasa. ....	134
<b>Figura C3.1</b> Distribución de los compuestos y fracciones sometidos a ensayos de citotoxicidad (A) y reducción del efecto citopático (B), con sus respectivos controles, donde CC es control celular sin infección viral y CV control de células infectadas. ....	134
<b>Figura C3.2</b> Ensayo de un solo ciclo. ....	135
<b>Figura C3.3</b> Ensayo de hemaglutinación. ....	135
<b>Figura C4.1</b> Metodología para TCID <sub>50</sub> . ....	136
<b>Figura C4.2</b> Microplaca de 96 pozos donde se ejemplifica el porcentaje de muerte en función de diluciones del virus. ....	138
<b>Figura D1</b> Monitoreo por CCD de subfracciones de fruto de <i>D. anisandra</i> y ensayos de inhibición de la HA. ....	139
<b>Figure S1</b> Procedure of extraction and fractionation based on haemagglutinin inhibition (HAI), and neuraminidase activity inhibition (NAI) of leave (L), fruit (F), stem bark (S), and roots (R) from <i>Diospyros anisandra</i> . ....	140
<b>Figure S2</b> Haemagglutination inhibition (HAI) assay. ....	141
<b>Figure S3</b> Chromatogram of <i>n</i> -hexane extracts from leaves (A), fruits (B), roots (C), and stem (D), fraction F3 of <i>n</i> -hexane fruit extract (E), and EtOAc root extract (F) from <i>D. anisandra</i> . ....	143
<b>Figure S4</b> Neuraminidase inhibition (NAI) activity. ....	144
<b>Figure S5</b> Fluorescence analysis. ....	145

---

---

---

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Vías comunes de transmisión viral .....	10
Tabla 1.2 Registros históricos de las pandemias causadas por la Influenza en el ser humano .	11
Tabla 1.3 Composición de vacunas para el periodo 2021-2022 aprobadas por la FDA.....	19
Tabla 1.4 Actividad antiviral de EPZ contra cepas del virus de la influenza.....	30
Tabla 2.1 Porcentajes de obtención de extractos metanólicos obtenidos de distintas partes de <i>Diospyros anisandra</i> .....	38
Tabla 2.2 Porcentajes de obtención de extractos <i>n</i> -hexánicos (Hx) y de acetato de etilo (AcOEt) a partir de extractos metanólicos de distintas partes de <i>D. anisandra</i> .....	39
Tabla 2.3 Moléculas presentes en los extractos <i>n</i> -hexánicos de las distintas partes de <i>Diospyros anisandra</i> a diferentes tiempos de retención (TR) en el análisis de CG/MS comparados con la base de datos NIST11. ....	51
Tabla 2.4 Moléculas identificadas mediante la base de datos NIST11 en las fracciones obtenidas a partir de extractos <i>n</i> -hexánicos de fruto y raíz de <i>Diospyros anisandra</i> mediante CG/MS. ....	53
Tabla 4.1 Índice de selectividad de compuestos identificados en fracciones de <i>Diospyros anisandra</i> . ....	89
Table S1 GC/MS analysis with retention times (RT) and peak area of components identified according to NIST library in <i>n</i> -hexanic extracts (fruits, roots, steam bark, and leaves), ethyl acetate roots extract, and fraction F3 from <i>n</i> -hexanic fruit extract of <i>D. anisandra</i> . ....	146
Table S2 Cytotoxic activity on MDCK cells of plant part extracts from <i>D. anisandra</i> by <i>n</i> -hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous extracts (W). ....	147

---

## ABREVIATURAS

**AcOEt:** acetato de etilo

**CC<sub>50</sub>:** concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular

**CCD:** cromatografía de capa delgada

**CCG:** cromatografía en columna de gravedad

**CG-EM:** cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**CLV:** cromatografía líquida al vacío

**CO:** Carboxilato de Oseltamivir

**DGE:** Dirección General de Epidemiología

**EPZ:** epóxido de zeylanona

**FDA:** Food and Drug Administration

**HA:** hemaglutinina

**IC<sub>50</sub>:** 50% de la concentración máxima inhibitoria

**IHA:** inhibición de la hemaglutinación

**INA:** inhibición de la neuraminidasa

**IS:** índice de selectividad por sus siglas en inglés (Index selectivity)

**MDCK:** Mabin Darby Canine Kidney

**MeOH:** metanol

**MOI:** Multiplicidad de infección por sus siglas en inglés (multiplicity of infection)

**NA:** neuraminidasa

***n*-Hx:** *n*-hexano

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBPY:** Provincia Biótica de la Península de Yucatán

**pdm:** pandémica

**REC:** reducción del efecto citopático

**SA:** Sialic acid (Ácido siálico)

**TCDI<sub>50</sub>:** Tissue Culture Infection Dose 50%

---

---



---

## RESUMEN

*Diospyros anisandra* es una especie de amplia distribución en la península de Yucatán, con diversas actividades biológicas, entre las que se encuentra su actividad contra el virus de la influenza AH1N1. El extracto de baja polaridad de corteza de esta especie ha sido el más estudiado, siendo las hojas, raíz y fruto un área poco explorada fitoquímicamente; así como la evaluación de los compuestos contra el virus de la influenza. Aunque el SARS-CoV-2 ha producido una pandemia que afecta a la población desde el año 2020, los virus que causan la influenza siguen teniendo relevancia, ya que a lo largo de más de 100 años han causado cuatro pandemias que han cobrado la vida de más de 50 millones de personas por lo que sigue siendo de importancia el diseño de vacunas y la identificación de nuevas moléculas antivirales.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio fitoquímico de todas las partes vegetales de esta especie y mediante un ensayo biodirigido evaluar la capacidad de inhibición sobre dos de las proteínas más abundantes en la superficie de la membrana del virus: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA); así como la actividad antiviral mediante el ensayo de reducción del efecto citopático (REC) y ensayo de un solo ciclo de replicación viral.

Primeramente, las hojas, corteza del tallo, frutos y raíces de esta especie fueron colectadas, procesadas y maceradas en metanol. Los respectivos extractos metanólicos fueron sometidos a una partición líquido-líquido empleando *n*-hexano y acetato de etilo, obteniéndose los respectivos extractos de baja y mediana polaridad, así como el remanente acuoso. Cada extracto obtenido, fue fraccionado por diversas técnicas cromatográficas y analizado por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM), con excepción de la fase acuosa. Adicionalmente las fracciones obtenidas del extracto de mediana polaridad fueron analizadas por HPLC. Paralelamente, la evaluación de la actividad antihemaglutinina y neuraminidasa se realizó con extractos y fracciones obtenidas de cada parte vegetal, así como su efecto en el ciclo viral. El análisis por CG-EM permitió determinar la presencia de plumbagina en todos los extractos *n*-hexánicos de la planta y la confirmación de compuestos del tipo terpeno mediante coinyección con estándares, así como mediante el análisis por cromatografía de capa delgada (CCD).

Por otro lado, los extractos, las fracciones (3F23, 4R34) y los compuestos identificados en las fracciones (uvaol, betulina, escopoletina, ácido betulínico) fueron evaluados en ensayos de citotoxicidad utilizando células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), ensayos de inhibición de

---

---

la hemaglutinación (IHA) y de la actividad neuraminidasa (INA), esta última utilizando métodos fluorescentes (Amplex® Red y MUNANA) y quimioluminiscentes (NA-Star®). En el ensayo de citotoxicidad, los extractos *n*-Hexánicos fueron los más citotóxicos (raíz:  $CC_{50}=15.4066 \mu\text{g/mL}$ , fruto:  $CC_{50}=19.6946 \mu\text{g/mL}$ , tallo:  $CC_{50}=21.806 \mu\text{g/mL}$  y hojas:  $CC_{50}=25.123 \mu\text{g/mL}$ ) y los extractos acuosos los de menor citotoxicidad (fruto:  $CC_{50}=80.3303 \mu\text{g/mL}$ , hojas, tallo y raíz  $CC_{50}>100 \mu\text{g/mL}$ ).

En el estudio biodirigido de IHA, la fracción F3 y las sub fracciones semipuras (3F23, 3F25, 3F35, 3F48, 3F51) obtenidas a partir del extracto *n*-hexánico de frutos, fueron capaces de inhibir la actividad HA, siendo 3F23 la que logró inhibir dicha actividad hasta un 80% a partir de una concentración de  $25 \mu\text{g/mL}$ . Los compuestos presentes en las fracciones activas de fruto, fueron evaluadas también en el ensayo de IHA, siendo la vitamina E y el lupeol, las moléculas que mostraron actividad IHA a  $100 \mu\text{g/mL}$ .

En cuanto al estudio biodirigido del ensayo INA, los metabolitos presentes en la fracción R4 del extracto de acetato de etilo (AcOEt) de raíz y sus respectivas subfracciones 4R34, 4R35 y 4R36, mostraron fluorescencia por lo que sugirió la presencia de moléculas fluorescentes como cumarinas, las cuales están interfiriendo con las pruebas de actividad de la neuraminidasa; sin embargo, 4R34 mostró reducir en un 30% la actividad de la NA.

Finalmente, la fracción 4R34 ( $>100 \text{ mg/mL}$ ), uvaol y betulina ( $>100 \mu\text{g/mL}$ ) mostraron actividad antiviral, y en los ensayos de un solo ciclo, 4R34 disminuyó las partículas virales en las primeras horas de infección y después de seis horas, por lo que sugiere una acción sinérgica de los compuestos presentes en la etapa inicial y durante la replicación. Esta es la primera vez que se evalúan los compuestos con la cepa viral A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm.

---

---

## ABSTRACT

*Diospyros anisandra* is a widely distributed species in the Yucatan Peninsula, with various biological activities, including activity against influenza AH1N1 viruses. The low polarity bark extract has been the most studied, however, the phytochemistry and antiviral activity against influenza viruses of the leaves, roots, and fruits compounds of this species have not been studied. Although SARS-CoV-2 is a pandemic that affects the population since 2020, the influenza viruses are important because for 100 years, they have caused four pandemics that have claimed the lives of more than 50 million people, so the design of vaccines and the identification of new antiviral molecules remains a priority.

Therefore, the objective of this work was to carry out a phytochemical study about the plant parts of this species and to evaluate the inhibition capacity on the most abundant surface proteins of the virus membrane: the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), and the antiviral activity by the cytopathic effect (CEP) reduction and single-cycle viral replication assays.

First, the leaves, stem bark, fruits, and roots were collected and extracted with methanol. The methanolic extracts were subjected to a liquid-liquid partition using *n*-hexane and ethyl acetate, obtaining the low and medium polarity extracts. The extracts were fractionated by chromatographic techniques and analyzed by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS), except the aqueous phase (liquid-liquid partition residual). Additionally, fractions from ethyl acetate root extracts were analyzed by HPLC. At the same time, the extracts and fractions obtained were evaluated in the anti-hemagglutinin and neuraminidase activity assay, as well as their effect on the viral cycle. The GC-MS analysis allowed us to determine the presence of plumbagin in all *n*-hexane extracts. The confirmation of these compounds was determined by co-injection with standards, as well as their analysis by CCD.

On the other hand, the extracts, the 3F23, 4R34 fractions, and the compounds identified in the fractions (uvaol, betulin, scopoletin, betulinic acid) were evaluated in cytotoxicity tests using MDCK cells (Madin-Darby Canine Kidney), inhibition tests of hemagglutination (IHA) and neuraminidase activity (INA), the latter using fluorescent (Amplex® Red and MUNANA) and chemiluminescent (NA-Star®) methods. In the cytotoxicity test the *n*-Hexane extracts were the most cytotoxic (root:  $CC_{50}=15.4066 \mu\text{g/mL}$ , fruits:  $CC_{50}=19.6946 \mu\text{g/mL}$ , stem:  $CC_{50}= 21.806$

---

---

$\mu\text{g/mL}$  and leave:  $\text{CC}_{50}=25.123 \mu\text{g/mL}$ ), and aqueous extracts those with less cytotoxicity (fruit:  $\text{CC}_{50}=80.3303 \mu\text{g/mL}$ , leave, stem and root  $\text{CC}_{50}>100 \mu\text{g/mL}$ ).

The bio-directed study of the inhibition of HA activity determined that F3 fraction and the semi-pure sub-fractions 3F23, 3F25, 3F35, 3F48, 3F51; obtained of fruit *n*-hexane extract, were able to inhibit HA activity, being 3F23 to inhibit activity up to 80% from a concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$ . The compounds present in the active fruit fractions were also evaluated in the IHA test, vitamin E and lupeol, the molecules that showed a slight IHA activity at 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Regarding the bio-directed study of the INA test, the metabolites present in the R4 fraction of the root ethyl acetate extract (AcOEt), and their respective sub-fractions 4R34, 4R35, and 4R36 showed fluorescence, the presence of coumarins is suggested which are interfering with the neuraminidase activity tests. However, 4R34 was shown to reduce NA activity by 30%.

Finally, the fraction 4R34 (> 100  $\text{mg/mL}$ ), uvaol and betulin (> 100  $\mu\text{g/mL}$ ) showed antiviral activity, and in the single cycle tests, 4R34 decreased the viral particles in the first hours of infection and after 6 hours. Thus, suggesting a synergistic action of the compounds present in the initial stage and during replication. This is the first time that compounds have been evaluated with the viral strain A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm.

---

## INTRODUCCIÓN

Las plantas en la vida del ser humano han sido parte fundamental para su sobrevivencia, ya que han sido ampliamente usadas como alimento, cosméticos, remedio medicinal y en años recientes como fuente de metabolitos para el diseño de nuevos fármacos. En la medicina tradicional, las plantas son parte del vínculo del conocimiento, creencias y experiencias propias de una cultura; muestra de ello es el tiempo dedicado para plasmar a través de la escritura sus aplicaciones en la cotidianidad de aquellos pueblos, como en los escritos del Emperador Shen Nung en China y de los Aryuvedas en la India (Petrovska, 2012).

En México, el empleo de plantas para uso medicinal se registra desde la época prehispánica, contando con un valioso documento conocido como el Códice Florentino (1559) que describe tratamientos medicinales, en su mayoría a base de plantas para el tratamiento de unas setenta enfermedades que eran frecuentes durante esa época; así como el código Badiano (1552) que las presenta de manera ilustrada (Sánchez *et al.*, 2012; Guerra, 1966). Actualmente es tan frecuente recurrir a las plantas, que la Organización Mundial de la Salud (OMS), elaboró un plan estratégico que abarca un periodo de nueve años (2014-2023) con el fin de aprovechar el uso de plantas medicinales de manera segura y eficaz (OMS, 2022).

Una de las áreas de aplicación de los extractos a partir de plantas, es para el tratamiento de enfermedades virales (Ghildiyal & Gabrani 2020; Kapoor *et al.*, 2017), un ejemplo de ello es su actividad contra cepas del virus de la Influenza, ya que este virus además de su fácil dispersión, tiene la capacidad del re-arreglo de genes, lo que resulta en modificaciones y mutaciones del virus creando resistencia a antivirales, generando la necesidad del diseño frecuente de nuevos fármacos y vacunas para su control (Moon *et al.*, 2016).

Estudios realizados sobre la actividad antiviral de extractos y compuestos aromáticos de plantas nativas y endémicas de la Península de Yucatán, se encontró que el epóxido de Zeylanona (EPZ) aislado a partir de extractos *n*-hexánicos de corteza de *Diospyros anisandra* mostró propiedades antivirales contra cepas de virus de influenza A y B. Posteriormente Cetina y colaboradores (2019) determinaron que la actividad de EPZ se mantenía en las primeras etapas del ciclo viral, durante la replicación y liberación de la nucleoproteína viral (NP). Por ello *D. anisandra* al ser considerada una planta endémica de la Provincia Biótica de la Península de Yucatán (PBPY) y dado el potencial antiviral de esta especie, el objetivo de la presente

investigación fue aislar y purificar metabolitos secundarios de fruto, hoja, tallo y raíz, evaluar su actividad antiviral y mecanismo de acción en cepas del virus de la Influenza.

## CAPITULO I

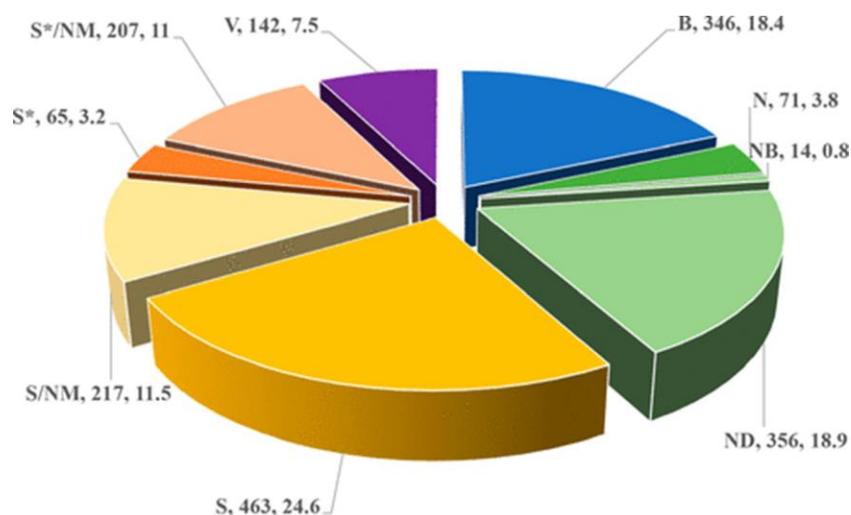
### ANTECEDENTES

#### 1.1 Importancia del uso de las plantas

Las naciones unidas (UN por sus siglas en inglés) en su agenda universal para el 2030, tiene como meta cumplir 17 objetivos de desarrollo sostenible, uno de ellos es asegurar vidas saludables y promover el bienestar para las personas. En el apartado 3c de dicha agenda, menciona medidas importantes para lograr dicho objetivo mediante el apoyo a la investigación, desarrollo de vacunas y medicamentos para las enfermedades que afectan principalmente a los países en desarrollo (UN, 2021).

Dentro de este contexto, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos fármacos con aplicación en el sector salud. Newman y Cragg (2020) llevaron a cabo una recopilación de los fármacos aprobados por la FDA durante el periodo de 1981 hasta 2019, los resultados se aprecian en la figura 1.1 donde el 24.6 % de los medicamentos aprobados, lo ocupan los fármacos sintéticos (S), mientras que la suma del número de fármacos no sintéticos (aislados de animales, microorganismos o plantas) representan un porcentaje mayor, lo que permite concluir que las moléculas de origen natural son de relevancia para su aplicación en el sector salud (Newman & Cragg 2020).

Las plantas son parte vital de los ecosistemas y el fundamento de la biodiversidad; además indispensables para varios rubros de la vida del ser humano, por ejemplo: se les ha aprovechado en la industria alimentaria, textil, producción de energías limpias, biorremediación, cosméticos, por mencionar algunos. El estudio de las plantas como fuente de fármacos es de relevancia a nivel mundial (Salmerón-Manzano *et al.*, 2020) y de gran importancia para varios países en desarrollo, ya que dependen del uso de la medicina tradicional, para satisfacer las necesidades de salud (OMS, 2022) y es parte del legado cultural de países como China, India y México (Sánchez *et al.* 2012; Petrovska, 2012; Guerra, 1966).



**Figura 1.1** Fármacos aprobados por la FDA en el periodo 1981-2019.

Donde B (péptidos/proteínas), N (productos naturales), NB (Producto botánico natural), ND (derivado de un producto natural), S (sintéticos), S/NM (sintéticos que mimetizan un producto natural), S\* (sintéticos a partir de un farmacóforo), S\*/NM (sintéticos a partir de un farmacóforo natural) y V (Vacuna) representan a cada grupo de fármacos (tomado de Newmann & Cragg, 2020).

Por otro lado, existe una simbiosis entre el aprovechamiento de recursos naturales (plantas) con el uso responsable de los mismos; compromiso que se tiene principalmente porque México está considerado entre los 17 países megadiversos (UNEP, 2020). La península de Yucatán es parte de una zona biogeográfica nombrada Provincia Biótica de la Península de Yucatán (PBPY) que comprende los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán, parte de Tabasco y Chiapas; así como los distritos del norte de Belice y el departamento del Petén de Guatemala (Duno-de Stefano *et al.*, 2012).

En esta zona biogeográfica, en lo que respecta a plantas, las familias más ricas son las típicas de ecosistemas terrestres tropicales de tierras bajas como la *Fabaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*, *Orchidaceae* y *Euphorbiaceae*, (Perez-Sarabia *et al.*, 2017; Carnevali *et al.*, 2010). Aunque reducida en número, pero no menos importante, también contiene especies de la familia *Ebenaceae* la cual incluye los géneros: *Lissocarpa*, *Euclea* y *Diospyros*, este último con mayor especies número de especies.

---

## 1.2. *Diospyros spp.*

El género *Diospyros* pertenece a la familia *Ebenaceae*, las plantas de este género tienen uso versátil dependiendo de la especie, ya que algunas poseen frutos comestibles como *D. kaki* y otras son maderables como *D. ebenum*, para uso ornamental o bien como remedio medicinal. Algunos compuestos aislados de las distintas especies destacan las quinonas, flavonoides, polifenoles y triterpenos, validando su actividad como antioxidante, antiinflamatorio, analgésico, antipirético, antihipertensivo, cardioprotector, antidiabético, neuroprotector, antimicrobiano, antiparasitario, insecticida, sedativo, inhibidor enzimático y dermatológico (Rauf *et al.*, 2017a; Mallavadhani *et al.*, 1998).

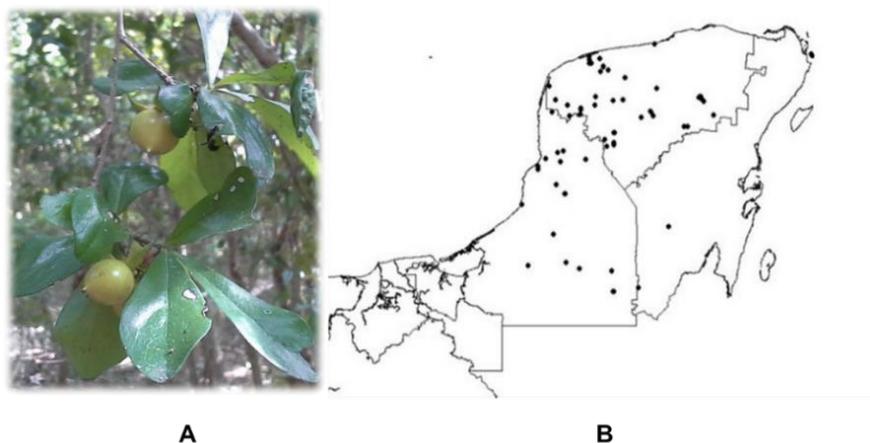
Reportes obtenidos en los últimos años relacionados a las propiedades biológicas de este género, se encuentran para la especie *D. lycioides* y *D. gracilipes* por su actividad antibacterial (Bagla *et al.*, 2016; Rasamison *et al.*, 2016); por su actividad antioxidante en el caso de *D. kaki* (Forouzanfar *et al.*, 2016) y *D. lotus*, (Rauf *et al.*, 2017b). Recientemente se ha reportado la actividad inhibitoria de la absorción de triglicéridos de *Diospyros kaki* y su efecto sinérgico con la especie *Citrus unshiu* en la supresión de lípidos en suero y grasa visceral (Kim *et al.*, 2016); la administración oral en ratas del extracto etanólico de hojas de *D. kaki* inhibió la neurovascularización de córnea sugiriendo más estudios orientados hacia enfermedades oculares; así como sus propiedades antidiabéticas, esta es de las especies más estudiadas del género *Diospyros* (Kashif *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016; Nisar *et al.*, 2012).

En el caso de estudios sobre actividad antiviral, se evaluaron 33 especies representativas del género *Diospyros* contra el virus del dengue, los extractos que contenían mayor cantidad de ácido betulínico, aldehído betulínico y otros triterpenos del tipo lupano y ursano mostraron mayor actividad (Peyrat *et al.*, 2016); en el caso de los taninos aislados de extractos de *D. kaki* mostraron actividad contra Influenza (H3N2, H5N3), herpes simple, estomatitis vesicular, SV (sendai virus), Newcastle, Poliovirus, Coxsackie, Adenovirus, Rotavirus, Calicivirus felino y Norovirus murino (Ueda *et al.*, 2013).

De las aproximadamente 20 especies del género *Diospyros* que se encuentran en nuestro país, ocho se localizan en la PBPY de las cuales tres se encuentran de manera abundante: *D. anisandra*, *D. yucatanensis ssp. Spectabilis* y *D. yucatanensis ssp. Longipedicellata*.

### 1.2.1. *Diospyros anisandra* S.F. Blake

*Diospyros anisandra* S. F. Blake es una especie cuasi-endémica de la PBPY, comúnmente conocida como *k'aakalche'*, *k'ab che'* o *xanob che'*, llega a medir hasta 7 metros de altura, los usos varían dependiendo de la localidad ya sea como madera, elaboración de instrumentos, leña y enfermedades cutáneas como espinillas, sarna e inflamación (Ankli *et al.*, 2002; Duran *et al.*, 1998), se encuentra ampliamente distribuida en la península de Yucatán (figura 1.2).

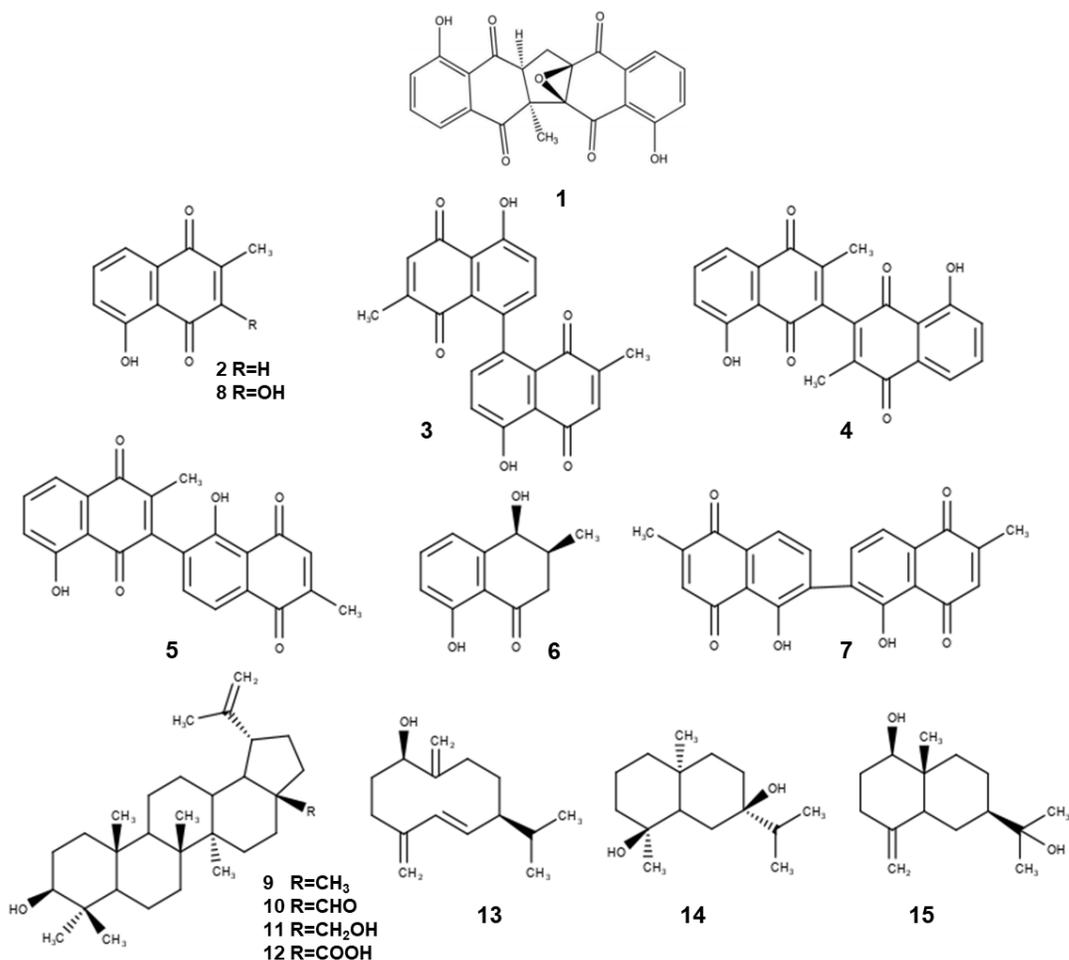


**Figura 1.2** *Diospyros anisandra* (A) y su distribución en la península de Yucatán (CICY, 2022) (B).

Los primeros estudios de carácter fitoquímico para *D. anisandra* fueron reportados en 2013 confirmando la abundancia de compuestos del tipo quinona en los extractos de baja polaridad de corteza, develando que dicha especie contiene epóxido de zeylanona (1) (dímero novedoso de plumbagina) así como 7 naftoquinonas (2-8), 4 triterpenos (9-12) y tres sesquiterpenos (13-15) como se aprecia en la figura 1.3 (Quintal-Novelo *et al.*, 2013; Uc-Cachón *et al.*, 2013).

Referente a la actividad biológica de esta especie, se ha comprobado su uso dermatológico en la medicina tradicional, encontrando que el extracto de baja polaridad de hojas tiene actividad antifúngica, antibiótica y antiinflamatoria, ya que inhibe la actividad NF- $\kappa$ B (Ankli *et al.*, 2002). El estudio sobre el extracto de baja polaridad de la raíz y corteza mostró actividad contra dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y la fracción *n*-hexánica de la corteza mostró actividad (MIC 6.25  $\mu$ g/ml) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Colletotrichum gloeosporioides*, la naftoquinona plumbagina fue uno de los metabolitos responsables de dicha actividad (Uc-Cachón *et al.*, 2013; Borges-Argáez *et al.*,

2007). Otros estudios mostraron que la fracción de baja polaridad de corteza fue la más efectiva contra larvas de garrapata, lo que la coloca como fuente de compuestos con actividad ixodicida (Rosado-Aguilar *et al.*, 2008) y en estudios más recientes se analizaron los extractos de alta polaridad del tallo de colectas realizadas en dos épocas del año (lluvia y seca), donde los extractos obtenidos en la temporada de lluvia tuvieron una mayor actividad antihelmíntica (Flota-Burgos *et al.*, 2017).



**Figura 1.3** Compuestos aislados de la fracción *n*-hexánica de la corteza de tallo de *Diospyros anisandra*

Fuente: tomado y modificado de Uc-Cachón *et al.*, 2013

Cetina-Montejo (2019) evaluó la actividad antiviral de naftoquinonas de *Diospyros anisandra* contra el virus de la influenza, empleando la corteza de la planta, de la cual se aislaron seis naftoquinonas y se procedió a evaluar el ensayo citotóxico en células MDCK, el ensayo de reducción del efecto citopático (REC), actividad antiviral contra cepas de Influenza y ensayos

de tiempo de adición. Como resultado de sus investigaciones determinó que el epóxido de zeylanona (EPZ), posee actividad antiviral contra cepas resistentes de influenza A y B interviniendo en la síntesis de ARN durante la etapa de replicación/traslación y liberación de NP (Cetina-Montejo *et al.*, 2019).

Los estudios anteriores, acrecientan el interés por ahondar en un estudio fitoquímico integral de esta especie, así como la evaluación de la actividad antiviral de sus componentes mayoritarios.

### **1.3 Influenza. Características generales**

Los virus se definen como agentes infecciosos que no pueden multiplicarse por sí solos, son parásitos obligados intracelulares, por lo que requieren de una célula viva (animal, planta, bacteria y hongo) para replicarse; su tamaño varía de los 20 a 400 nm aproximadamente y contienen genomas de ADN o ARN. Dependiendo del tipo de virus pueden codificar de 4 hasta 200 proteínas; se clasifican en base a la forma de sus partículas virales, la estructura y organización de su genoma y el modo de replicación, siendo la clasificación de Baltimore la más utilizada (Koonin *et al.*, 2021; Cann, 2005; Gelderblom, 1996).

El efecto de los virus en el ser humano se ha hecho evidente recientemente en la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19, la cual ha cobrado la vida de más de 4 millones de personas (OMS, 2022). Además los virus son causantes de enfermedades contagiosas de sintomatología moderada (resfriado) hasta severa (ébola) y en algunos casos tienen un papel importante en el desarrollo de varios tipos de cáncer (Reardon *et al.*, 2016; Foxman *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013). Por otro lado son de fácil transmisión, la cual ocurre por distintas vías como la piel, fecal-oral, sexual o por transfusiones sanguíneas, mordida de animales, piquete de insectos respiratoria y/o vía aérea (Leung, 2021; Woolhouse *et al.*, 2012), ejemplo de ellos se parecían en la Tabla 1.1. Para el sector salud dichas enfermedades representan un reto y una preocupación debido a la aparición de nuevos virus, el aumento de resistencia antiviral y factores epidemiológicos; generando un panorama de potencial epidémico y pandémico como lo ha sido en el caso del virus de la Influenza y el recientemente SARS-CoV-2 (Harapan *et al.*, 2020; Łuksza & Lässig, 2014).

La OMS estima que la influenza causa cada año entre tres y cinco millones de casos graves; y entre 290 000-650 000 muertes por complicaciones relacionadas al virus (OMS, 2022). Cifras

---

más recientes muestran que Estados Unidos, en el periodo 2019- 2020 hubo aproximadamente 20,038 hospitalizaciones donde el tipo predominante fue A (H1N1) pdm09 (CDC, 2022). En cuanto a la situación en México, los reportes de influenza se realizan en dos temporadas, la temporada estacional (semana 40 a la 20 donde se presentan el mayor número de casos) y la temporada interestacional (semana 21 a la 39 baja circulación viral de influenza).

En la temporada estacional que comprende 2021-2022 a la fecha se confirmaron 920 casos positivos a influenza: 827 de A (H3N2), 43 de B, y 60 de influenza A; los Estados que se vieron afectados por el virus en la semana 40 a 52 de la temporada estacional fueron Quintana Roo, Yucatán, Nuevo León, Tabasco y Sonora (DGE, 2022). Actualmente debido a la pandemia causada por la COVID 19, los casos reportados para influenza han disminuido, pero aún está en circulación, no por ello sigue siendo un objetivo en la mira para evitar su propagación, además de que el evitar su propagación disminuiría las visitas e ingresos hospitalarios y permitirá que los servicios enfrenten mejor las complicaciones del COVID-19 (Grech & Borg, 2020).

La Influenza es una enfermedad respiratoria aguda causada por un virus de la familia Orthomixoviridae, con aparición desde el siglo XVI y de fácil dispersión a través de brotes en comunidades (Javanian et al., 2021; Medina & García-Sastre, 2011). Se han identificado cuatro tipos de virus de la influenza: A, B, C y D. Los virus A y B causan epidemias estacionales y su sintomatología consiste en fiebre entre 30 a 40°C, tos seca, dolor de garganta moderado, fatiga excesiva, cefalea intensa, dolores de moderados a severos y puede complicarse (neumonía, sinusitis, bronquitis y exacerbación de enfermedades crónicas pulmonares); la cepa H1N1 que causó la pandemia del año 2009 presentó los mismos síntomas a excepción de las complicaciones, las cuales se presentaron con neumonía intersticial, neumonía de focos múltiples o síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto; dichas complicaciones sobrevienen por ausencia del tratamiento correcto y pueden agravar la situación con probabilidades de deceso (Grijalva-Otero et al., 2009). Las infecciones de influenza tipo C causan generalmente una enfermedad respiratoria leve y por ello no han sido ampliamente estudiados; y los virus de influenza D afectan principalmente a animales (Mina & Klugman, 2014).

Las cepas de virus de influenza tipo A y B consisten en viriones esféricos o elongados con diámetros de 80 a 120 nm con 8 segmentos de ssRNA (Carter & Saunders, 2013). En el caso de la influenza tipo A, esta ha generado las pandemias más conocidas de la historia, lo fue en el caso de la famosa gripe española en el año de 1918, cuando aún Europa se recuperaba de

una guerra mundial (Ayora-Talavera, 1999). Aunque no se ha registrado otra de tanta magnitud, le siguieron otras pandemias que afectaron a un número considerable de la población. En la tabla 1.2 se registran los brotes de influenza A que han causado alerta en la población a nivel mundial (Saunders-Hasting & Krewski, 2016).

**Tabla 1.1 Vías comunes de transmisión viral**

Vía	Virus
Respiratoria/aérea	Adenovirus, sarampión, paperas, rubéola, enterovirus D68, virus de la influenza A, virus de la influenza B, rinovirus, virus respiratorio sincitial, virus varicela zoster, viruela, SARS-CoV-2.
Gastrointestinal	Virus Norwalk, rotavirus, poliovirus, enterovirus entéricos, hepatitis A, hepatitis E, sapovirus.
Genital	Virus del papiloma humano, VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes simple-2 (HSV-2)
Piel	Contacto directo: Virus del papiloma humano, HSV-1, virus del molusco  Penetración en la dermis o tejido subcutáneo: Inyección/corte (hepatitis B virus, hepatitis C virus, HIV, Ebola virus), mosquitos (Virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis equina del este, virus Chikungunya, virus de la fiebre amarilla) y garrapatas (Virus Heartland, virus Powassan, virus de la fiebre por garrapatas de Colorado).
Transplacentar	Citomegalovirus, virus de la viruela, HSV-1 y -2, virus del sarampión, virus del Zika, virus de la rubéola
Trasplante/trasfusiones sanguíneas	Virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, VIH, citomegalovirus, virus del Nilo occidental, virus de la rabia, virus de la coriomeningitis linfocítica, VHS, virus zoster, virus linfotrófico T humano-I y -II, virus del dengue, virus del Ébola

Fuente: Tomada y modificada de Louten, 2016.

En el año 2005, la Organización Mundial de la Salud planteó nuevos lineamientos para el manejo de las pandemias, lo cual impulsó a las autoridades locales y nacionales a revisar y actualizar sus planes de preparación para posibles pandemias. La OMS y CDC por sus siglas

en inglés (Centers for Diseases Control) realizan un monitoreo de casos de influenza, ya que las epidemias anuales de gripe pueden afectar gravemente a todas las poblaciones, pero el mayor riesgo corresponde a las embarazadas, niños de 6 a 59 meses, los ancianos, los pacientes con enfermedades como VIH/sida, asma, neumopatías o cardiopatías crónicas, y los profesionales sanitarios (CDC, 2022). Desde el 2009 México lleva a cabo un monitorio semanal de casos de influenza a través de la Dirección General de Epidemiología (DGE), los casos por influenza tipo B, son menores en comparación con las del tipo A, la diferencia estriba en que el tipo A tiene la capacidad de sufrir modificaciones que le permiten una mayor incidencia en la población y mostrar resistencia a los fármacos (Shao *et al.*, 2017).

**Tabla 1.2 Registros históricos de las pandemias causadas por la Influenza en el ser humano**

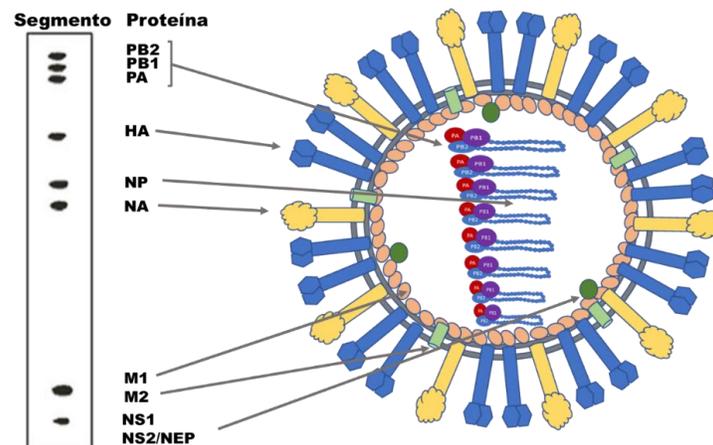
Nombre de la pandemia	Año	Subtipo	Origen sospechado	Número aproximado de muertes
Gripe española	1918-1919	H1N1	China	20-50 millones
Gripe asiática	1957-1958	H2N2	China	1-2 millones
Gripe de Hong Kong	1968-1969	H3N2	China	50000 - 2 millones
Gripe porcina	2009-2010	H1N1	México	>567 000

Fuente: Tomada y modificada de Saunders-Hasting & Krewski, 2016

### 1.3.1 Influenza Tipo A. Estructura

De los cuatro tipos de virus, la influenza A es las más frecuentes, causantes de cuatro pandemias y epidemias anuales; consiste en partículas esféricas que miden de 80 a 120 nm. La envoltura viral está formada por una membrana plasmática de la célula huésped y contiene ocho segmentos de genes que codifican para 10 proteínas virales esenciales, tres de las cuales son proteínas transmembranales: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y M2 (Dou *et al.*, 2018). La proteína M1 soporta la estructura de la envoltura viral y los ocho ARN negativos se encuentran como complejos de ribonucleoproteína viral individual unidos al complejo polimerasa heterotrimérica PB1, PB2 y PA: las cuales tienen un papel en la iniciación del proceso de transcripción (Kordyukova *et al.*, 2019; Te Velthuis & Fodor, 2016). En cuanto a la

proteína NS1, participa en el proceso de evadir el sistema inmune del huésped y bloquear la síntesis de  $\alpha/\beta$  interferones; mientras que la proteína NEP (factor de exportación nuclear por sus siglas en inglés) permite reclutar la ARN polimerasa para la síntesis de ARN viral de sentido positivo y participa en la regulación de otros procesos celulares como en el aumento de traslación del ARNm viral (Rosário-Ferreira *et al.*, 2020; Krejcova & Petr, 2015). Dos de las proteínas más abundantes en el virus de la influenza; HA y NA confieren al virus su clasificación de acuerdo con el arreglo de sus aminoácidos (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Esquema de la composición proteica del virión.

Se observan los ocho fragmentos del genoma viral que codifican las diez proteínas virales, las cuales están representadas en función de su tamaño, siendo las proteínas del complejo de la polimerasa (PB2, PB1 y PA) las de mayor tamaño y NS1 y NS2 las de menor tamaño (tomado y modificado de Pleschka, 2013).

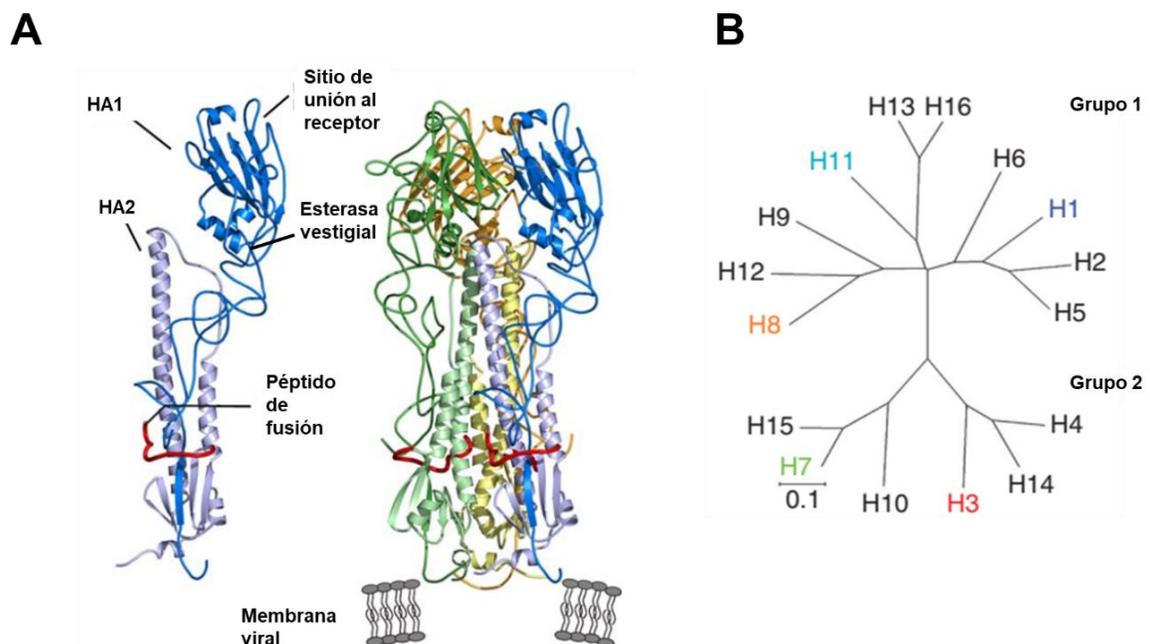
### 1.3.1.2 Hemaglutinina

La hemaglutinina es una glicoproteína en forma de trímero en la superficie de la membrana del virus, cada trímero contiene tres subunidades idénticas formada por dos glicopéptidos (HA1 y HA2). Las subunidades se dividen en cuatro subdominios: el subdominio de unión al receptor, un subdominio vestigial de esterasa, el subdominio de fusión y el subdominio que está anclado a la membrana viral como se observa en la figura 1.5 A (Gamblin *et al.*, 2020).

El término fue asignado por el virólogo George K. Hirst, el cual observó que al agregar el virus de la influenza a los glóbulos rojos causaba que las células se aglutinaran (Hirst 1942) y su

función radica en reconocer las células del tracto respiratorio mediante la unión al ácido siálico, formación del endosoma y liberación del material genético dentro de la célula (Russell *et al.*, 2018; Steinhauer, 1999).

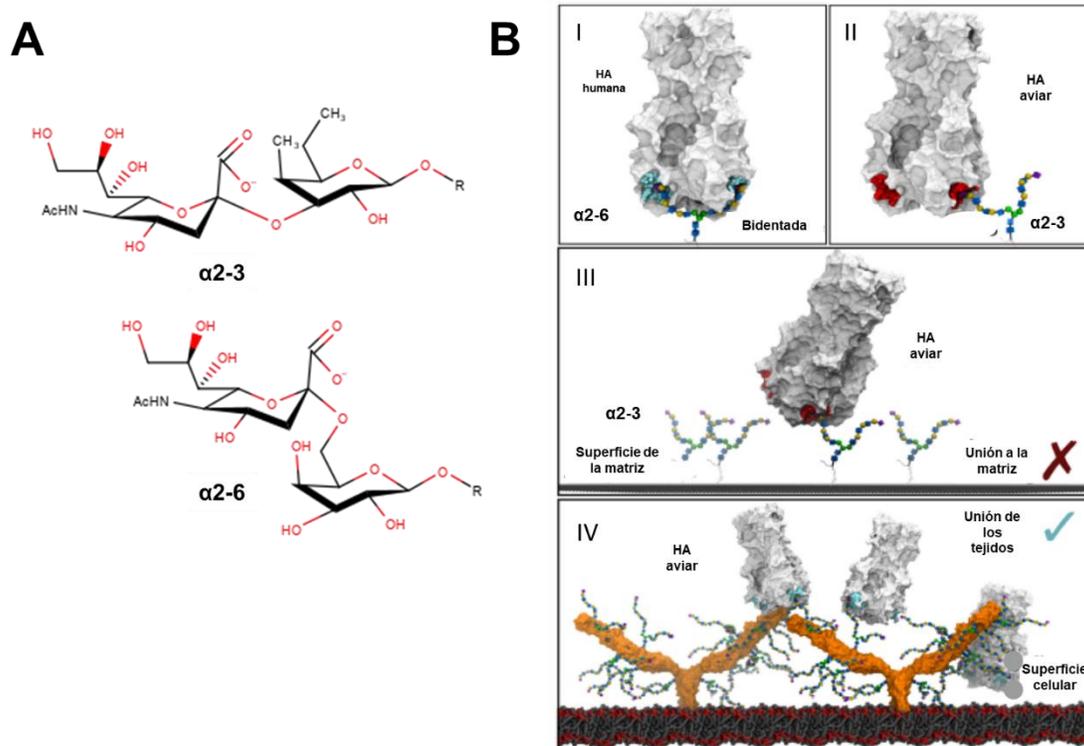
Esta ampliamente estudiado que la HA es determinante importante para la capacidad de infección de las células, hasta ahora han sido identificados 18 subtipos de HA, esta diferencia se debe a las variaciones en el tipo de aminoácido en sitios de la proteína y la similitud entre ellos permite agruparlos en cinco clados (Figura 1.5 B). La HA permite el reconocimiento de las células mediante la unión a glicanos que contienen el ácido siálico, dicha molécula está distribuida de forma heterogénea en el tracto respiratorio del ser humano en sus posiciones  $\alpha$ -2,3 y  $\alpha$ -2,6 (figura 1.6 A), siendo esta ultima la más abundante (Thompson *et al.*, 2019; Wilks *et al.*, 2012).



**Figura 1.5** Estructura en tercera dimensión del monómero y trímero de la hemaglutinina.

Se resalta la zona de unión al receptor de la célula hospedera y la zona que provoca los cambios de conformación durante el proceso de fusión en la célula (**A**). Relación genética entre los 18 tipos de hemaglutininas, donde el grupo 1 consiste en tres clados y el grupo 2 en dos (**B**). Las figuras fueron modificadas y tomadas de Amorij *et al.*, 2008 y Gamblin *et al.*, 2020.

Recientemente un estudio realizado sobre la interacción de la HA con los glicanos, demostraron que una sola molécula de HA con especificidad para infectar células humanas, puede activar un N-glicano ramificado de manera bidentada como se observa en la figura 1.6 B, lo que permite explicar cómo los virus adquieren la especificidad a los glucanos complejos (Nemanichvili *et al.*, 2019).



**Figura 1.6** Estructura del ácido N-acetilneuramínico y la orientación de sus enlaces (A). La presentación de N-glicanos con enlaces  $\alpha$ -2,3 que carece de complejidad para interacciones multivalentes con un trímero de HA (B).

Los sitios de unión de HA están de color cian (indicando la unión multivalente) y rojo (para la no multivalente). (I) Unión bidentada de una HA a un N-glicano ramificado  $\alpha$ -2,6. (II) únicamente se observa la unión específica a un enlace  $\alpha$ -2,3 y HA. (III) los glicanos de la superficie de la célula deben estar espaciados correctamente para que se lleve a cabo la interacción multivalente de HA, por lo que no se lleva a cabo dicha interacción. (IV) la unión multivalente se lleva a cabo aún cubierto con ácido siálico  $\alpha$ -2,3 debido a la densidad de los glicanos en la superficie celular (tomado y modificado de Nemanichvili *et al.*, 2019).

---

### 1.3.1.2 Neuraminidasa

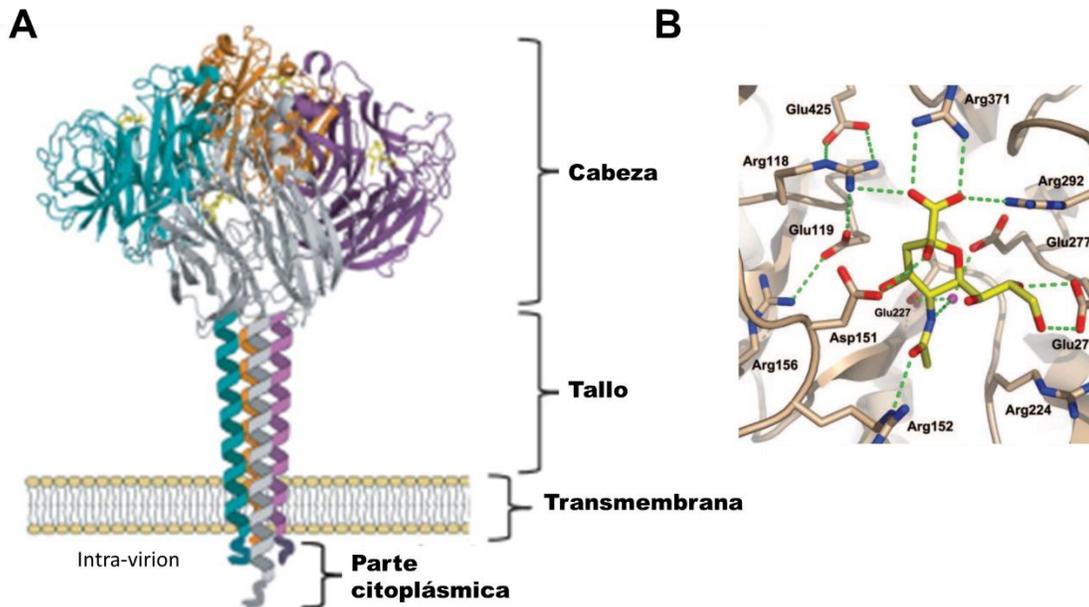
En la naturaleza las sialidasas (también nombradas neuraminidasas), son responsables de la remoción de residuos de ácido siálico a partir de porciones de glicanos de glicoproteínas o glicolípidos. Se dividen en exosialidasas y endosialidasas, se encuentran en bacterias, hongos, aves, mamíferos y por supuesto en virus (Yuan *et al.*, 2020).

La neuraminidasa del virus de la influenza, es un tetrámero en forma de hongo, cada monómero de aproximadamente 470 aminoácidos se pliega en cuatro dominios estructurales distintos: la cola citoplásmica, la región transmembrana, el tallo y la cabeza catalítica (figura 1.7A). El sitio activo de la NA consiste en una cubierta interna de ocho residuos altamente conservados que interactúan directamente con los ácidos siálicos como se observa en la figura 1.7B (Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 y Tyr406) (McAuley *et al.*, 2019; Shtyrya *et al.*, 2009), mientras que los sitios no conservados han resultado en 11 subtipos de neuraminidasas, los cuales difieren como en el caso de la hemaglutinina a la diferencia de aminoácidos en su estructura.

Esta NA viral pertenece a la familia de exosialidasas que rompe la unión  $\alpha$ -cetósídica entre los carbohidratos adyacentes y residuos del ácido siálico terminal, facilitando la liberación del virus a partir de las células infectadas; además complementa la función de la hemaglutinina de unión al receptor aumentando la infección del virus (Kosik & Yewdell, 2019). Si bien la NA del virus de la influenza A se ha estudiado en la etapa de la liberación viral de las células, otros estudios sugieren que la NA tiene un papel multifuncional en la infección, la condición física del virus; en evolución a la unión viral, la entrada y liberación de viriones de las células infectadas y el mantenimiento del equilibrio funcional con la hemaglutinina viral (Dou *et al.*, 2018; Wen & Wan, 2018).

El desarrollo de nuevos inhibidores contra la NA es crítico para la preparación contra los brotes de influenza. El conocimiento del mecanismo enzimático de la NA y de estructuras análogas al sustrato (N-glicanos), contribuyó al desarrollo de la primera generación de fármacos anti-NA: zanamivir y oseltamivir (Mckimm-Breschkin 2013; von Itzstein, 2007). Sin embargo, hacen falta pruebas con respecto a los residuos catalíticos clave de la NA de los virus de influenza como objetivo diana para el diseño de un nuevo inhibidor y evitar resistencia de las nuevas cepas (Lampejo, 2020). De los sitios conservados, la Tyr406 es uno de los residuo catalítico clave que puede funcionar como objetivo para el diseño de

nuevos antivirales (Vavricka *et al.*, 2013). Por lo que la investigación de nuevos antivirales enfocados en los mecanismos de acción y del estudio de interacción de dichas moléculas con la NA siguen siendo un área de oportunidad.



**Figura 1.7** Vista lateral y sitio activo de la neuraminidasa.

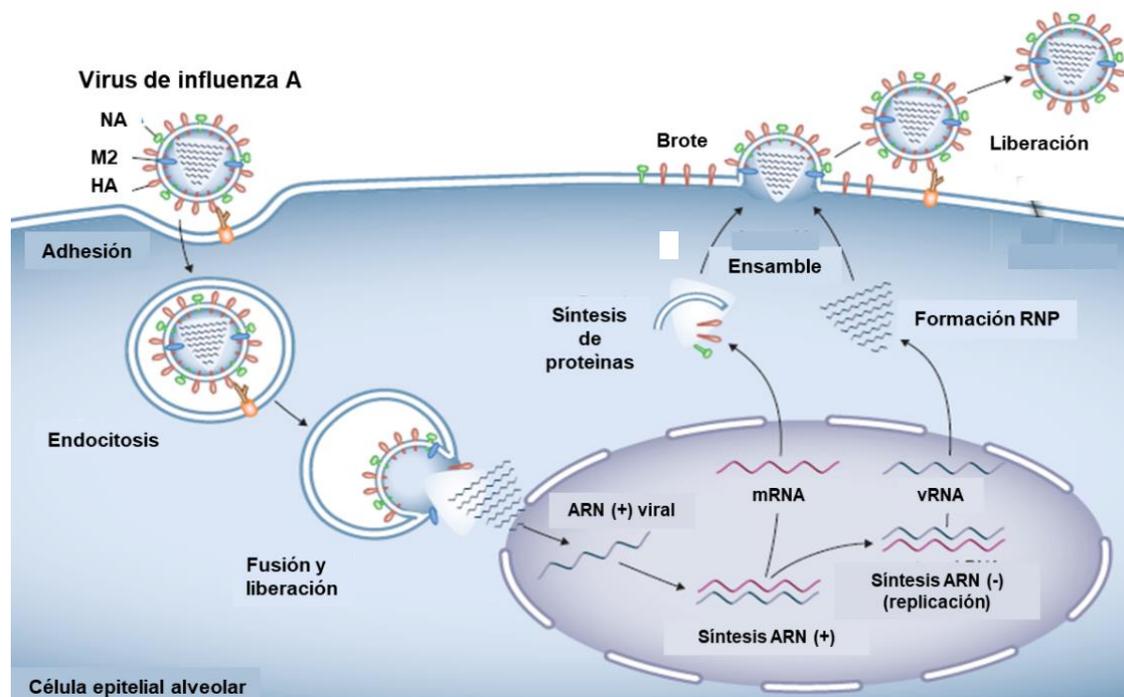
(A) Estructura lateral de la neuraminidasa, donde los monómeros son mostrados en verde, gris, púrpura y naranja, mientras que el tallo está formado por cuatro alfa-hélices (Tomado y modificado de McAuley *et al.*, 2019). (B) La estructura del complejo entre el subtipo A/Tokyo/3/67 (H2N2) y ácido siálico, así como los residuos conservados (Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu227, Glu276, Arg292 y Arg371), imagen tomada de Yen *et al.* 2006.

### 1.3.2 Ciclo de replicación viral

Los virus, como ya se ha mencionado, requieren de una célula hospedera para iniciar su ciclo de replicación. En el caso de la Influenza de manera general, la infección comienza con la adhesión de proteínas HA de la superficie del virus al ácido siálico de la superficie celular del tracto respiratorio, una vez reconocido el sitio de unión, se desencadena la endocitosis que implica la fusión de la membrana endosomal de la célula con el virión. Posteriormente por

disminución del pH se activa el canal iónico M1 provocando la fusión y liberación de ribonucleoproteínas virales (RNPv) como se observa en la figura 1.8 (Krammer *et al.*, 2018).

Las RNPv son transportadas hacia el núcleo de la célula, dicho transporte depende de la maquinaria de la célula. Una vez en el núcleo de la célula, el complejo polimerasa (PB2, PB1 y PA) realiza la transcripción y replicación de ARN viral (ARNv) para ser exportado hacia el citoplasma para la síntesis de nuevas proteínas virales para la formación de nuevos RNPv. Después de varias amplificaciones, las RNPv son dirigidas hacia la membrana celular para posteriormente ser ensambladas y cubiertas para formar los nuevos viriones y finalmente ser liberados mediante la acción de la neuraminidasa (Dou *et al.*, 2018; Herold *et al.*, 2015; Wohlbold & Krammer, 2014).



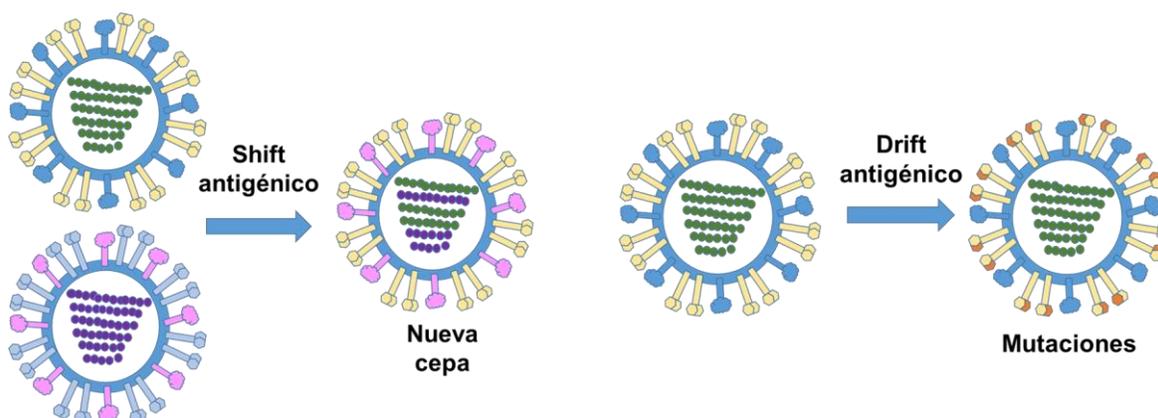
**Figura 1.8** Ciclo de replicación del virus

Fuente: modificado y tomado de Herold *et al.*, 2015

### 1.3.3 Evolución del virus

La diversidad en los virus de influenza tipo A se producen de acuerdo con dos sucesos nombrados como “shift antigénico” y “drift antigénico (Sleman, 2017). El shift antigénico (salto

antigénico) ocurre por dos vías, la primera consiste en que una especie es infectada por un virus de la influenza de otra especie sin que el virus sufra modificaciones, este tipo de evento requiere un periodo de adaptación, donde el virus logra eficiencia en la replicación en el nuevo huésped. La segunda vía es consecuencia de que el genoma del virus, que contiene 8 segmentos de ARN, sufre un intercambio entre segmentos “rearreglo de genes”, estos reordenamientos generan un virus nuevo que expresa proteínas en una nueva combinación, incluyendo nuevas variantes de HA, NA o ambas, logrando evadir la inmunidad adquirida por la misma especie generando una nueva cepa (Kim *et al.*, 2018). El drift antigénico o deriva antigénica ocurre más lentamente, consiste en la acumulación de mutación del virus, provocando modificaciones en las proteínas del mismo, produciendo nuevas cepas más resistentes, con ello la especie hospedera se vuelve más susceptible a la reinfección (Berlanda Scorza, 2017; Wohlbold & Krammer, 2014); ambos cambios se observan en la figura 1.9.



**Figura 1.9** Cambios Shift y Drift antigénico en el virus de la Influenza tipo A.

### 1.3.4 Tratamientos

#### 1.3.4.1 Vacunas

Los tratamientos que actualmente existen contra el virus de la influenza A consisten en la prevención a través de la aplicación de vacunas trivalentes que contienen cepas según los virus circulantes (Ohfuji *et al.*, 2017). La CDC y OMS autorizan el uso de vacunas producidas en huevo, o basadas en células recombinantes, las cepas autorizadas por la FDA para el periodo 2021-2022 se observan en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3 Composición de vacunas para el periodo 2021-2022 aprobadas por la FDA.**

Método de producción	Formulación	Cepas
A base de huevo	Trivalente	A/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09
		A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)
	Cuadrivalente	B/Washington/02/2019 (linaje B/Victoria);
		A/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09
A base de células/recombinantes	Trivalente	A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)
		B/Washington/02/2019 (linaje B/Victoria);
	Cuadrivalente	A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) pdm09
		A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)
		B/Washington/02/2019 (linaje B/Victoria);
		B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata).

De acuerdo con los estándares de la FDA (Food and Drug Administration, en Estados Unidos), son tres tecnologías aprobadas para la producción de vacunas contra la influenza con cepas autorizadas por la CDC y OMS conocidas por sus siglas en inglés como CVV (candidate virus vaccine) y se describen a continuación:

1. Vacunas a base de huevo: utiliza los CVV del tipo IIV o LAIV que son inyectados en huevos de gallina fertilizados; se incuban para que se replique el virus, de la fase líquida se recupera el virus, se inactiva y se purifica el antígeno. Este método de producción

requiere cantidades grandes de huevos de gallina para producir la vacuna, y por lo general lleva más tiempo que otros métodos utilizados.

2. Vacunas a base de células: Esta metodología fue aprobada por la FDA en 2012, no requiere huevos de gallina porque los virus que se utilizan para fabricar la vacuna se cultivan en células animales (de riñón canino Madin-Darby o por sus siglas en inglés MDCK) para su replicación, se recupera el sobrenadante para obtener el antígeno de los virus. Es un proceso más rápido.
3. Vacunas recombinantes: Este método consiste en aislar una proteína específica de un CVV que crece en un medio “silvestre”, generalmente la proteína aislada es la hemaglutinina que luego se recombinan con porciones de otro virus que crecen en células de insectos y se replica; se recupera la proteína HA de estas células y se purifica. La proteína purificada se conserva mientras se espera que la FDA realice las pruebas y apruebe la distribución de lotes. Por el momento la vacuna recombinante contra la influenza es la única que se produce 100% sin el empleo de huevos de gallina en el mercado estadounidense y fue autorizada para su uso en 2013.

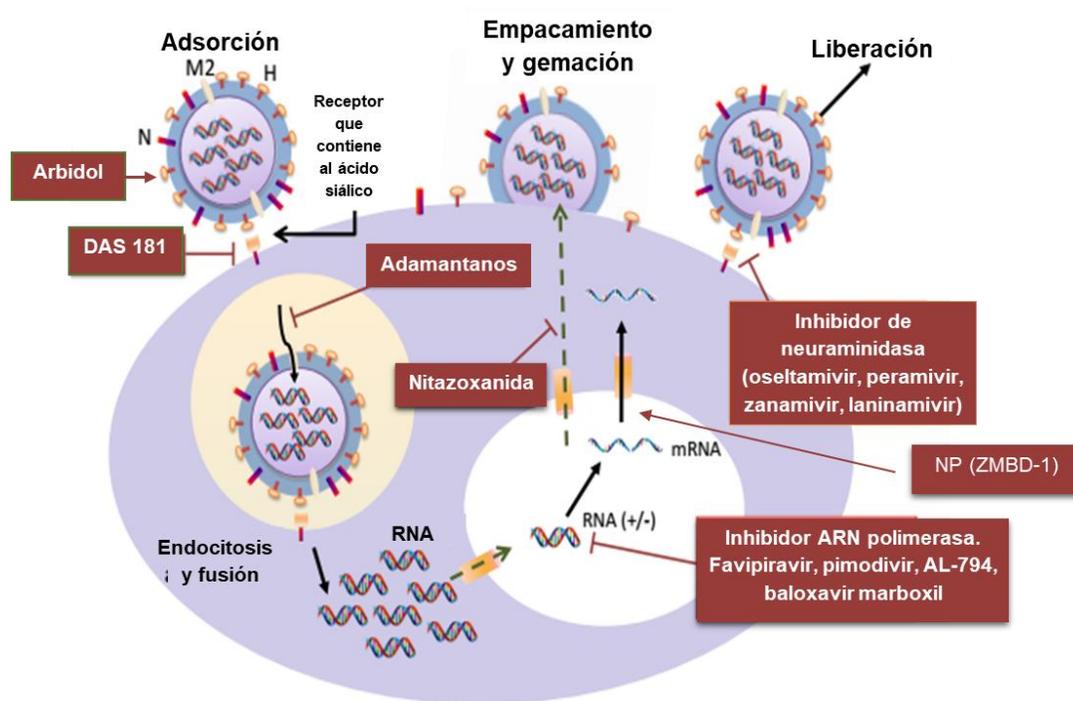
Los CDC y la FDA monitorean rutinariamente la seguridad de todas las vacunas con licencia en los Estados Unidos, incluyendo las vacunas contra la influenza estacional. Actualmente en la página de la CDC ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) se encuentra la información completa sobre el virus de la influenza y la actualización de las vacunas.

#### **1.3.4.2 Fármacos Antivirales**

Los fármacos antivirales, se aplican una vez contraída la enfermedad, los cuales actúan sobre las proteínas M2 (amantadina, rimantadina), NA (zanamivir, oseltamivir, peramivir, LANI), HA (cyanovirin-N), inhibidores de la polimerasa (T-05, ARNsi) y aquellos que actúan sobre alguna de las etapas de replicación del virus (Edinger *et al.*, 2014). Anualmente la CDC debido a los cambios en las cepas del virus de la Influenza, se mantiene en alerta en cuanto a la revisión de nuevos tratamientos.

Los antivirales son moléculas activas que bloquean la ruta de replicación del virus de la influenza de distintas maneras, ya sea por inhibición del canal M2, HA, NA y el complejo polimerasa. En la figura 1.10 se observa a los adamantanos que actúan sobre el canal iónico

M2; la DAS 181 que es una proteína de fusión sialidasa que actúa en la primera etapa de la invasión del virus; el arbidol que es una molécula que actualmente es un tratamiento profiláctico para el tratamiento de influenza aprobado en Rusia y Japón y actúa sobre HA; y la nitazoxanida puede bloquear la maduración de la hemaglutinina (Dobrovolyh & Beauchemin, 2017; Nasser *et al.*, 2013). En el caso de ribavirin actúa en la interferencia en la síntesis de ARN; en cuanto a la acción a nivel el complejo polimerasa; el favipiravir que es un derivado de pirazincarboxamida, el pimodivir, AL-794; recientemente la aprobación por la FDA en 2018 del baloxavir marboxil; y finalmente los inhibidores de la NA como lo son el oseltamivir, peramivir, zanamivir y laninamivir (Kikuchi & Watanabe, 2019; Mifsud *et al.*, 2019; O'Hanlon & Shaw, 2019; Giese *et al.*, 2017; Kakisaka *et al.*, 2015).



**Figura 1.10** Actividad de los antivirales en distintas etapas de la replicación del virus

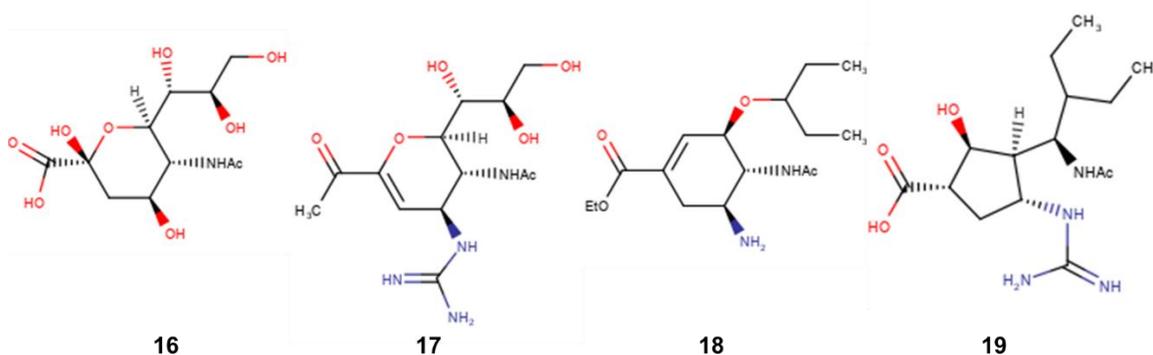
Fuente: modificado de Shen *et al.*, 2015

Recientemente se propone como objetivo blanco para la búsqueda de antivirales, la proteína nuclear del virus NP ya que no existen hasta ahora evidencia de mutaciones a este nivel, lo que evita que las cepas de influenza adquieran resistencia a este tipo de antivirales. En el 2018 Huang y colaboradores realizaron estudios *in vitro*, *in silico* e *in vivo* a un compuesto nombrado como ZBMD-1, el cual mostró actividad antiviral contra distintos subtipos del virus de influenza tipo A a bajas concentraciones, colocándolo como futuro candidato contra actividad antiviral

que tiene como objetivo una proteína distinta a la de los antivirales que actualmente existen en el mercado (Huang *et al.*, 2018).

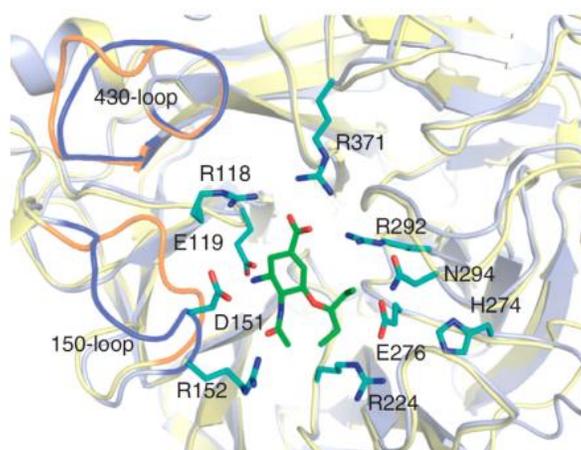
Debido a que las cepas de influenza han mostrado resistencia a algunos antivirales de los antes mencionados y que otros compuestos aún están en investigación, la CDC y la OMS actualmente para el 2020 recomiendan únicamente el uso de oseltamivir (disponible en versión genérica o el nombre Tamiflu®), zanamivir (Relenza®) y peramivir (Rapivab®) bajo receta médica y más reciente baloxavir marboxil (Xofluza®) (FDA 2021).

Shen y colaboradores (2015) estudiaron la resistencia de la influenza A contra los antivirales dirigidos a las proteínas M2 y a la neuraminidasa. Los sitios de unión de la NA y SA (ácido siálico) están altamente conservados, por lo que el diseño de algunos antivirales se basa en mimetizar la estructura del SA (16) y catalizar la hidrólisis de la NA, como lo son zanamivir (17), oseltamivir (18) y peramivir (19) como se muestran en la Figura 1.11, compuestos que como se ha mencionado, están autorizados actualmente por la OMS. Su uso en pacientes se realiza de distintas maneras, en el caso de zanamivir al tener una baja biodisponibilidad oral, se limita a la inhalación, por lo que no puede ser utilizado en niños o pacientes con enfermedades respiratorias, caso contrario con oseltamivir que es suministrado vía oral debido a que se convierte rápidamente a su forma activa carboxilato de oseltamivir por una esterasa que se encuentra en el cuerpo humano y al ser de naturaleza lipófila, aumenta su biodisponibilidad y finalmente peramivir que es vía intravenosa mostrando desventaja frente a los dos anteriores (Wu *et al.*, 2016).



**Figura 1.11** Estructura química de compuestos que interactúan en los sitios de la NA  
Fuente: tomado y modificado de Shen *et al.*, 2015.

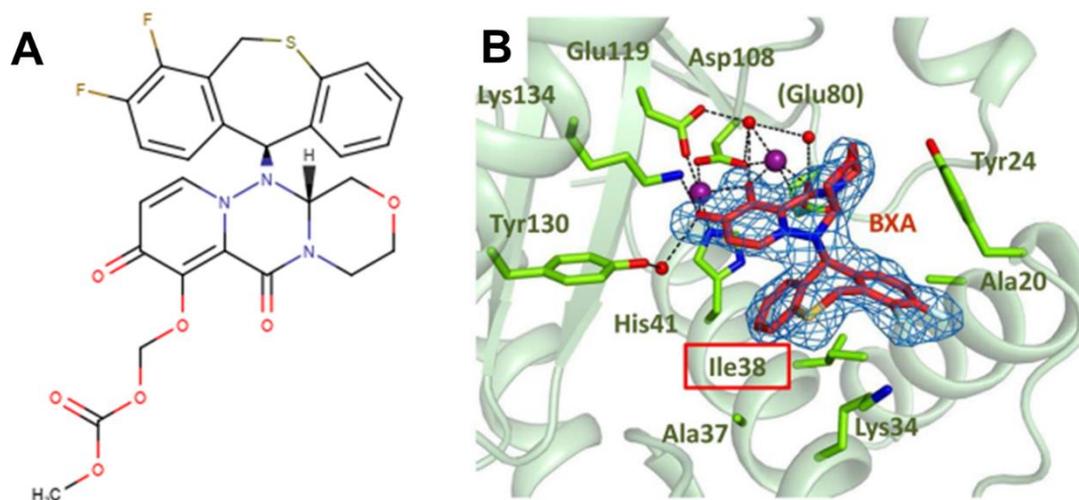
En la Figura 1.12 se observa la estructura de la proteína neuraminidasa resaltando los sitios que interactúan con los tres fármacos. Aunque los sitios NA viral están altamente conservados, la causa de la resistencia para oseltamivir es la mutación en el sitio His274 (H274), mutación que no bloquea la acción de zanamivir ya que la mitad del glicerol hidrofílico en zanamivir interactúa con la Glu276 (E276) de la NA a través de enlaces hidrógeno de manera similar que el sustrato natural (SA) y no necesita un reordenamiento conformacional. En el caso de peramivir comparte la misma interacción hidrofóbica con la Glu276 que oseltamivir, lo que puede reducir su actividad contra influenza A, más sin embargo si ocurre mutación en el sitio Glu276 (E276), el virus crea resistencia tanto a oseltamivir como zanamivir (Shen *et al.*, 2015).



**Figura 1.12** Sitios activos de la neuraminidasa y la interacción de oseltamivir en las posiciones 150 y 430 loop.

Fuente: Shen *et al.*, 2015

La molécula aprobada en octubre de 2018 por la FDA (aprobada meses antes en Japón) es el baloxavir marboxil denominado comercialmente como Xofluza™ (Figura 1.13 A), este fármaco inhibe la replicación viral a nivel endonucleasa (figura 1.13 B). Los estudios clínicos revelan su efectividad sin efectos adversos contra el virus de la influenza, si se administra en las primeras 48 horas en las que se presentan los síntomas leves en pacientes a partir de 12 años y adultos (Reina & Reina, 2019; Heo, 2018;). Sin embargo existen reportes de la baja susceptibilidad al baloxavir de cepas de influenza, así como resistencia a otros antivirales a nivel polimerasa (Takashita, 2021; Mifsud *et al.*, 2019).



**Figura 1.13** Estructura química del baloxavir marboxil (A). Sitio de acción del baloxavir marboxil en la endonucleasa PA de influenza A H1N1 (B).

Fuente: Figura 1.13B tomada de Omoto *et al.*, 2018

Debido al modo de administración en pacientes y posibles mutaciones en sitios de la neuraminidasa y al complejo de la ARN polimerasa, la efectividad de los fármacos autorizados en el mercado aún es objeto de estudio, lo que conlleva a una demanda de agentes antivirales sin efectos secundarios y toxicidad a la célula.

#### 1.4. Compuestos con actividad antiviral en plantas

Las plantas ofrecen una variedad de metabolitos con potencial actividad antiviral a través de distintas vías: por la regulación de adsorción viral, unión a receptores, inhibición de la penetración del virus a la célula y por competencia a las vías de activación de las señales intracelulares, entre los que destacan alcaloides, terpenos, polifenoles, flavonoides, polisacáridos y proteínas (Ali *et al.*, 2021; Kapoor *et al.*, 2017).

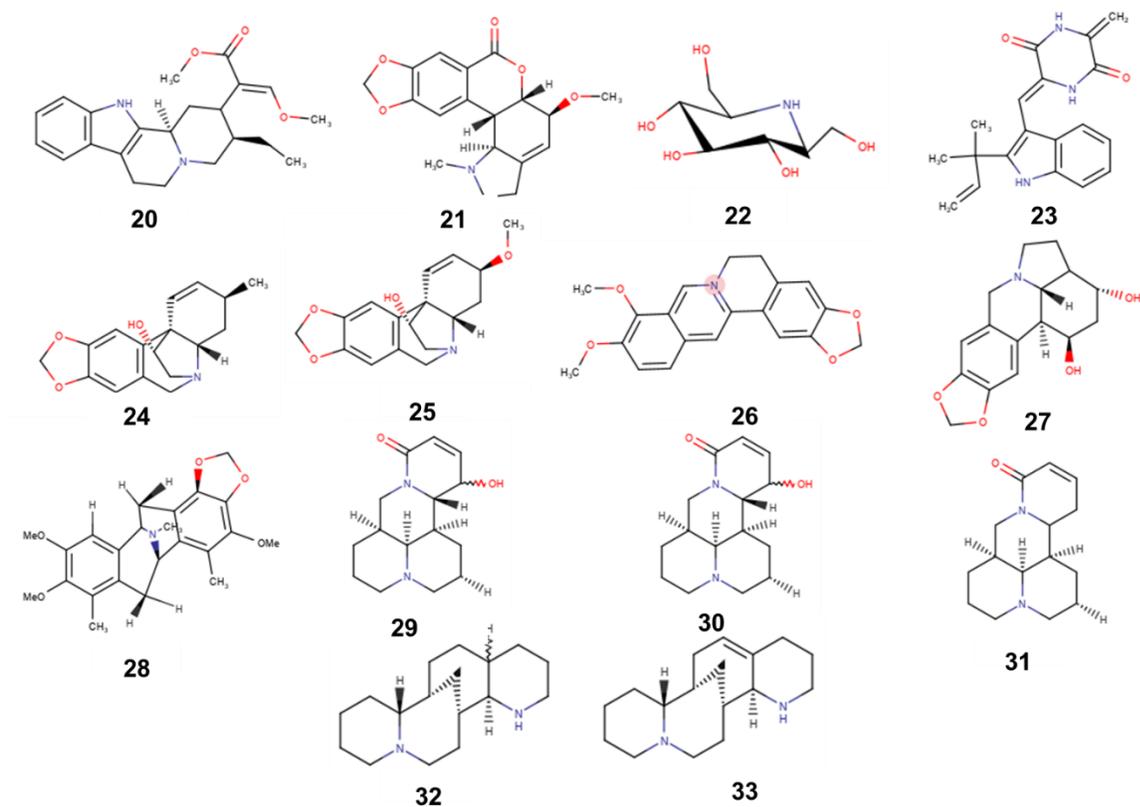
Estudios realizados en hojas de *Jatropha curcas* L., llevaron al aislamiento de compuestos del tipo alcaloide que mostraron ser candidatos como terapia anti-influenza así como la evaluación de extractos obtenidos a partir de la especie *Jatropha multifida* Linn (Shoji *et al.*, 2017; Patil *et al.*, 2015); en otras especies se han aislado alcaloides como la hirsutina (**20**), hipeastrina (**21**), homonojirimicina (**22**), neoquinulina B (**23**), hidroxivittatina (**24**), hemantamina (**25**), berberina (**26**), licorina (**27**), talimonina (**28**) (+)-12 $\alpha$ -hidroxisofocarpina (**29**), (-)-12 $\beta$ -hidroxisofocarpina

---

(30), (+)-soforamina (31), dihidroaloperina (32) y aloperina (33), las cuales han mostrado actividad antiviral importante contra la influenza pero aún no se ha elucidado el mecanismo de acción sobre el virus y sus estructuras se aprecian en la figura 1.14 (Moradi *et al.*, 2018).

Otros compuestos de interés son los polifenoles, los cuales han mostrado inhibir proteínas o síntesis de ARN del virus de la influenza. Wang y colaboradores (2006) reportaron treinta plantas usadas en la medicina tradicional china con actividad antiviral, destacando los polifenoles presentes en *Geranium sanguineum L* y *Cydonia oblonga* Mill sobre la inhibición de HA (Wang *et al.*, 2006). Estudios más recientes señalan a un compuesto identificado con el nombre RCSF1 y ácido gálico aislados de semillas de *Rubs coreanus* como compuestos con alta y amplia actividad contra influenza del tipo A y B (Lee *et al.*, 2016). En el caso de los extractos etanólicos de *Eupatorium perfoliatum* se encontró que son ricos en polifenoles por lo que son candidatos para posteriores estudios de mecanismos de acción antiviral (Derksen *et al.*, 2016).

En lo que respecta a los flavonoides, se ha demostrado su capacidad como inhibidores de la actividad neuraminidasa, como los compuestos aislados de hojas de *Ficus virens*, elucidando seis compuestos que dieron actividad antiviral, como la quercetina (34), quercetin-3-O- $\alpha$ -D-arabinopiranosido (35), quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosido (36), kaempferol-3-O- $\alpha$ -D-arabinopiranosido (37), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosido (38) y Vogelina J(39), así como cumarinas aisladas de *Sarcandra glabra* como el eleuterósido B1 (40) y la isofraxidina (41) demostraron tener actividad antiviral y antiinflamatoria contra el virus de la influenza A como se muestran en la figura 1.15 (Wang *et al.*, 2017; Orabi & Orabi, 2016).



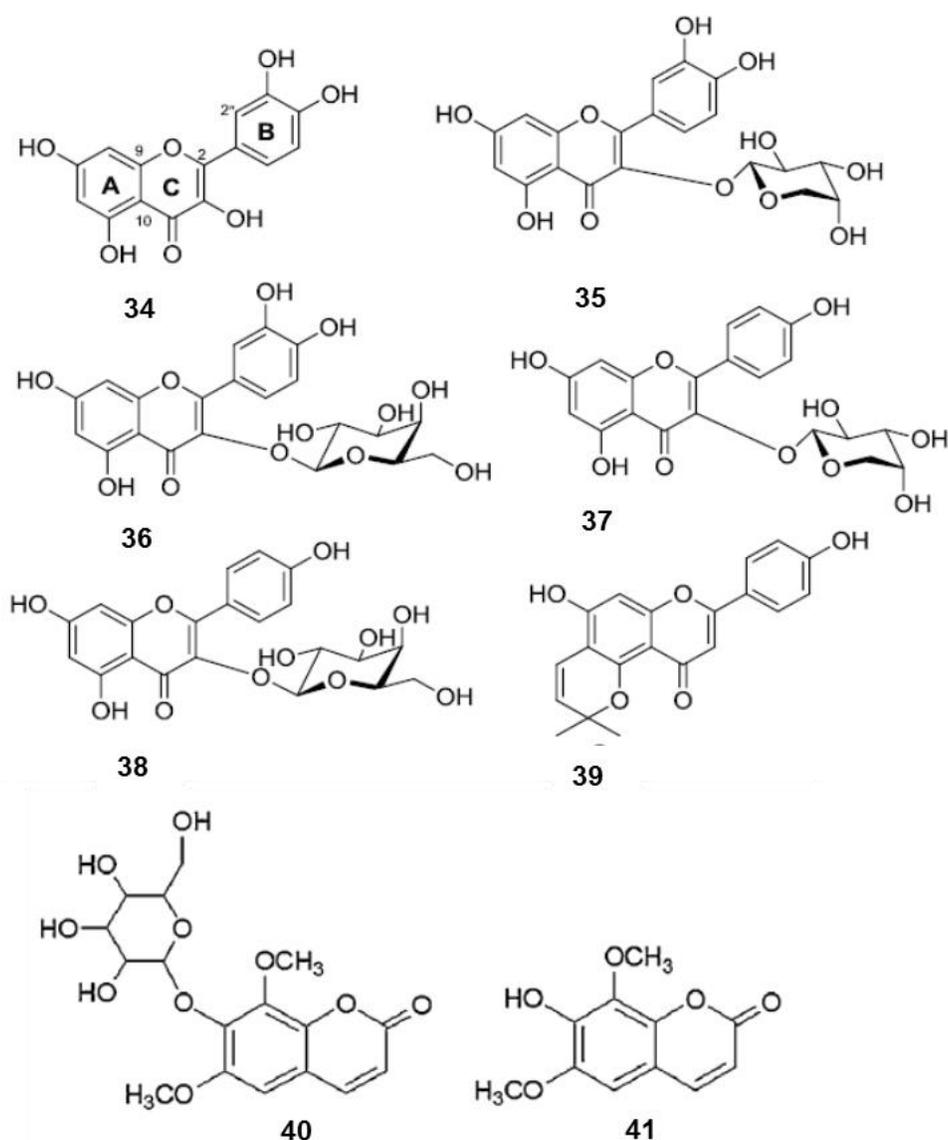
**Figura 1.14** Alcaloides aislados de plantas con actividad antiviral contra el virus de influenza

Fuente: tomada y modificado de Li *et al.*, 2017

También se han realizado estudios del ácido clorogénico (42), abundante en *Lonicera japónica* Thunb. mostrando actividad antiviral reduciendo los títulos virales e inflamación en los pulmones de manera efectiva a nivel NA contra cepas H1N1 y H3N2; así como la actividad del ácido cafeico (43) y sus derivados contra la NA del virus de la influenza, al parecer debido a la presencia de grupos hidróxilo fenólicos (figura 1.16) (Ding *et al.*, 2017; Gamaleldin *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2013).

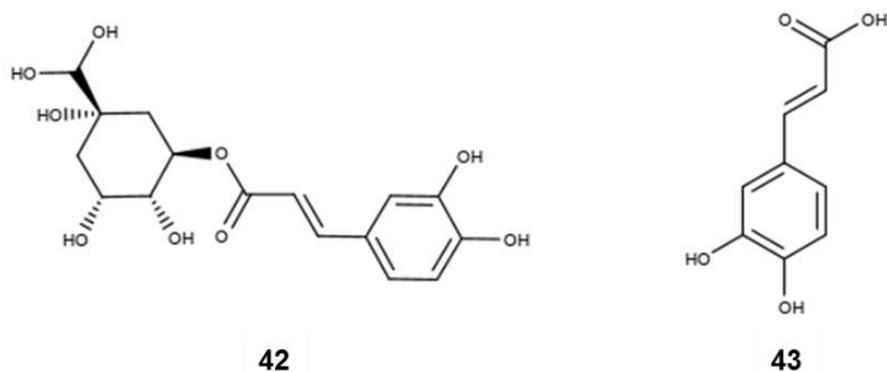
Los compuestos de tipo terpeno también se han estudiado, lo es el caso del 1,8-cineol (44), monoterpene principal del aceite esencial de eucalipto, mostró inducir una inmunidad protectora sinérgica contra la infección por influenza junto con la vacuna administrada en ratones (Li *et al.*, 2017). En el caso de *Lyonia ovalifolia*, se aislaron 11 nuevos 9,10-seco-cicloartan triterpenglicósidos, 7 nuevos lanostano triterpenglicósidos y 2 nuevos ursano triterpenoides, a partir de partes leñosas y hojas, de los cuales cuatro mostraron actividad contra cepas de

influenza A (45-49); así como el isómero del compuesto 47 (Lv *et al.*, 2016). También modificaciones en el ácido 3-O- $\beta$ -chacotriosil ursólico (50) revelaron mediante estudios *in vitro* e *in silico*, que puede unirse fuertemente a la hemaglutinina del virus bloqueando la unión del virus a las células huésped (Song *et al.*, 2015).

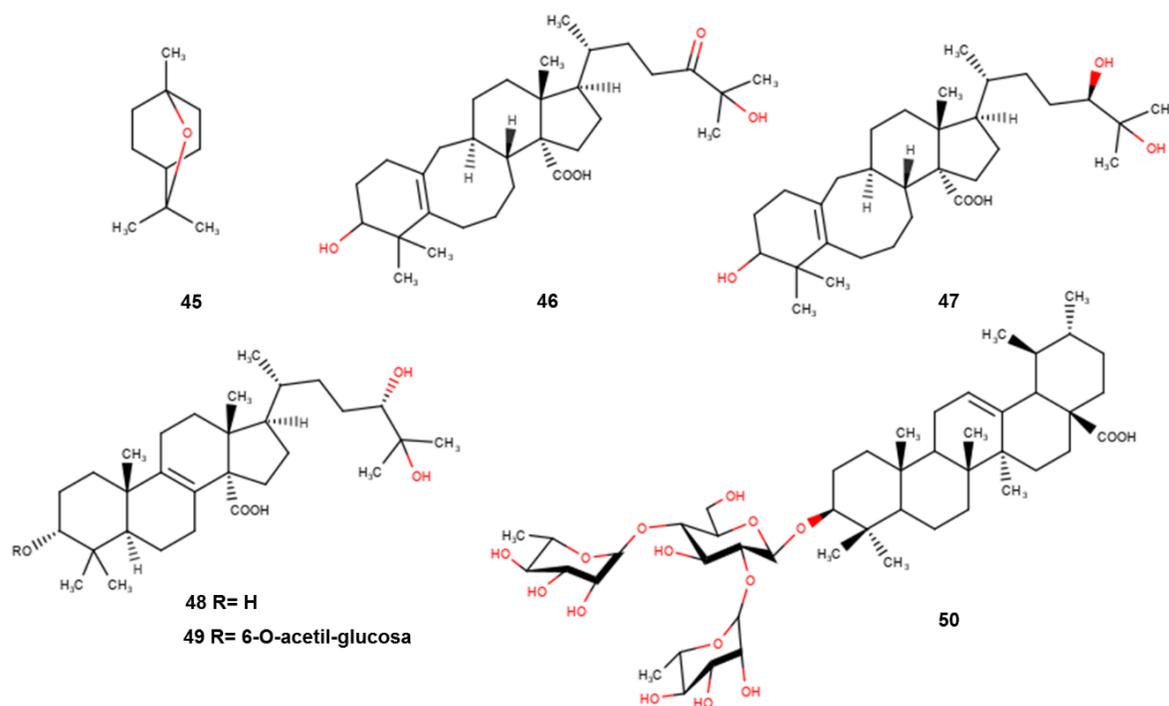


**Figura 1.15** Flavonoides aislados de plantas con actividad antiviral contra el virus de influenza

Fuente: tomada y modificada de Orabi & Orabi, 2016; Wang *et al.*, 2017



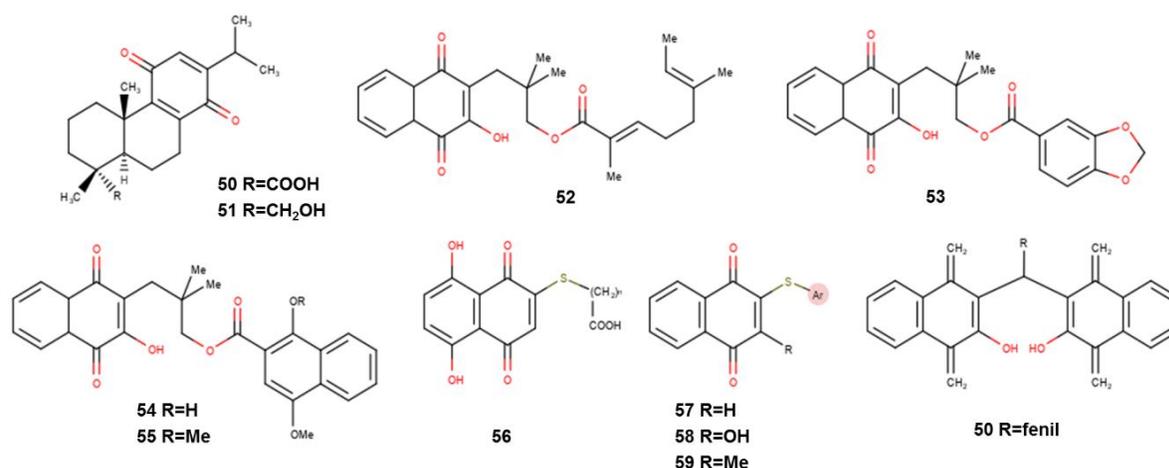
**Figura 1.16** Acido clorogénico aislado de *Locinera japónica* Thumb. (42) y ácido caféico (43) que han mostrado actividad antiviral a nivel neuraminidasa del virus de la influenza.



**Figura 1.17** Terpenos aislados y sintetizados con actividad antiviral contra el virus de la influenza

Son escasos los trabajos que han evaluado la actividad antiviral de quinonas aisladas a partir de plantas sobre el virus de la influenza. Existen reportes sobre su actividad antiviral y la capacidad que tienen estas moléculas como agentes anti inflamatorios, lo es el caso de triptoquinonas sintetizadas a partir de ácido abiético (50, 51) contra herpes simplex, y

naftoquinonas aisladas y modificadas de *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz (Acanthaceae) contra PR8, HRV1B y CVB3 (**52-55**) (Ngoc *et al.*, 2019; Zapata *et al.*, 2013). Los trabajos que existen sobre el virus de la influenza A, se han basado en la actividad antiviral de moléculas sintetizadas a partir de 1,4-naftoquinona (**56-59**) contra el virus de influenza A y el de herpes simplex (Tandon *et al.*, 2004); otros han demostrado, mediante estudios *in vitro* e *in silico*, la actividad antiviral de derivados de una naftoquinona dimérica (**60**) donde los derivados *p*-hidroxilo tiene una mejor actividad antiviral a nivel NA contra el subtipo H5N1 (Sharma *et al.*, 2017). Así como la capacidad de las antraquinonas aisladas a partir de raíces de *Polygonatum odoratum* con actividad contra el virus de la influenza A (Pang *et al.*, 2021).



**Figura 1.18** Compuestos de naturaleza tipo quinona aisladas y sintetizadas para el estudio de actividad antiviral.

### 1.4.1 Epóxido de Zeylanona

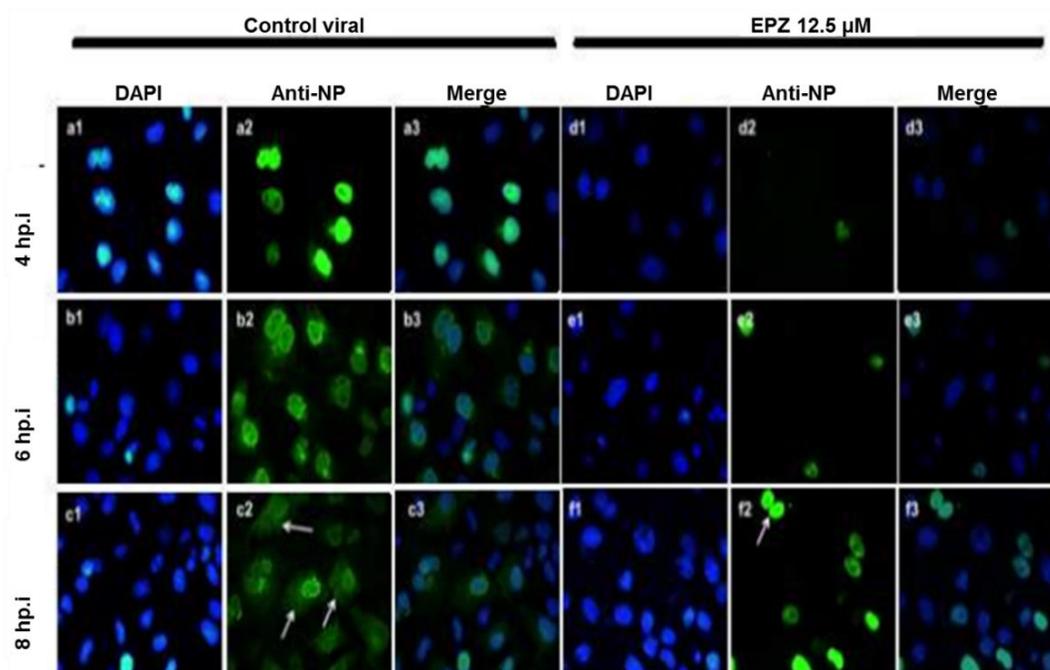
Como se hizo mención en el apartado 1.2.1 el extracto de baja polaridad de corteza de *D. anisandra*, contiene un compuesto nombrado como epóxido de zeylanona (EPZ), molécula del tipo quinona que posee actividad antiviral contra cepas resistentes de virus de la influenza A y B como se aprecia en la Tabla 1.4 con índices de selectividad por arriba de 5, el modo de acción de esta molécula se confirmó con estudios de qRT-PCR e inmunofluorescencia indirecta, los resultados se aprecian en la figura 1.19 en donde se observa que la presencia de EPZ durante el proceso de replicación inhibe la exportación de NP hacia el citoplasma desde las primeras cuatro horas de infección, concluyendo que la molécula interviene en la síntesis de

ARN durante la etapa de replicación/traslación resultando en un efecto sobre las nucleoproteínas virales, una actividad novedosa, ya que hasta ahora no se conocen detalles sobre mutaciones a nivel NP del virus de influenza (Cetina-Montejo *et al.*, 2019).

**Tabla 1.4 Actividad antiviral de EPZ contra cepas del virus de la influenza.**

Virus (MOI: 0.01)	CC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IS
A/Yucatán/2370/09 (H1N1) pdm		0.65 ± 0.007	33.3
A/México/InDre797/10 (H1N1-H275Y) pdm	21.70 ± 1.7	2.77 ± 0.24	7.8
A/Sidney/5/97 (H3N2)		1.6 ± 0.09	13.6
B/Yucatán/186/10		2.22 ± 0.37	9.8

Fuente: Tomada y modificada de Cetina-Montejo *et al.*, 2019



**Figura 1.19** Inmunofluorescencia indirecta del proceso de exportación nuclear de las ribonucleoproteínas virales en ausencia y presencia de EPZ

Fuente: Tomada y modificada de Cetina-Montejo *et al.*, 2019

---

## JUSTIFICACIÓN

Una de las enfermedades virales más recurrentes a nivel mundial según la OMS es la influenza principalmente causada por virus del tipo A y B, las cuales generan epidemias que causan unos 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave y unas 250 000 a 500 000 muertes a nivel mundial, además del absentismo laboral y escolar reflejando baja productividad y alta afluencia en hospitales (OMS, 2022).

En México es considerado un problema de salud pública, “durante la temporada 2019-2020 (semana 40 a la 20) se registraron 6277 casos y 359 defunciones por influenza”; a pesar de que en el periodo 2017-2018 solo se reportaron 735 casos. Actualmente para la temporada estacional del periodo 2021-2022 sigue aumentando el registro de casos para influenza, hasta ahora se han registrado 920 casos, por ello el monitoreo semanal de los casos de influenza cambia constantemente según las condiciones y épocas del año, manteniendo un nivel de vigilancia elevado, uso de vacunas o nuevas alternativas que permitan reducir dichas estadísticas (DGE, 2022).

Aunque en la actualidad se conocen compuestos antivirales como zanamivir y oseltamivir, y el recientemente aprobado Baloxavir marboxil, estudios han demostrado que el virus de la influenza desarrolla resistencia a dichos compuestos (Li *et al.*, 2015). Por otro lado, a partir de extractos obtenidos de *Diospyros anisandra*, se han identificado moléculas con actividad antiviral (Cetina-Montejo *et al.*, 2019), lo que permite sugerir que los metabolitos secundarios presentes en dicha especie poseen actividad antiviral; aunado a que esta especie es cuasi endémica de la PBPY. De ese modo se contribuye al conocimiento y se refuerza la importancia que tienen las plantas endémicas.

## HIPÓTESIS

*Diospyros anisandra* posee metabolitos secundarios (distintos al EPZ) con actividad antiviral contra cepas del virus de la influenza mediante la inhibición de la actividad de la hemaglutinina y neuraminidasa.

**OBJETIVO GENERAL**

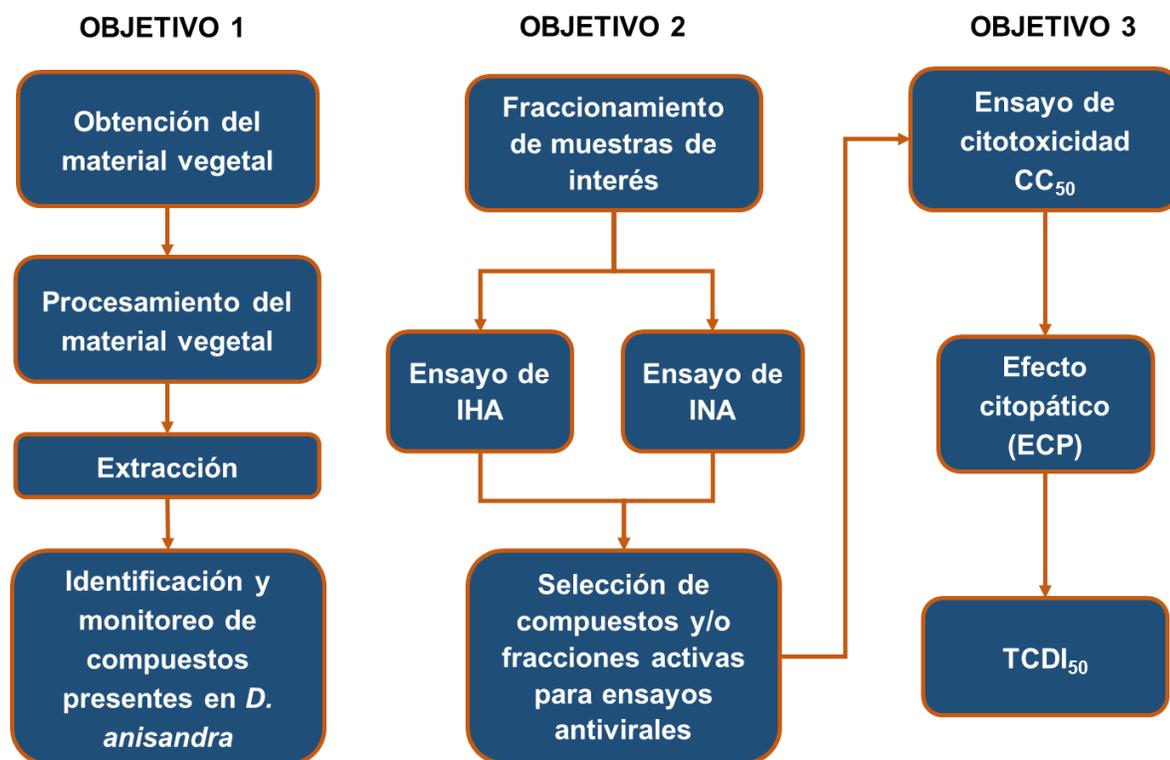
Identificar los metabolitos secundarios con actividad sobre la hemaglutinina y neuraminidasa del virus de la influenza, presentes en fruto, hoja, tallo y raíz de *Diospyros anisandra*.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- ▶ Identificar los compuestos mayoritarios de baja, mediana y alta polaridad presentes en hoja, fruto, tallo y raíz de *D. anisandra*.
- ▶ Realizar el estudio biodirigido de extractos de fruto, hoja, tallo y raíz de *D. anisandra* que exhiban inhibición de la actividad de la HA e inhibición de la NA del virus de la influenza.
- ▶ Evaluar el efecto de los compuestos activos no citotóxicos de *D. anisandra* en el ciclo viral.

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

La estrategia experimental se describe en la Figura 1.20, la cual está en función de los objetivos específicos.



**Figura 1.20** Diagrama de flujo de la estrategia experimental.



## CAPÍTULO II

### ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDOS A PARTIR DE HOJA, FRUTO, TALLO Y RAÍZ DE *Diospyros anisandra* MEDIANTE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS Y ESPECTROSCÓPICOS

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

El interés por los productos naturales se ha revitalizado en función de las necesidades actuales y la actividad económica del ser humano. El estudio químico de las plantas ha permitido obtener una amplia variedad de compuestos con aplicación en campos como la cosmetología, la medicina, los alimentos, el medio ambiente, entre otros rubros; logrando cubrir las necesidades de quien hace uso de ellos (Zhao *et al.*, 2018). Además de que las plantas son un recurso renovable y de amplia distribución, especialmente las utilizadas desde hace miles de años para el tratamiento de algunas enfermedades (Yuan *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2012).

La cantidad de compuestos aislados a partir de plantas no está aún determinada, tomando en cuenta algunas fuentes que indican la presencia de 200 000 compuestos de origen vegetal y los nuevos compuestos que aún esperan ser identificados, lo que hace a los metabolitos de origen vegetal objeto de estudio. (Newman & Cragg 2020; Pichersky & Gang 2000).

Uno de los géneros de plantas estudiados como fuentes de metabolitos de interés es *Diospyros*, que abarca más de 350 especies en el mundo y de los cuales se han aislados compuestos activos como terpenos, fenoles, taninos, naftoquinonas entre otros (Rauf *et al.*, 2017a). Algunas especies han mostrado actividad antiviral contra virus como HIV, influenza, herpes simple y dengue (Peyrat *et al.*, 2016).

En México se encuentran distribuidas poco más de 20 especies del género *Diospyros* de las cuales 8 se localizan en la península de Yucatán: *D. anisandra*, *D. bumeloides*, *D. campechiana*, *D. digna*, *D. tetrasperma*, *D. yatesiana*, *yucatanensis ssp. spectabilis* y *D. yucatanensis ssp. Longipedicellata* (García *et al.*, 2015). La especie, *Diospyros anisandra* es cuasi endémica de PBPY, convirtiéndose en un material de estudio interesante; de este modo contribuir al estado del arte de esta especie y sus potenciales aplicaciones de sus componentes químicos (CICY, 2020).

---

En esta especie se han aislado quinonas de la corteza de *D. anisandra*, entre las cuales el epóxido de Zeylanona (compuesto novedoso) mostró poseer actividad antiviral (Cetina-Montejo *et al.*, 2019; Uc-Cachón *et al.*, 2013). Por ello este trabajo es una contribución al conocimiento fitoquímico de especies endémicas y cuasi endémicas de la PBPY. En este capítulo se reporta el fraccionamiento, aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos mayoritarios presentes en hoja, raíz, tallo y fruto de *D. anisandra*; así como el perfil fitoquímico utilizando cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio fitoquímico hasta el aislamiento de compuestos de baja, media y alta polaridad se utilizaron extractos metanólicos (hoja, fruto, corteza, y raíz) de dos ejemplares de *D. anisandra* colectados en el mes de febrero de 2018 en el Parque Científico Tecnológico de Yucatán ubicado en Sierra Papacal, Yucatán. Para el estudio fitoquímico de compuestos de baja polaridad de fruto, se llevaron a cabo dos colectas colectados en la comisaría de Dzitya, municipio de Mérida durante los meses febrero y septiembre de 2019. Los respaldos de los especímenes colectados fueron depositados como muestras en el herbario del CICY con el número de colecta 71015 y 71016.

El secado del material vegetal se realizó en un secador eléctrico. Para la reducción de tamaño de partícula se utilizaron dos molinos de acuerdo al grosor y tamaño de las muestras vegetales, se utilizó una trituradora modelo CH5653 marca ECHO Bear Cat, un molino adaptado con un motor Kohler command pro 9.5 (para corteza y tallo), y un molino pagani Modelo 1520 (hoja y raíz). Se utilizó *n*-hexano (*n*-Hx), para la obtención de extractos de baja polaridad, grado industrial destilado en el laboratorio; acetato de etilo (AcOEt) para la obtención de extractos de mediana polaridad y metanol (MeOH) para los extractos de mayor polaridad, estos últimos de grado analítico (Fermont). Además de los ya mencionados, se utilizó diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) grado industrial y acetona (An) grado analítico (Fermont) durante los posteriores fraccionamientos de cada extracto.

La concentración de los extractos se llevó a cabo en rotavapores de la marca Büchi (modelos RII, R111, R300), equipados con recirculador de agua fría, vacío y termobañó. La obtención de

---

extractos y fracciones se obtuvieron por distintos métodos como la maceración estática y con ultrasonido en un sonicador marca Cole Parmer.

El análisis por CCD (cromatografía en capa delgada) se llevó a cabo en cromatofolios de soporte de aluminio, impregnadas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, de 0.20 mm de espesor (Merck, Darmstadt, Germany). Se utilizó un visualizador UV/Visible marca Chromato-Vue® Modelo C-75 de gabinete de onda larga y corta (254 nm /365 nm). Los reveladores químicos utilizados fueron: ácido fosfomolibdico en ácido sulfúrico al 5%, y KOH al 5% en etanol. Para la argentación de placas de CCD se empleó Nitrato de plata (Sigma Aldrich). Para la cromatografía líquida al vacío (CLV) se utilizó arcilla activada (tonsil®); para cromatografía de gravedad y tipo flash se utilizó gel de sílice de diferentes tamaños de malla (70-230 y 200-400 mesh marca Sigma-Aldrich) y en la cromatografía de permeación en gel se utilizó Sephadex LH-20 (25-100 µm marca Sigma-Aldrich) (Figura A1.a y A1.b sección Apéndice A). Para extractos obtenidos a partir de fruto y raíz, se utilizó un sistema de purificación flash isolera (Biotage), utilizando una columna SNAP ultra 10 g (Biotage, Uppsala, Sweden) (Figura A1c sección Apéndice A). Para la confirmación de los componentes detectados en CG/EM se emplearon estándares comerciales (uvaol, ácido betulínico, estigmasterol, β-sitosterol, amirina) u obtenidos previamente de estudios anteriores (betulina, plumbagina, lupeol) de la corteza de esta especie.

Para la obtención de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) se empleó un espectrómetro VARIAN/AGILENT, modelo 600 MHz AR Premium COMPACT, con un campo magnético de 14,4 T. Se utilizaron como referencias las señales residuales de CDCl<sub>3</sub> (7,26 ppm).

### *2.2.1 Procesamiento del material vegetal.*

De las colectas realizadas, se procedió a separar hojas, frutos, corteza, tallo secundario y raíces. Posteriormente las hojas y la corteza fueron secadas durante tres días en un secador eléctrico para proceder a la reducción de tamaño. En cuanto al tallo secundario y la raíz primero fueron sometidos a una reducción de tamaño en una trituradora para la obtención de trozos más pequeños para después ser secados y sometidos a una segunda molienda. En cuanto al fruto, se retiró la semilla y la pulpa fue recuperada para proceder a la maceración estática. Todas las partes fueron pesadas antes y después de ser procesados y sometidos a una maceración estática con MeOH durante un periodo de siete días, recuperando el disolvente

durante el proceso de concentración hasta obtener un extracto crudo seco (Figura 2.1, Tabla 2.1).

**Tabla 2.1 Porcentajes de obtención de extractos metanólicos obtenidos de distintas partes de *Diospyros anisandra*.**

Material vegetal	Material vegetal (g)	Extracto metanólico (g)	Porcentaje de obtención (%)
Hoja	580.00	96.25	16.59
Fruto	22.79	9.82	43.09
Tallo secundario	3300.00	294.17	8.91
Raíz	2460.00	128.50	5.22
Corteza del tallo	280.00	43.60	15.57

### 2.2.2 Obtención de los extractos

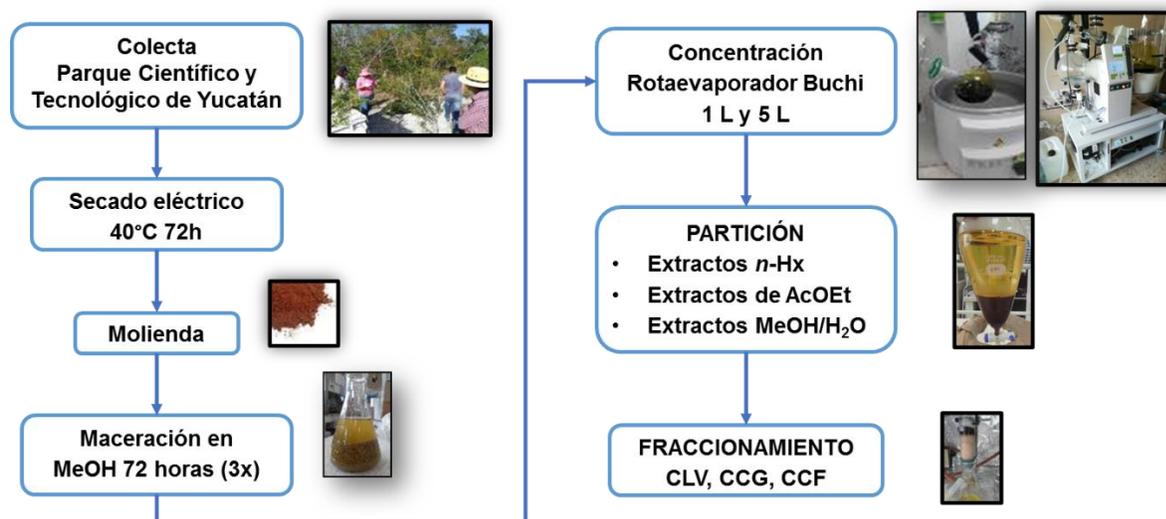
Del extracto crudo de cada parte de *D. anisandra*, se obtuvieron extractos de distinta polaridad mediante una partición líquido-líquido. Para la partición líquido-líquido con *n*-Hx, cada extracto crudo fue resuspendido en MeOH hasta disolverse completamente, del volumen resultante de MeOH adicionado, se agregó agua en una proporción 1:1, al volumen resultante se le adicionó el disolvente *n*-hexano en una relación 3:1 (*n*-hexano /MeOH-H<sub>2</sub>O) y se llevó a un baño ultrasónico durante 30 min. Posteriormente dicha mezcla se vertió en un embudo de separación obteniendo el extracto *n*-hexánico y la mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O en distintas fases, esta operación se realizó 3 veces para asegurar una extracción eficiente de los metabolitos de baja polaridad. El extracto *n*-hexánico se concentró en un rotaevaporador para finalmente obtener un producto seco que posteriormente fue almacenado a 4 °C (Figura 2.1).

Para los extractos de mediana polaridad, se realizó una partición líquido-líquido con AcOEt a partir de la mezcla recuperada durante el proceso anterior (MeOH-H<sub>2</sub>O). Primero se le adicionó acetato de etilo (AcOEt) en una relación 3:1 (AcOEt/fase MeOH-H<sub>2</sub>O) y sometida a una extracción por sonicación durante 30 minutos, para posteriormente recuperar la fase de AcOEt mediante un embudo de separación, dicha operación se realizó tres veces. Finalmente se

concentró el extracto de AcOEt en un rotaevaporador y una vez seco dicho extracto fue almacenado a 4 °C hasta su uso. La fase restante (MeOH-H<sub>2</sub>O) se llevó a concentración en un rotaevaporador, pero la formación de espuma no permitió concentrarla completamente y se procedió a su almacenamiento a -18 °C hasta su análisis (Figura 2.1 Tabla 2.2).

**Tabla 2.2 Porcentajes de obtención de extractos *n*-hexánicos (Hx) y de acetato de etilo (AcOEt) a partir de extractos metanólicos de distintas partes de *D. anisandra*.**

Material vegetal	Extracto metanólico (g)	Extracto Hx (%)	Extracto AcOEt (%)
Hoja	92.06	10.04	25.06
Fruto	8.28	6.08	33.35
Tallo secundario	137.75	5.96	17.79
Raíz	113.32	4.87	10.87
Corteza de tallo	40.33	8.26	46.25



**Figura 2.1** Diagrama general del procesamiento del material vegetal y obtención de los extractos y fracciones de hoja, fruto, corteza, tallo secundario y raíz a partir de *D. anisandra*.

---

### 2.2.2.1 Fraccionamiento de extractos *n*-Hx y AcOEt mediante cromatografía líquida al vacío (CLV).

Los distintos extractos obtenidos de baja (*n*-Hx) y mediana polaridad (AcOEt) de hoja (H), fruto (F), corteza (C), tallo secundario (T) y raíz (R) se sometieron a un fraccionamiento utilizando CLV.

A partir de 1000 mg de hoja, tallo y raíz y 925 mg de fruto, se procedió a realizar la CLV empleando como fase estacionaria arcilla activada (tonsil ®) empacada en una columna de vidrio de 2.8 cm de diámetro × 4 cm de altura, la fase móvil utilizada fue un sistema de elución en gradiente con *n*-Hx y mezclas de *n*-Hx-Acetona. Para los extractos *n*-hexánicos la elución se inició con un volumen de 50 ml para cada fracción con *n*-HX (100%, fracciones 1-2); mezclas *n*-Hx-An (95:5-fracción 3, 90:10-fracción 4, 80:20-fracción 5, 50:50-fracción 6), An (100%, fracción 7) y finalmente MeOH (100%, fracción 8) como se observa en la figura A2.a (Apéndice A) en la sección de anexos. Para los extractos de AcOEt de hoja, raíz, fruto y tallo se utilizó como soporte arcilla activada (2.8 × 4 cm) con un sistema de elución en gradiente utilizando 50 ml de disolvente para cada elución, comenzando con *n*-Hx (100%, fracciones 1); *n*-Hx:An (90:10-fracción 2, 80:20-fracción 3, 50:50-fracción 4); An (100%, fracción 5); An:MeOH (50:50-fracción 6) y finalmente MeOH (100%, fracción 7) (Figura A2.b sección Apéndice A).

Se siguió la misma metodología para el fraccionamiento de cantidades mayores de extractos *n*-Hexánicos y de AcOEt. En el caso de extracto *n*-Hx de fruto (408 mg + 1844.7 mg) y de extracto de AcOEt de raíz (9100 mg) se utilizaron columnas con dimensiones de 6.5 cm de altura × 5 cm de ancho utilizando 250 mL de disolvente para cada elución. Mientras que para el fraccionamiento de 20 g de extracto AcOEt de hojas, las dimensiones de la columna fueron 12 cm de diámetro × 5 cm de altura utilizando 500 mL de disolvente para cada elución con las mezclas correspondientes. Todas las fracciones fueron secadas en un rotaevaporador y transferidas a viales para su posterior subfraccionamiento, el cual dependió de la naturaleza de las fracciones obtenidas de las distintas partes de la planta (Figura 2.2).

### 2.2.2.2 Obtención de subfracciones a partir del fruto

Durante el fraccionamiento por CLV, se obtuvieron 8 fracciones a partir del extracto *n*-hexánico de fruto, de las cuales se decidió trabajar con la fracción 3 (F3) y la fracción 4 (F4). En la figura 2.3 se muestra el subfraccionamiento de la fracción F3 utilizando dos técnicas cromatográficas: primero se tomaron 40 mg realizando una CCG (1 × 35 cm) por elución isocrática Hx:AcEOt 80-

---

20 para pasar a un sistema AcEOt al 100%, y se repitió el proceso con otros 40 mg de dicha fracción reuniendo las fracciones similares. El segundo método consistió en colocar 270 mg de la fracción F3 utilizando un sistema de purificación flash isolera (Biotage), utilizando una columna SNAP ultra 10 g (Biotage, Uppsala, Sweden) a un caudal de 36 mL/min, como sistema de elución se empleó *n*-hexano (disolvente A) y acetato de etilo (disolvente B). En función de un análisis por CCD se utilizó para ambas fracciones un equilibrio con 5% de A/B de etilo con tres volúmenes de columna (VC), un gradiente que comenzó con 5% de A/B a 1 CV, de 5 a 40% de A/B con 10 VC, 40% A/B con 2 VC y finalizar con un lavado 40% A/B con 3.5 VC.

Posteriormente se tomaron 29 mg de una de las subfracciones obtenidas por dicha metodología nombrada como 3cF6i y fueron sometidos a una partición ácido-base, se disolvió en 10 mL de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y 20 mL de solución de KOH al 5%, se colocó en un embudo de separación, se recuperó la fase orgánica rica en terpenos (FiT) y se sometió a 5 lavados cada uno con 20 mL de solución de KOH. Los lavados reunidos fueron acidificados con una solución de HCl al 10%, posteriormente se realizaron lavados con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta recuperar en la fase orgánica rica en quinonas (FiQ).

Finalmente se colocaron 867 mg de la fracción F4 de fruto utilizando un sistema de purificación flash isolera (Biotage), utilizando una columna SNAP ultra 10 g (Biotage, Uppsala, Sweden) a un caudal de 36 mL/min, los disolventes a utilizar fueron *n*-hexano (disolvente A) y AcOEt (disolvente B). En función de un análisis por CCD se utilizó para ambas fracciones un equilibrio con 5% de A/B de AcOEt con tres volúmenes de columna (VC), un gradiente que comenzó con 5% de A/B a 1 CV, de 5 a 40% de A/B con 10 VC, 40% A/B con 2 VC y finalizar con un lavado 40% A/B con 3.5 VC.

### *2.2.2.3 Obtención de subfracciones a partir de la raíz y tallo*

En el caso de la raíz, la fracción 4 del extracto de acetato de etilo (R4), se realizó un procedimiento similar al de la fracción F3 con el extracto *n*-Hx del fruto utilizando dos técnicas cromatográficas. Primero se tomaron 462 mg y se fraccionó en una CCG (2.5 cm de diámetro x 15 cm de altura) empleando un sistema de elución por gradiente con *n*-hexano:AcOEt (95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50), y AcOEt:MeOH (100:0, 50:50, 0:100). El volumen de elución fue de 100 mL por cada mezcla de sistema de disolventes. Se obtuvieron 87 fracciones, las cuales fueron reunidas en 14 fracciones de acuerdo a perfiles cromatográficos similares por CCD. Nuevamente se tomaron 400 mg de la fracción R4 y se fraccionaron en una columna del

---

sistema de purificación flash isolera utilizando la columna SNAP ultra 10 gr (Biotage, Uppsala, Sweden) a un caudal de 36 mL/min, utilizando como disolventes *n*-hexano (disolvente A) y acetona (disolvente B), comenzando con un equilibrio con 7% de A/B de acetona con tres volúmenes de columna (VC), un gradiente que comenzó con 7% de A/B a 1 CV, de 7% a 60% de A/B con 10 VC, 60% A/B con 2 VC y finalizar con un lavado 60% A/B con 3.5 VC.

Finalmente la fracción 5 de raíz (R5) y de tallo (T5) resultado de la CLV fueron sometidas a un subfraccionamiento por exclusión molecular en columnas de vidrio de 1.5 cm de diámetro y 30 cm de altura empacadas con Sephadex (LH-20), utilizando una elución isocrática con 100% metanol colectando 20 mL de cada subfracción resultando en 30 subfracciones; se llevó a cabo el monitoreo por CCD y se redujeron a un total de 9 subfracciones para raíz y 6 subfracciones para tallo. De las subfracciones obtenidas de R5 la subfracciones de la 11 a la 14 fueron reunidas [R5(11-14)] y colocadas en una columna (1.5 × 30 cm) con silica gel (200-400 mesh) utilizando un sistema de elución en gradiente con volúmenes de 100 mL por cada mezcla de *n*-hexano:AcOEt (80:20, 70:30, 60:40); *n*-hexano:AcOEt:MeOH (50:40:10, 30:50:20, 10:60:30) y finalmente MeOH (100%) obteniendo 20 subfracciones y durante el monitoreo por CCD se redujeron a 10 subfracciones como observa en la figura 2.4.

### *2.2.3 Obtención de perfiles cromatográficos e identificación de moléculas presentes en distintas partes de D. anisandra.*

#### *2.2.3.1 Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)*

Para la realización de los perfiles cromatográficos se emplearon los siguientes sistemas de elución: *n*-hexano/An (8:2 y 7:3), *n*-hexano/AcOEt/MeOH 8:1.8:0.2, los extractos y fracciones obtenidas durante la metodología fueron diluidos en diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a una concentración de 1%, se realizaron cuatro aplicaciones por cada muestra. Para el revelado de las placas se empleó una solución general con ácido fosfomolibdico y uno específico para quinonas (KOH al 5% en etanol).

#### *2.2.3.2 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).*

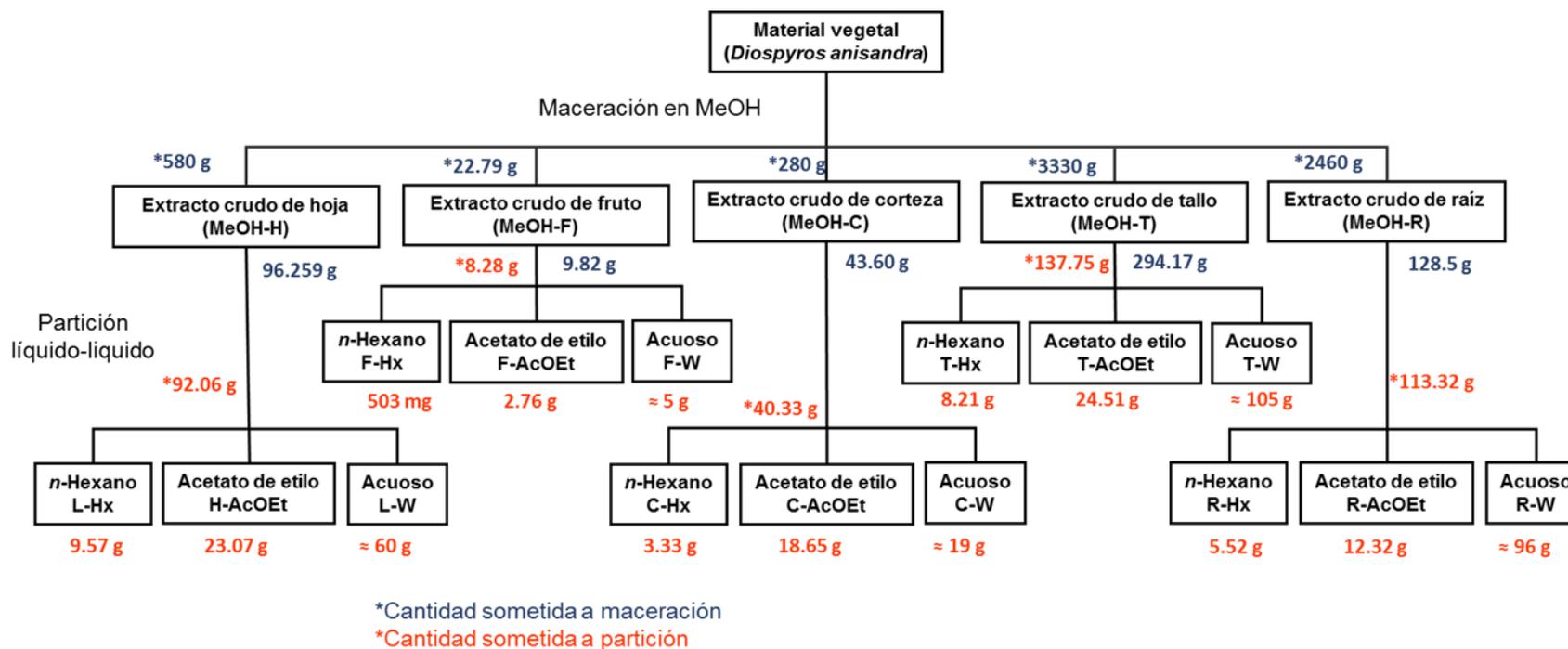
Los estudios de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de las particiones Hx y AcOEt, se realizaron en un equipo Agilent technologies 6890N Network acoplado a un detector másico Agilent technologies 5975B inert MSD, utilizando una columna capilar 100% dimetilpolisiloxano (ULTRA1, modelo 19091A-112) de una longitud de 25 m,

---

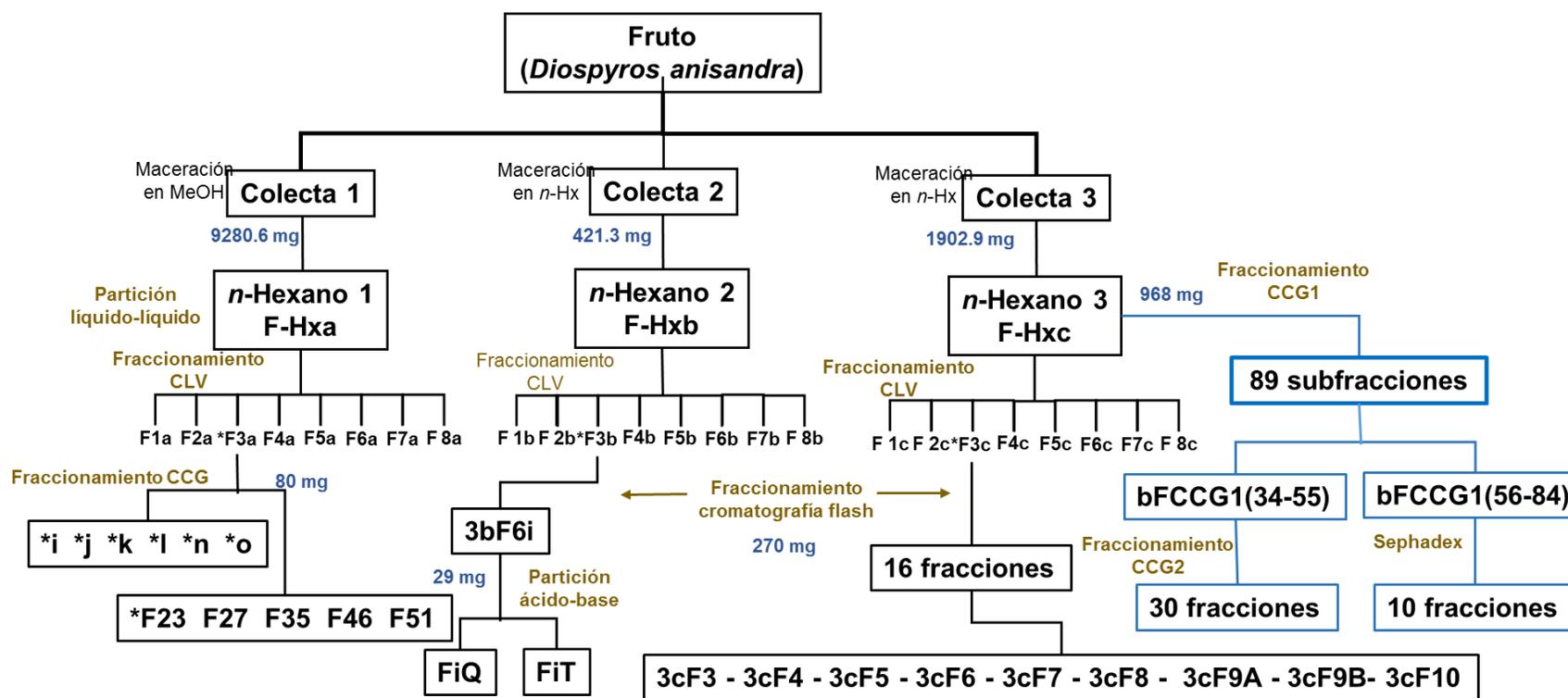
diámetro de 0.320 mm y 0.52  $\mu\text{m}$  de espesor y como programa de temperatura  $T_1=140\text{ }^\circ\text{C}$  (3 min),  $T_2=280\text{ }^\circ\text{C}$  (30 min) con un gradiente de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Se utilizó helio UAP (ultra alta pureza) marca Praxair como gas acarreador a un rango de flujo de 1 mL/min.

### *2.2.3.3 Análisis por cromatografía de alta resolución (HPLC)*

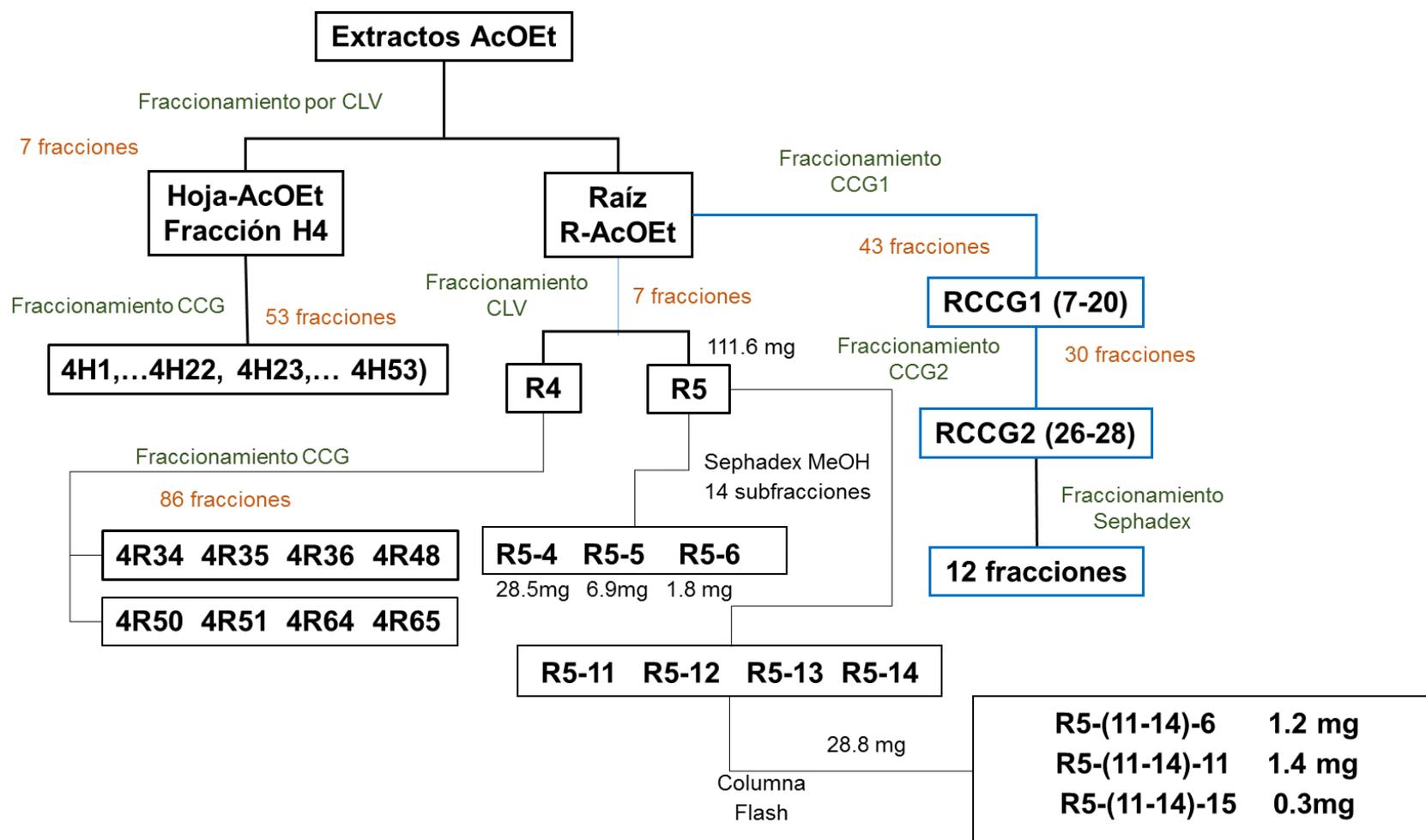
Para la realización de los perfiles cromatográficos por HPLC de las particiones de los extractos *n*-Hx así como los de AcOEt, se utilizó un equipo Perkin-Elmer con detector UV/Vis (FXUVDet-2), a una longitud de onda de 250 nm y una columna ODS Hipersil™ (200 x 4.5 mm). El disolvente A fue acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker) y el disolvente B fue H<sub>2</sub>O desionizada tipo I (18 M $\Omega$ ). La velocidad de flujo del eluyente fue de 0.7 mL/min. El perfil de gradiente A:B en equilibrio (2 min) en una relación 5:95, durante la corrida (2 min 5:95, 48 min 95:5 y 10 min 5:95) siendo un tiempo total de 60 minutos y 15 minutos de lavado en una proporción 5:95. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ .



**Figura 2.2** Diagrama de obtención de extractos *n*-hexánicos (n-Hx), de acetato de etilo (AcOEt) y acuosos (W) a partir de extractos crudos metanólicos (MeOH) de hojas (H), frutos (F), corteza (C), tallo (T) y raíces (R) de *D. anisandra*.



**Figura 2.3** Diagrama de obtención de fracciones a partir de extractos *n*-hexánicos (n-Hx) de fruto mediante distintas técnicas cromatográficas

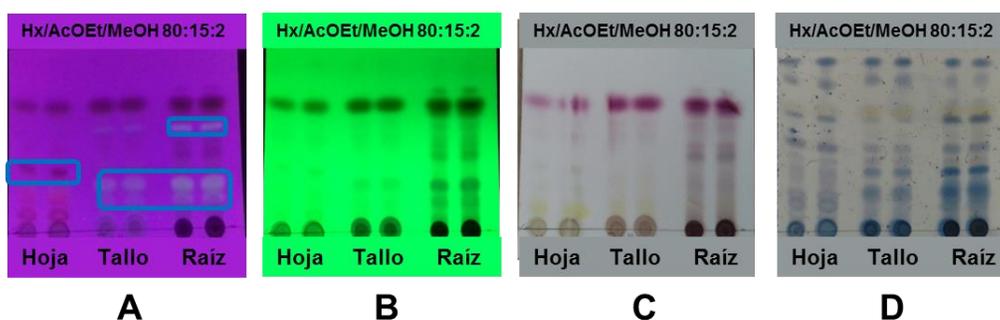


**Figura 2.4** Diagrama de obtención de fracciones a partir de extractos de acetato de etilo (AcOEt) de hoja y raíz mediante distintas técnicas cromatográficas.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Obtención de los perfiles cromatográficos por CCD

Se analizaron por CCD los extractos crudos metanólicos de la hoja, tallo y raíz para visualizar la complejidad de cada extracto. En la Figura 2.5A y 2.5B se aprecian compuestos que absorben a longitudes de 254nm y 365nm lo que permite previamente confirmar moléculas que poseen anillos aromáticos, en la figura 2.5C se muestran que dichas partes de la planta son ricas en quinonas y finalmente la figura 2.5D nos permitió obtener una comparación general entre los perfiles de cada parte de la planta. Las fracciones obtenidas por CLV a partir de extractos *n*-Hx de hoja, raíz y fruto de *D. anisandra*, de las cuales se colectaron 8 fracciones mostraron perfiles complejos y aparición de más bandas que en los extractos metanólicos no pudieron apreciarse; además de la aparición persistente de una mancha amarilla a un Rf de 0.69 en la fracción 4 de hoja (H4), a un Rf de 0.74 en la fracción 3 de raíz (R3) y a un Rf de 0.69 en la fracción 2 del fruto (F2) correspondiente a compuestos del tipo quinona (Apéndice B Figura B1.A), mientras las fracciones obtenidas a partir de AcOEt, podemos observar un perfil menos complejo que de los *n*-Hx y sin la aparición de bandas amarillas (Apéndice B Figura B1.B).

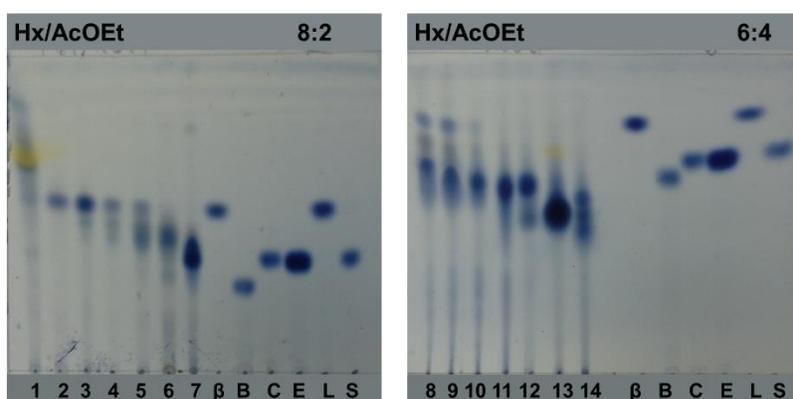


**Figura 2.5** CCD de hoja, tallo y raíz observadas a onda corta (A), onda larga (B), revelada en KOH en etanol (C) y en ácido fosfomolibdico (D) de extractos metanolicos a partir de *D. anisandra*.

Los perfiles de los fraccionamientos subsecuentes, permitieron reunir las fracciones que mostraban bandas similares y seleccionar aquellas que se observaron con mayor pureza para lograr realizar los análisis de identificación de compuestos presentes en dichas muestras como lo muestra el fraccionamiento realizado de la F3 del fruto mediante CCG (Apéndice B Figura

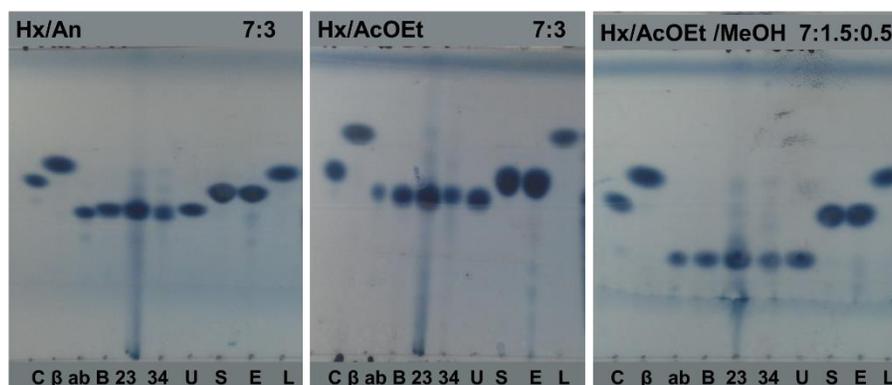
B2). En el caso de la raíz se lograron obtener subfracciones semipuras como lo fue en el caso de la R5-(11-14)-6, R5-(11-14)-11, R5-(11-14)-15 (Apéndice B Figura B3).

Para la confirmación de algunos de los componentes reportados en el género *Diospyros* en fracciones semipuras obtenidas de las distintas partes vegetales de *D. anisandra* se emplearon estándares comerciales (uvaol, ácido betulínico, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, amirina) o compuestos puros obtenidos de estudios anteriores (betulina, plumbagina, lupeol) de la corteza de esta especie. Como se aprecia en la Figura 2.6 algunas de las fracciones obtenidas de la fracción F3 del fruto, sugieren la presencia de  $\beta$ -amirina, lupeol, estigmasterol y/o campesterol (Fracciones 1-7), así como betulina (fracciones 8 a 11) y  $\beta$ -sitosterol (fracciones 8 y 9).



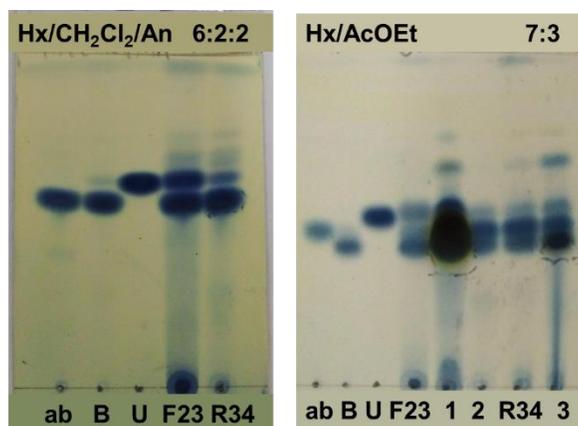
**Figura 2.6** CCD de 14 subfracciones obtenidas a partir de de la fracción F3 de fruto mediante CCG, comparada con  $\beta$ -amirina ( $\beta$ ), betulina (B), campesterol (C), estigmasterol (E), lupeol (L) y sitosterol (S).

Estos resultados llevaron a comparar dos de las fracciones semipuras que se obtuvieron durante el fraccionamiento (F23, F28 y 4R34) con otras referencias de naturaleza terpenica como el uvaol y el ácido betulínico, a pesar de manejar distintos sistemas, la estructura similar de algunos de los terpenos (uvaol, betulina, y ácido betulínico) empleados en la comparación, presentan un Rf muy similar en distintos sistemas de disolventes, lo que hizo difícil identificar mediante CCD de fase normal (Figura 2.7).



**Figura 2.7** Comparación de la fracción 3F23 de fruto (23) y 4R34 de raíz (34) con campesterol (C),  $\beta$ -amirina ( $\beta$ ), ácido betulínico (ab), betulina (B), uvaol (U), sitosterol (S), estigmasterol (E) y lupeol (L).

Por lo anterior, fue necesario emplear cromatografía de argentación, mediante esta técnica se le dio un tratamiento previo a la placa de CCD con una solución de nitrato de plata al 10% en acetonitrilo. De esta forma, fue posible diferenciar las bandas correspondientes a cada tipo de terpeno, por la interacción del doble enlace de sus estructuras con el nitrato de plata, formando un complejo que permite diferenciar estos metabolitos mediante una diferencia en el Rf con respecto a uno y otro. De esta forma fue posible sugerir la presencia de betulina y uvaol en la subfracción de fruto (3F23) y hoja (4H23), mientras que en raíz (subfracciones R27, 4R34 y R11), la presencia de betulina y ácido betulínico que se evidencia en la figura 2.8.



**Figura 2.8** Comparación de la fracción 3F23 de fruto (F23) y 4R34 de raíz (R34) con ácido betulínico (ab), betulina (B) y uvaol (U), adicionalmente se compararon las fracciones, 4H23 (1), ccgR27(2) y R11 (3).

---

### 2.3.2 Análisis por CG/EM de extractos y fracciones a partir de *D. anisandra*

En la Tabla 2.3 se enlistan los componentes presentes identificados en los extractos *n*-Hx de hoja, fruto, tallo secundario y raíz de *D. anisandra* con respecto a la base de datos NITS11 con un porcentaje de similitud mayor al 90%. Cabe señalar que, si bien 6 fueron los componentes que se lograron identificar de acuerdo con la base de datos del equipo, existen otros que no pudieron identificarse por su patrón de fragmentación másico. La presencia de plumbagina (5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona) presente en todas las partes de la planta se visualiza en todos los cromatogramas que registraron picos en tiempo de retenciones entre 10.3 y 10.5 minutos (Tabla 2.3 y Figura B4 del apéndice B); esta naftoquinona tiene un peso molecular de 188 g/mol y su patrón de fragmentación corresponde a lo ya reportado anteriormente por trabajos realizados en el laboratorio de Química de Productos Naturales (Uc-Cachón *et al.*, 2013) (Figura 2.9). Otro metabolito identificado, que es común en hoja, fruto y tallo, con un tiempo de retención (TR) alrededor de los 24 minutos, es la vitamina E, mientras que el ácido *n*-hexadecanoico solo se identificó en hoja y raíz; y finalmente el ácido 9,12-octadecadienoico en fruto y raíz. Los restantes compuestos fueron particulares para cada una de las partes de la planta (Tabla 2.3). También se analizaron otras fracciones obtenidas de los extractos *n*-hexánicos que se muestran en la figura B5 (Apéndice B), y que además se registran en forma de tabla (Tabla 2.4).

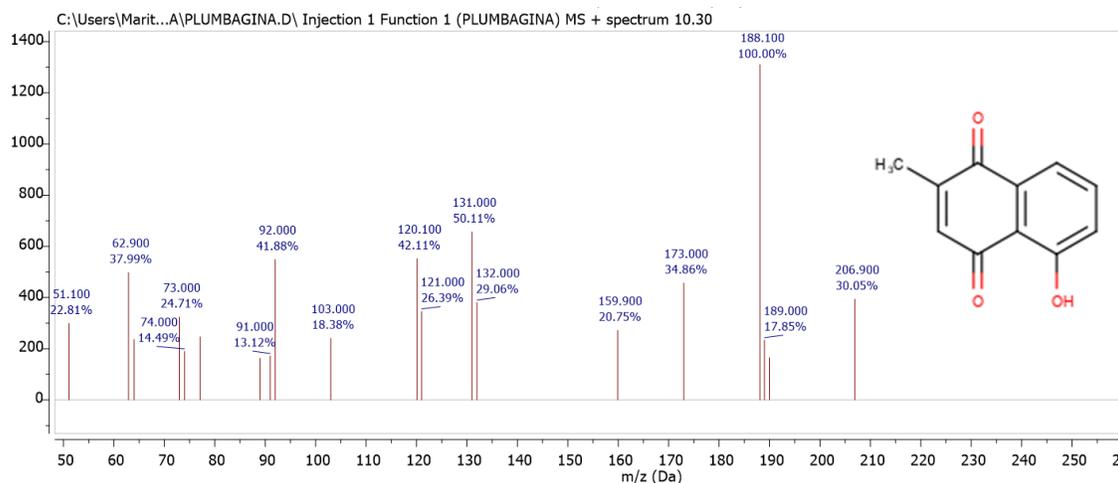
Del fruto se obtuvieron 6 fracciones semipuras, una de ellas la fracción 3F23 (obtenida mediante CCG de la fracción F3), en la cual se identificaron dos compuestos del grupo de los terpenos, el uvaol y la betulina (Figura 2.10A) los cuales ya se habían confirmado mediante el análisis por CCD por argentación, mientras que en la Figura 2.10B se confirmó la presencia de plumbagina en la fracción F3-2-5i obtenida mediante una purificación flash de la fracción F3, y se observa como una banda amarilla presente en la placa de CCD después de ser revelada con ácido fosfomolibdico.

En cuanto a la fracción HxF6, que fue obtenida mediante el fraccionamiento por CLV del extracto *n*-hexánico de fruto, se observan dos picos mayoritarios a tiempos de retención de 16.87 y 17.595 min que corresponden a  $\alpha$ -amirina (16) y lupeol (5) respectivamente (Figura 2.11A), mientras que la fracción 3F48 obtenida mediante CCG, se identificó un pico a un TR de 15.401 min que corresponde al 4-(pentiloxi)benzaldehído (17) como se aprecia en la Figura 2.11B.

Dos de las fracciones obtenidas por purificación flash de la fracción F3 de fruto, 3F8i y 3F9i, mostraron la presencia de  $\alpha$ -amirina (16) y lupeol (5) que se aprecian en la figura 2.12, permitiendo observar claramente que las fracciones semipuras obtenidas fueron ricas en compuestos de naturaleza terpénica. Finalmente, de la partición ácido de base, tanto en la fracción rica en quinonas FiQ como en la fracción rica en terpenos, ambas contienen lupeol (Figura 2.13).

**Tabla 2.3 Moléculas presentes en los extractos *n*-hexánicos de las distintas partes de *Diospyros anisandra* a diferentes tiempos de retención (TR) en el análisis de CG/MS comparados con la base de datos NIST11.**

PARTE	TR (min)	Compuesto	% Similitud
Hoja	10.337	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona (1)	98
	14.337	Ácido n-hexadecanoico (2)	97
	21.165	Escualeno (3)	99
	24.092	Vitamina E (4)	99
Fruto	10.368	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona(1)	98
	15.762	Ácido 9,12-octadecadienoico (6)	98
	24.079	Vitamina E (4)	98
	26.782	sitosterol (7)	97
	28.083	Lupeol (5)	91
Raíz	10.362	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona (1)	99
	14.102	Ácido n-hexadecanoico (2)	90
Tallo	10.368	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona (1)	99
	15.316	Ácido 9,12-octadecadienoico (6)	99
	24.073	Vitamina E (4)	99



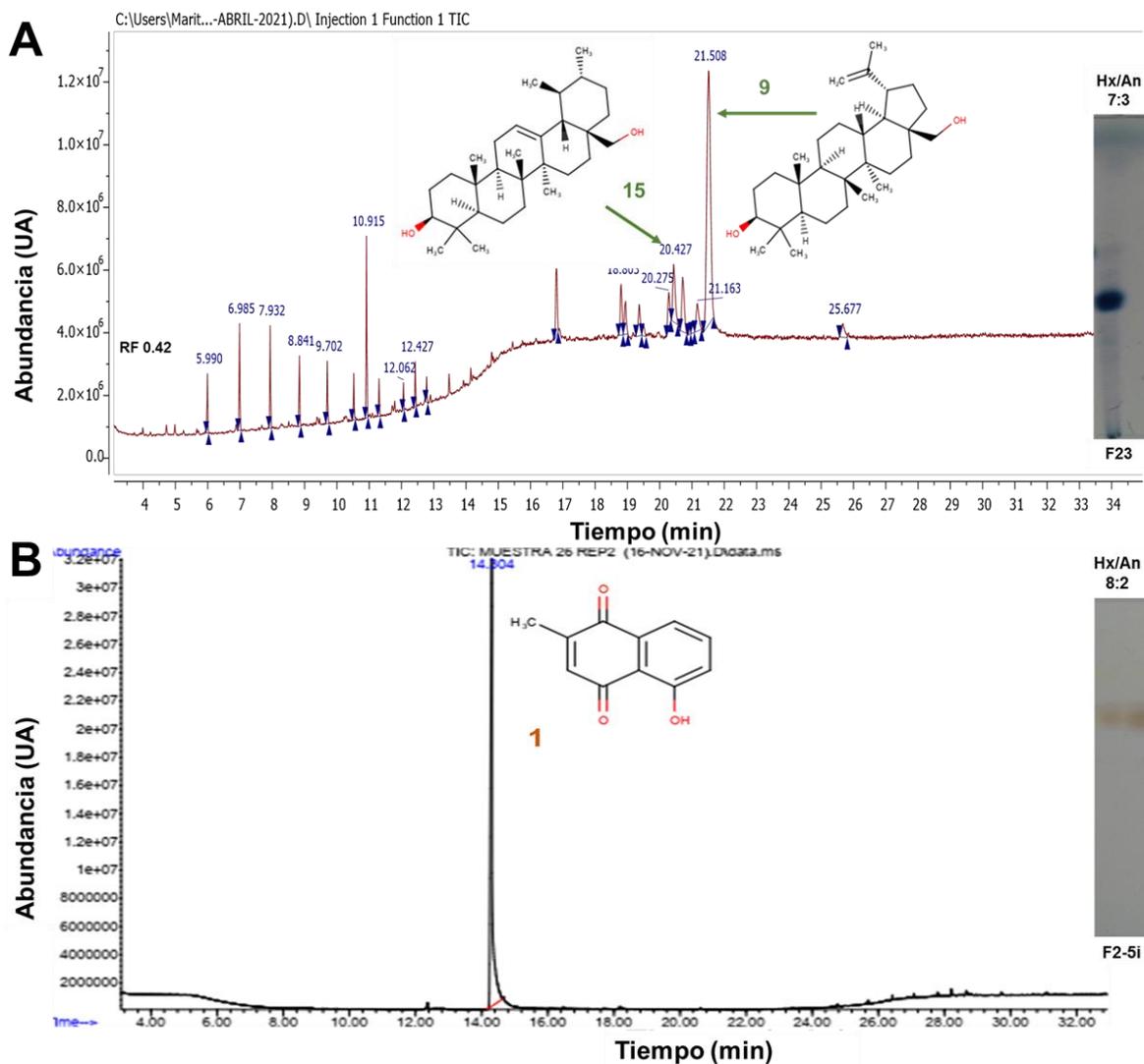
**Figura 2.9** Patrón de fragmentación de la plumbagina (5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona).

En el caso de los extractos de AcOEt debido a la presencia de compuestos polares, dificultó el análisis de estos por CG-EM, solamente fue analizada la fracción R4 proveniente del extracto de AcOEt de raíz y que se muestra en la figura B6 (Apéndice B) donde de acuerdo a la base de datos NIST11 se identificó plumbagina (1), sitosterol (7), betulina (9), 8b,13:13,17-Diepoxi-14,15-bis-norlabdano (13) y  $\beta$ -tocoferol (14).

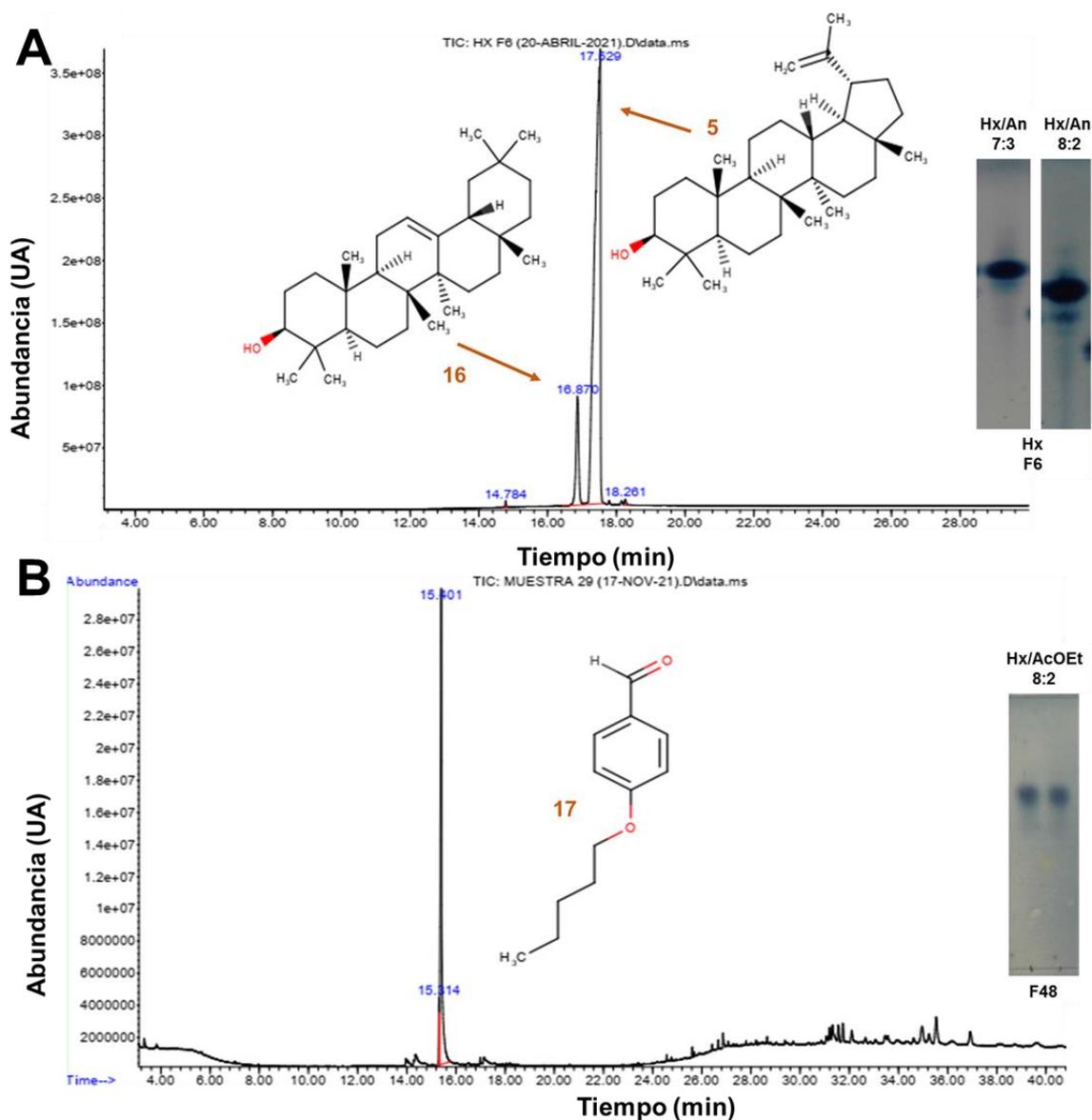
En lo que respecta a la raíz, las fracciones semipuras fueron dos, entre las que encontramos a la fracción 4R34 obtenida por CCG de la fracción R4 del extracto de acetato de etilo de raíz, y 4R9i obtenida por cromatografía flash, ambas mostraron contener lupeol como pico más abundante después de los 30 minutos de TR (Figura 2.14).

**Tabla 2.4 Moléculas identificadas mediante la base de datos NIST11 en las fracciones obtenidas a partir de extractos *n*-hexánicos de fruto y raíz de *Diospyros anisandra* mediante CG/MS.**

Fracción	TR (min)	Compuesto	Área (%)	% Similitud
F2	13.702	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (2)	18.07	97
	21.165	Escualeno (3)	81.93	99
F3	28.798	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona (1)	4.92	97
	28.899	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (2)	3.97	97
	52.645	Estigmasterol (8)	1.87	90
	53.359	Sitosterol (7)	5.16	97
HxR2	58.999	Betulina (9)	40.538	50
	10.354	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona (1)	3.61	96
	13.71	Ácido pentadecanoico (10)	3.37	98
HxR4	15.391	Ácido 9,12-octadecadienoico (6)	2.26	99
	24.036	Vitamina E (4)	12.29	98
	26.813	Sitosterol (7)	12.09	93
	27.914	Lupeol (5)	25.08	90
HxR4	10.398	5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona (1)	78.32	99
	26.594	sitosterol (7)	4.41	97
HxR5	14.102	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (2)	4.06	94
	25.374	Ursa-9(11),12-dien-3-ona (11)	1.96	91
	26.74	Urs-12-en-3-ona (12)	9.346	95

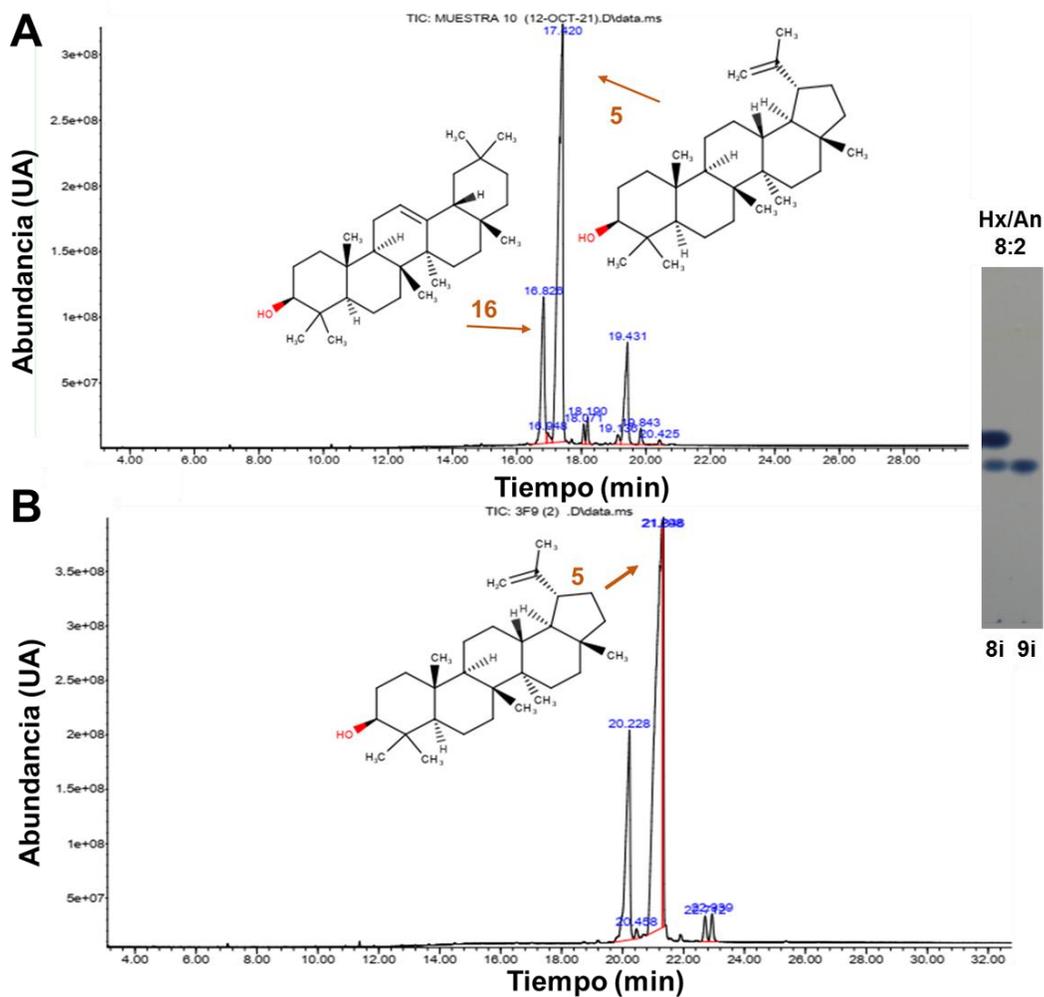


**Figura 2.10** Análisis por cromatografía de gases y por CCD de la fracción F23 (A) y F3-2-5i (B). En cada cromatograma se observan las estructuras de la betulina (9), el uvaol (15) y la plumbagina (1).



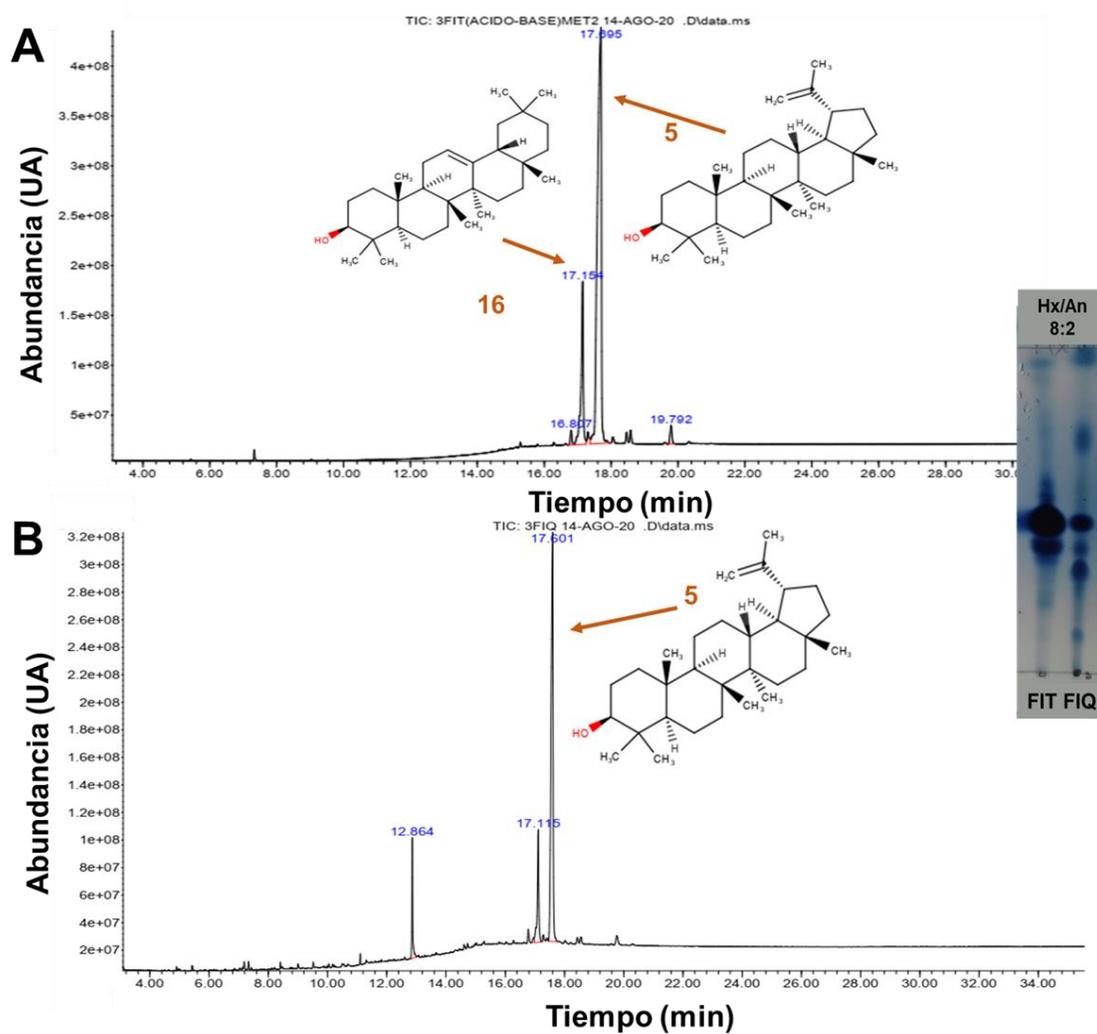
**Figura 2.11** Análisis por cromatografía de gases y CCD de la fracción HxF6 (A) y 3F48 (B).

En la fracción semipura HxF6 se observa una banda en el análisis de CCD en un sistema de disolventes *n*-Hx/An 7:3, mientras que se observan 2 bandas en el sistema de disolventes 8:2, confirmando la presencia de  $\alpha$ -amirina (16) y lupeol (5) (A) y la fracción 3F48 donde mediante CCD se observa una sola banda en un sistema Hx:AcOEt 8:2 y corresponde a 4-(pentiloxi)benzaldehído (17).

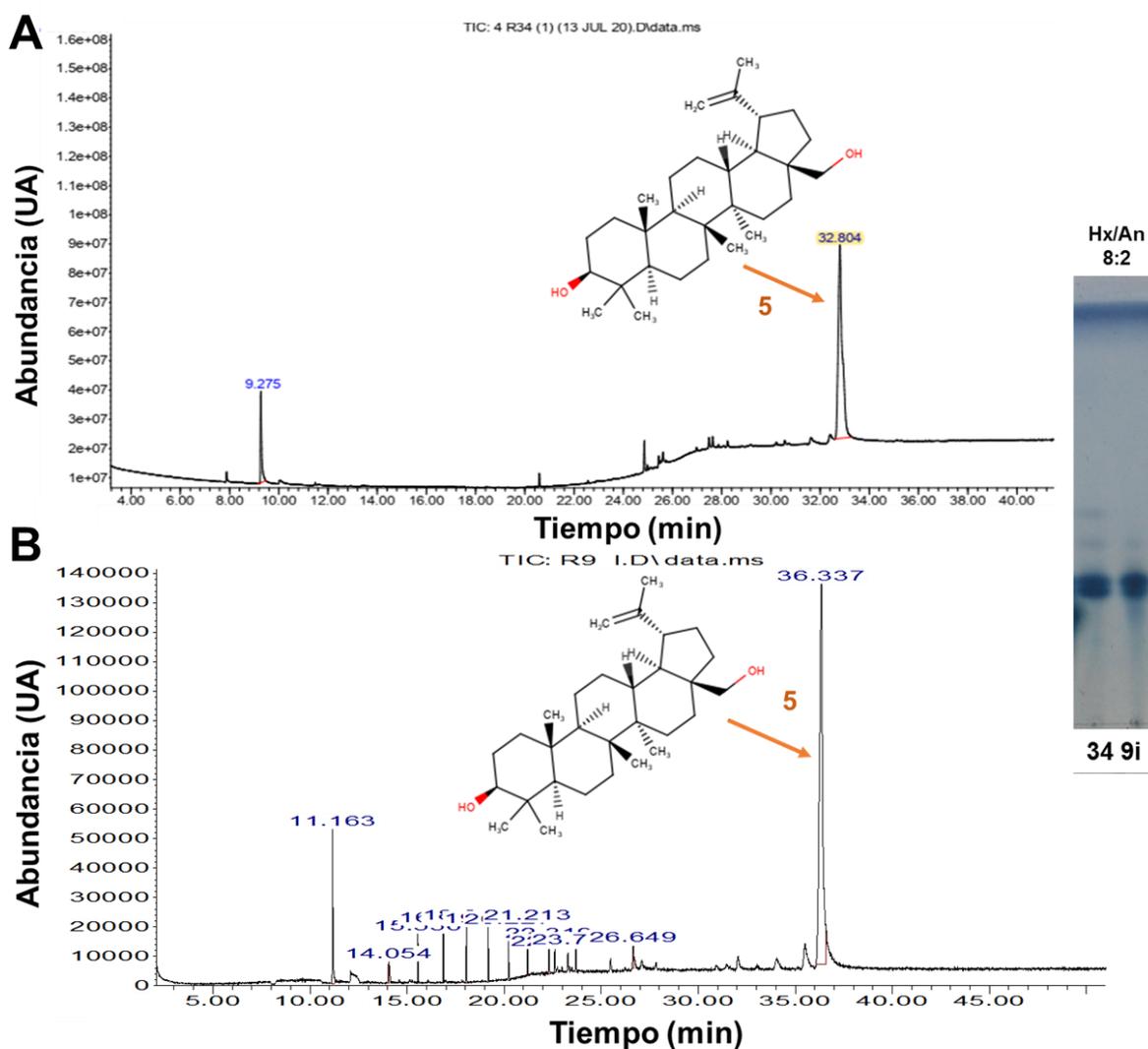


**Figura 2.12** Análisis por cromatografía de gases y CCD de las fracciones obtenidas mediante cromatografía flash.

En la fracción semipura 3F8i (**A**) se observa la presencia de  $\alpha$ -amirina (16) y lupeol (5) y la fracción 3F9i (**B**) donde el análisis por CG/EM confirmó lupeol (5), mientras que por CCD en un sistema de disolventes n-Hx/An 8:2, se observa una sola banda.



**Figura 2.13** Análisis por cromatografía de gases de FIT (A) y FIQ (B) obtenidas por fraccionamiento ácido-base donde se identificó lupeol (5) y  $\alpha$ -amirina (16).



**Figura 2.14** Análisis por cromatografía de gases de la fracción 4R34 (A) y R9i (B).

En ambas fracciones se identificó lupeol (5) y se observan bandas a un factor de retención (Rf) similar en ambas muestras en un sistema Hx/An 8:2.

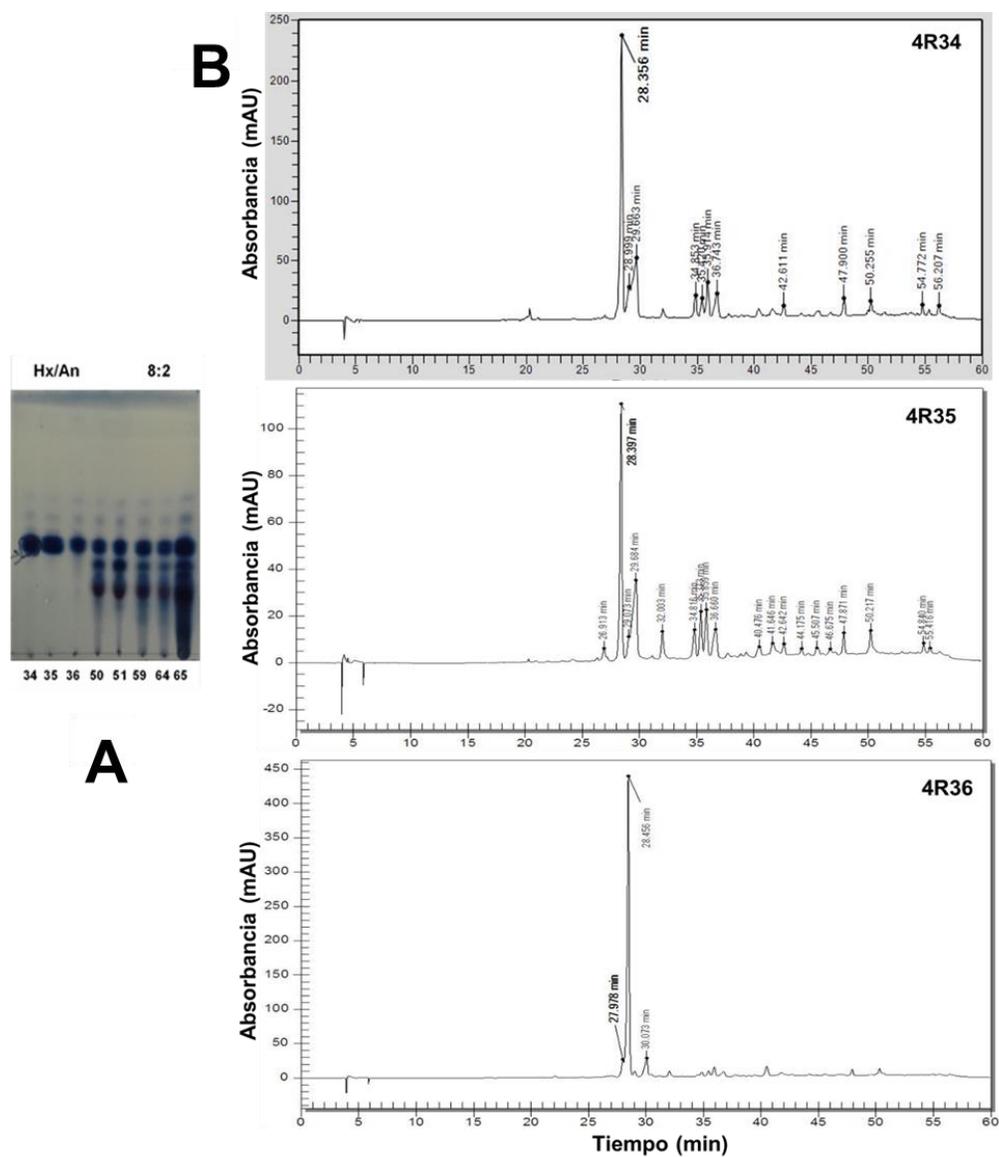
### 2.3.2.2 Análisis mediante HPLC de extractos obtenidos a partir de *D. anisandra*.

En la Figura B8 (apéndice B) se aprecian los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos de AcOEt de las distintas partes vegetales. En el caso de corteza se observan un perfil de aproximadamente 34 picos, lo que revela que la mayoría de las moléculas presentes, pueden ser detectadas mediante esta técnica, encontrándose un pico muy notable a tiempo de retención (TR) de 28.406 minutos (Figura B7.A), en el perfil cromatográfico del fruto se aprecian únicamente tres picos, entre los que destaca un pico a un tiempo de retención de 3.667 minutos (Figura B7.B), en el caso de hoja el de mayor abundancia es similar al de la corteza a un TR de 28.408 minutos (figura B7.C) y finalmente mientras que para tallo el de mayor abundancia se localiza a un tiempo de retención de 28.455 minutos (Figura B8.D), ese pico a ese tiempo de retención pareciera que se trata de la misma molécula.

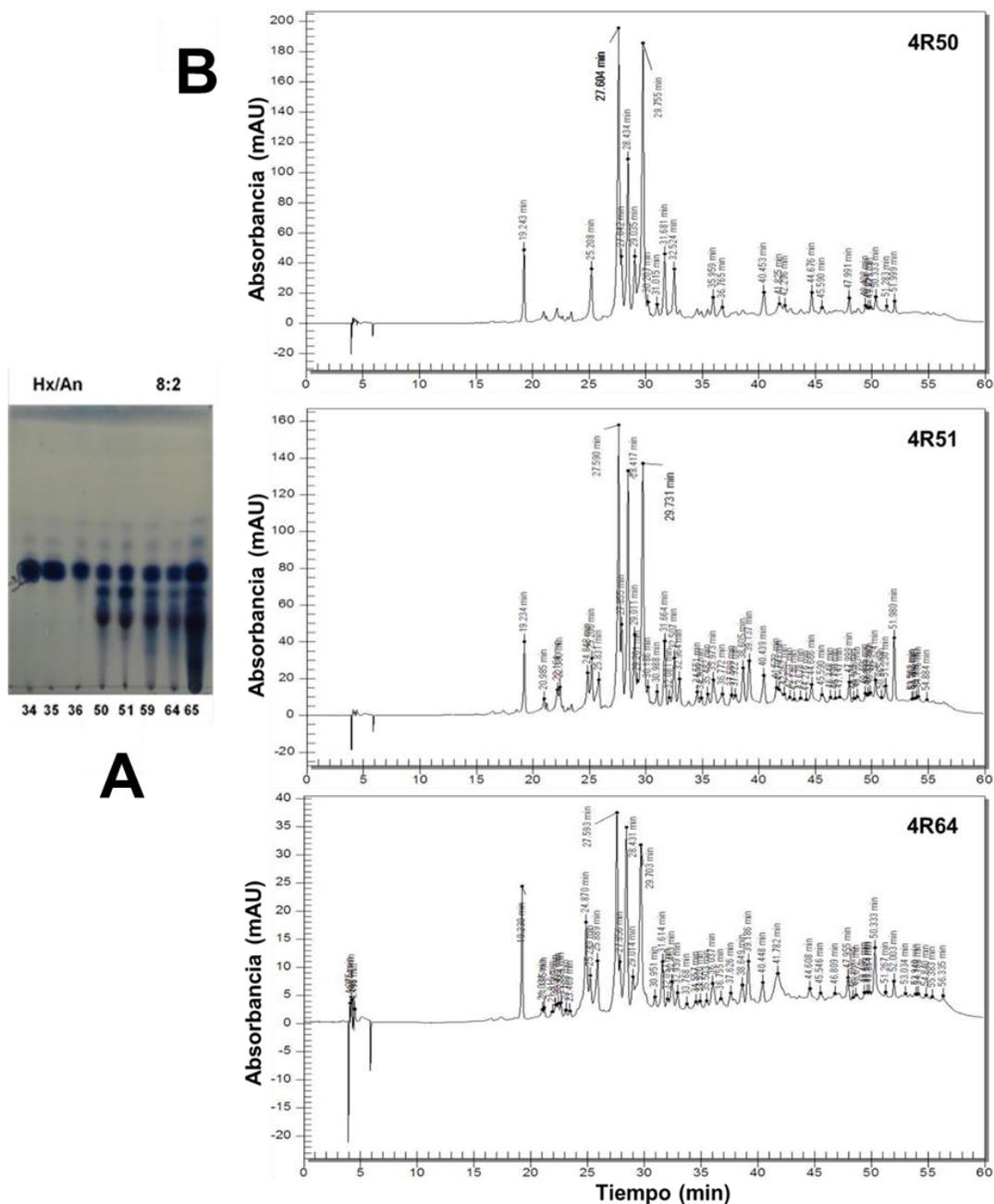
En cuanto a los extractos acuosos en la figura B9 (Apéndice B) se visualizan los perfiles cromatográficos de fruto, hoja, tallo secundario y raíz. Se observa que la hoja mostró mayor complejidad en el perfil cromatográfico, siendo que las restantes solo mostraron picos más abundantes en los primeros 4 minutos de tiempo de retención, indicando la presencia de componentes más polares en estas partes vegetales.

Los cromatogramas que aparecen en las figuras 2.14 y 2.15 pertenecen a las fracciones de extractos de AcOEt de raíz. En el caso de 4R34 el pico más abundante se presentó a un tiempo de retención (TR) de 28.356 minutos con una absorbancia por arriba de 200 mAU, el pico de 4R35 a un TR de 28.397 minutos por arriba de los 100 mAU y en 4R36 en el que solo se aprecian dos picos, el pico más abundante se registró a un TR de 28.456 minutos por arriba de 400 mAU y un segundo pico a 30.073 minutos. Los picos que muestran mayor absorbancia aparecen en tiempos de retención que oscilan entre los 28 minutos sugiriendo que se trata del mismo compuesto presentes en las muestras 4R34, 3R35 y 4R36.

En la figura 2.15 se aprecia que para la sub fracción 4R50, el pico que aparece a un tiempo de retención de 27.604 minutos es la señal de mayor absorbancia seguida por un pico a 29.755 minutos y una tercera señal a 28.434 minutos. En consonancia con los perfiles por CCD el perfil de bandas y de pico está en consonancia con la complejidad de la muestra.



**Figura 2.15** Perfil cromatográfico por CCD (**A**) y por HPLC (**B**) de subfracciones (4R34, 4R35 y 4R36) obtenidas por cromatografía de gravedad a partir de la fracción R4 de raíces de *D. anisandra*



**Figura 2.16** Perfil cromatográfico por CCD (**A**) y por HPLC (**B**) de subfracciones (4R50, 4R51 y 4R64) obtenidas por cromatografía de gravedad a partir de la fracción R4 de raíces de *D. anisandra*

---

## 2.4 DISCUSIÓN

Los compuestos identificados en los extractos *n*-hexánicos de las distintas partes de *D. anisandra*, algunos ya han sido reportados en corteza, por el grupo de trabajo de química de productos naturales, como la plumbagina, lupeol y betulina (Uc-Cachón et al., 2013). La plumbagina se ha identificado en abundancia en especies del género *Plumbago* entre las que se destaca *Plumbago zeylanica* (Chitrak) y también se ha aislado en especies del género *Diospyros* como *D. elliptifolia*, *D. gracilipes*, *D. hebecarpa*, *D. hoyleana*, *D. kaki*, *D. marítima*, *D. mespiliformis* entre otras (Jaradat et al., 2021; Sharma, 2017; Pant et al., 2012). La plumbagina posee propiedades entre las que destaca su capacidad anticancerígenas así como aplicaciones farmacológicas de interés, colocándola como objeto de estudio para aumentar su producción (Thakor & Janathia et al., 2021; Cao et al., 2018; Roy & Bharadvaja, 2017).

Adicionalmente mediante el análisis de CG/EM se identificó vitamina E, presente en todas las partes vegetales con excepción de la raíz. La vitamina E tiene un papel importante en plantas, ya que protegen contra el estrés oxidativo limitando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), participando en procesos de señalización ante factores abióticos y bióticos para mejorar la tolerancia al estrés en plantas (Miyazawa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2014), lo que no es de extrañar en *D. anisandra* que crece muy bien en climas de la selva caducifolia. La presencia de ácidos grasos como el ácido *n*-hexadecanoico, ácido 9,12-octadecadienoico y ácido 9,15-octadecadienoico está reportado en la mayoría de las plantas, ya que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son el principal constituyente de las membranas lipídicas de plantas (Adewuyi & Rotimi, 2014; Walley et al., 2013).

En lo que respecta al escualeno es un precursor para la síntesis de triterpenos como lupeol y fitoesteroles: sitosterol y estigmasterol, los cuales sirven de precursores de hormonas esenciales en el desarrollo de la planta, así como la respuesta a estrés biótico y abiótico (Jafari et al., 2019; Ferrer et al., 2017). Estos resultados son preliminares y de apoyo para trabajos futuros que requieran conocer el impacto de factores bióticos y abióticos en el perfil fitoquímico de *D. anisandra*. Dicha diferencia es esperada ya que los factores ambientales son determinantes en el rendimiento de metabolitos de ésta especie, acorde a trabajos reportados ya está bien documentado que los factores bióticos y abióticos a los que están expuestas las plantas estimulan o inhiben la producción de metabolitos primarios o secundarios para contrarrestar los efectos a los que se encuentran expuestas (Buchanan et al., 2015).

---

En cuanto al análisis de los perfiles por CCD, nos permitió confirmar de manera rápida el perfil general de cada parte de la planta, utilizando referencias comerciales como la  $\beta$ -amirina, betulina, campesterol, estigmasterol, sitosterol, uvaol y ácido betulínico y otros aislados como la plumbagina, betulina y lupeol, dichas moléculas ya han sido confirmadas en otras especies del género *Diospyros*, (Somwong *et al.*, 2021; Rauf *et al.*, 2017; Herath *et al.*, 1978).

Respecto a los extractos de AcOEt, cabe mencionar que ya se han realizado estudios sobre compuestos de mediana polaridad en el género *Diospyros*, es el caso de la corteza de *D. glans*, de la que se aislaron ocho moléculas a partir de extractos de AcOEt, identificándolas como ácido úsnico, ácido 11-oxoacetil ursólico, 13-28-epoxiurs-11-en-3,28-diona, ácido betulínico, ácido (3 $\beta$ )-3,23-dihidroxiup-20(29)-en-28-oico, ácido (3 $\beta$ )-3-(acetiloxi)-urs-12-en-28-oico, aldehído betulínico, y ácido (3 $\beta$ )-3,23-dihidroxiup-12,20(29)-dien-28-oico, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-HEMS), algunos de ellos exhibieron inhibición de la replicación del virus del dengue como el ácido betulínico y aldehído betulínico. (Peyrat *et al.* 2016). Se ha estudiado las fracciones solubles en cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) a partir de corteza y hoja de *D. gracilipes* de la que se aislaron: lupenona, ácido ursólico, 3 $\alpha$ -taraxerol, 3 $\beta$ -taraxerol, pinocembrina, escopoletina, plumbagina, elliptinona y por primera vez se identificó ácido corosólico y 3 $\beta$ -E-cumaroiltaraxerol en esta género, todas las moléculas fueron elucidadas mediante datos de espectros de <sup>1</sup>H NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY y EM (Rasamison *et al.*, 2016).

Recientemente se estudiaron extractos de acetato de etilo de la corteza de *D. undulata*, los cuales fueron fraccionados mediante cromatografía en columna flash y permeación en gel, mediante propiedades físicas y métodos espectroscópicos se identificó cis-isoshinanolona, plumbagina, 2-hidroximetil-5-metoxi-1,4-naftoquinona, isodiospyrina, maritnone, 7,7'-biplumbagin, 3,3'-biplumbagin, umckalina, escopoletina, friedelina, 28-O-acetilbetulina, betulina y ácido betulínico (Suchaichit *et al.*, 2018). Por lo que cabe la posibilidad de que alguno de ellos también esté presente en los extractos de acetato de etilo de *D. anisandra* lo que se requiere continuar con la purificación para aislar e identificar los compuestos mayoritarios.

En cuanto a los extractos acuosos, no fue posible determinar un perfil fitoquímico, pero en se ha identificado ácido gálico, ácido elágico, kampferol, quercetina, miricetina, miricetina-3-O- $\beta$ -glucuronido, miricetina-3-O- $\alpha$ -ramnosido, ácido ferúlico, ácido fotocatecuico y ácido caféico en extractos acuosos de frutos de *D. lotus* (Gao *et al.*, 2014; Loizzo *et al.*, 2009). En otras especies como *D. bipindensis* se identificaron compuestos del tipo cumarinas 4-O-glicosiladas aisladas a

partir de una maceración acuosa de corteza y en el caso de *D. crassiflora* fueron aislados dos novedosos glicosidos 5-metilcumarina nombrados diosfebosido A y B, kaempferol, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido, ácido ursólico, ácido betulínico, estigmasterol y estigmasterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, en hojas (Cesari *et al.*, 2013; Akak *et al.*, 2010). Lo anterior muestra que en extractos acuosos de algunas especies del género *Diospyros* podemos encontrar una amplia variedad de familias de compuestos, por lo que los extractos acuosos obtenidos de *D. anisandra* son un material interesante para la continuación de estudios fitoquímicos más detallados.

---

**CAPÍTULO III**

***Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-Hemagglutinin-Neuraminidase activity on Influenza AH1N1pdm09 virus.**

**DOI: 10.1080/14786419.2021.1917568**

Mari Toña Juárez-Méndez<sup>a</sup>, Rocío Borges-Argáez<sup>a\*</sup>, Guadalupe Ayora-Talavera<sup>b</sup>, Sigfredo Edmundo Escalante-Rebolledo<sup>a</sup>, Fabiola Escalante-Erosa<sup>a</sup> and Mirbella Cáceres-Farfán<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, Yucatán, México; <sup>b</sup> Departamento de Virología, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Calle 96 s/n x Av. Jacinto Canek y Calle 47, Paseo de Las Fuentes, 97225 Mérida, Yucatán, México

Corresponding author

\*Dr. Rocío Borges-Argáez, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, 97200 Mérida, Yucatán, México. E mail: rborges@cicy.mx. Phone. +52 9999428330, Fax. +52 9999813900. ORCID: 0000-0002-4337-0031.

**Abstract**

Influenza viruses mutate frequently, prompting the search and design of new drugs. Influenza viral proteins Haemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA) are important targets for antiviral design. We analyzed for the first time the anti-HA activity and the NA inhibitory activity of extracts and their fractions from *Diospyros anisandra* leaves, stem bark, fruits, and roots on the influenza AH1N1pdm09 virus. Five fractions from the *n*-hexane fruit extract exhibited HA inhibitory (HAI) activity, and fraction F3 inhibited the hemagglutination from 12.5 up to 100 µg/mL. Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS) on fraction F3 and the *n*-hexane extract of the fruit identified six compounds that were individually evaluated. Only vitamin E and lupeol showed a slight inhibitory activity on HA at 100 µg/mL. Regarding the NA assays, none of the fruit, leaves, and stem bark extracts showed an effect. Noteworthy, the presence of fluorescent (coumarin) and antioxidant (α-tocopherol) compounds in the root extract, unmasked the NA

assays when using fluorescence techniques. We concluded that *D. anisandra* is a promising source of bioactive compounds with diverse properties including anti-HA activity on the influenza AH1N1pdm09 virus.

Keywords: *Diospyros anisandra*, haemagglutinin, neuraminidase, influenza, fluorescence, antioxidant

### 3.1 Introduction

*Diospyros anisandra* is a quasi-endemic plant species of the Yucatan Peninsula, México. Initial studies of the phytochemical profile of *D. anisandra* stem bark identified an abundance of quinone and terpenoid compounds (Uc-Cachón *et al.*, 2013). Furthermore, the antimycobacterial, cytotoxic, and antiviral properties of *D. anisandra* have been described (Borges-Argáez *et al.*, 2007). Zeylanone epoxide, a compound isolated from an extract of the stem bark of *D. anisandra*, has potential anti-influenza activity (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). Influenza is an ongoing public health concern and the pharmaceuticals currently used to treat it promote drug resistance, driving the search for and design of new drugs and vaccines. Surface glycoproteins haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are an important target for antiviral design, these determine many viral properties in the influenza virus (Dou *et al.*, 2018). Actually, few antivirals targeting the viral neuraminidase (oseltamivir, zanamivir, and peramivir) or affecting virus replication (baloxavir marboxil) are FDA approved (FDA, 2020). Umifenovir, a viral hemagglutinin inhibitor, is used as a prophylactic treatment in Russia and China (Proskurnina *et al.*, 2020). Influenza viruses' ability to bind to turkey, chicken, and human red blood cells has been used to qualitatively identify extracts, fractions or compounds from plants with possible anti-haemagglutinin effects (Rajasekaran *et al.*, 2013). Different enzymatic methods that mimic the neuraminidase activity, are currently available to evaluate inhibition of influenza virus NA (Liu *et al.*, 2018). The study aimed to evaluate the HA and NA inhibitory activities of extracts from *D. anisandra* leaves, stem bark, fruits, and roots on the influenza AH1N1pdm09 virus, using the hemagglutination inhibition assay and two fluorescence assays (Amplex® Red and MUNANA as substrate). In addition, the study analyses the phytochemical profile and the cytotoxicity of extracts.

### 3.2 Results and discussion

Studies carried on the *n*-hexane stem bark extract of *D. anisandra*, demonstrated that this plant contains compounds with antiviral activity (Cetina-Montejo *et al.*, 2019). However, the antiviral

---

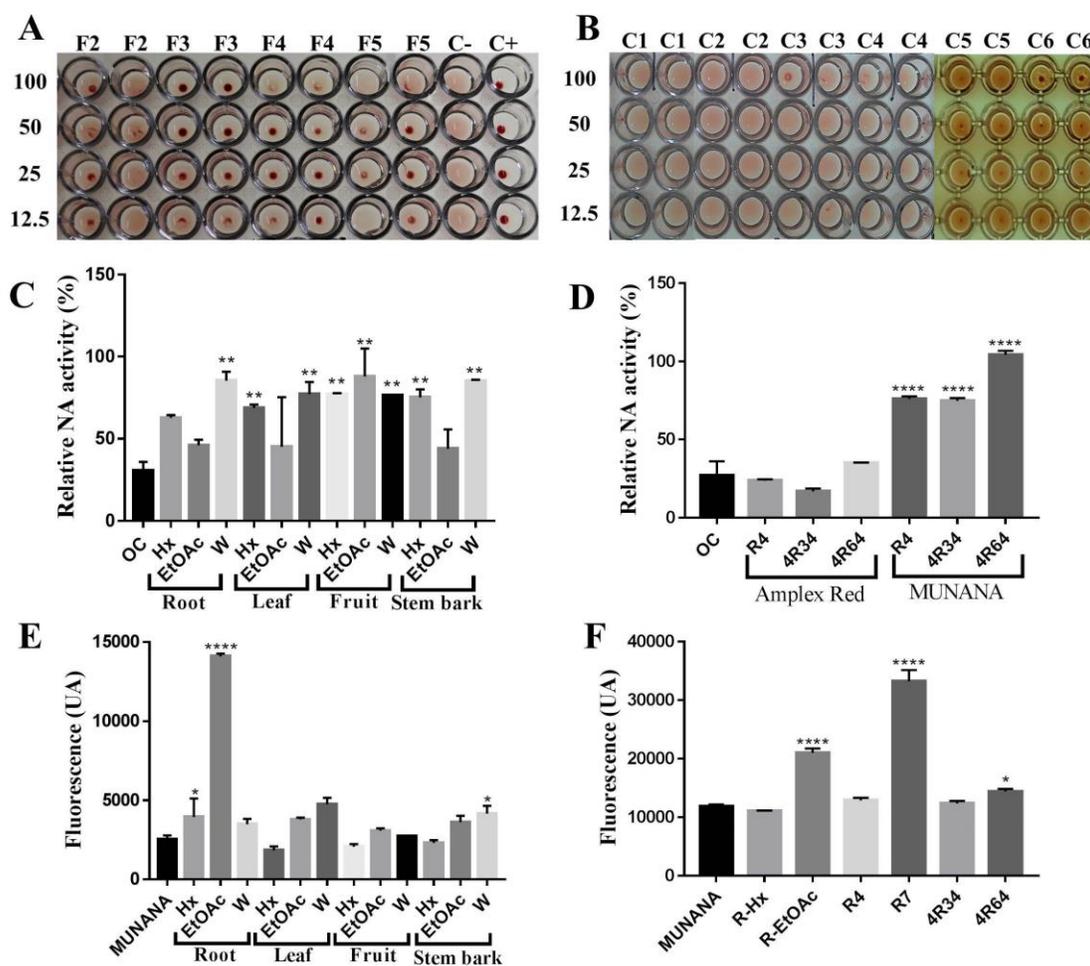
potential of the leaves, roots and fruits of this species continues to be unexplored. Therefore, in the present work, from leaves, roots, stem bark and fruits methanol macerated, were obtained the respective *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc) and aqueous (W) extracts (Figure S1). All were evaluated using assays based in two important viral proteins of the influenza virus AH1N1, the HA and the NA.

The results showed that only the *n*-hexane extracts of the fruit exhibited HAI activity at the highest concentration tested of 50 µg/mL (Figure S2). Thus, the *n*-hexane extract of the fruit was fractionated by VLC, and the eight resulting fractions (Figure S1) were evaluated in the HAI assay. The results showed that fraction F3 inhibited the influenza HA activity at all tested concentrations (Figure 1A). Thus, the *n*-hexane extract of the fruit and its fraction F3 were analysed by GC-MS (Figure S3A, and S3E). Vitamin E, *trans*-9,12-octadecadienoic acid, β-sitosterol, plumbagin, betulin, and lupeol, were identified (Table S1). After purchase as commercial reagents, except plumbagin that was purified in the laboratory (Uc-Cachón *et al.*, 2013), their activity on the influenza HA of the virus A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1pdm09) (Ramirez-Gonzalez *et al.* 2011) was assessed using the HAI assay. Only vitamin E and lupeol exhibited weak activity at 100 µg/mL (Figure 1B). Vitamin E is known to have antioxidant activity and immune system benefits (Lee & Han, 2018), there are no reports of its antiviral activity against influenza virus (IAV) strains, but specifically, α-tocopherol (Vitamin E) has been suggested as a prospective component of influenza therapy in combination with oseltamivir, due to its antioxidant properties, reducing the effects of oxidative stress during infection (Galabov *et al.*, 2015). Lupeol has shown several important pharmacological activities: anti-inflammatory, cardioprotective, antimicrobial, antidiabetic among others (Siddique & Saleem, 2011). However, neither lupeol nor vitamin E have reports of antiviral activity against the influenza virus. Overall, our results suggest that the mixture of compounds contained on the *n*-hexane fruit extract may therefore have a synergistic effect on the HA viral protein. A similar case of the synergy between curcumin and monoacetylcurcumin has been reported against IAV infection (Richart *et al.*, 2018), and the combination of herbal mixture capsules known as Shufeng Jiedu together with oseltamivir is suggested as a strategy for treating viral infections and enhancing antiviral activity (Ji *et al.*, 2020).

The next step was to analyse the neuraminidase inhibition activity of all 12 extracts (*n*-hexane, EtOAc and W) and their fractions (Figure S1). As a preliminary screening, the Amplex® Red (AR) assay was first used (Gamaleldin *et al.*, 2016). Only EtOAc extracts exhibited a higher percentage of NAI activity (Figure 1C), these extracts were therefore fractionated, and

---

evaluated with the NAI assay (Figure S1, and Figure S4A). Finally, EtOAc root extract and its fractions R4, 4R34, and 4R64 were selected to confirm the NAI properties. Those were evaluated using both assays, the MUNANA and the Amplex<sup>®</sup> Red (AR) against the influenza strain A/Yucatan/2370/2009. The inhibitory effect of R4, 4R34, and 4R64 on influenza NA using MUNANA, showed a significant difference with respect to the AR assay (Figure 1D). This discrepancy suggested the hypothesis that extracts may contain fluorescent compounds that were interfering with the enzymatic reaction. To confirm that, extracts and selected fractions (R4, 4R34, and 4R64) were dissolved in DMSO, and measured at 535 nm in the absence of virus and any other reagents. The *n*-hexane and aqueous extracts of leaf, stem bark, and root showed no fluorescence emission (Figure 1E). However, the EtOAc root extracts and its fractions R7 and 4R64 caused a significant increase in fluorescence, confirming the presence of fluorescent compounds that clearly could mask the fluorescent substrate used in the MUNANA assay (Figure 1F). Thin layer chromatography (TLC) analysis showed fluorescent bands at 365 nm, especially a blue fluorescent band in the EtOAc extract with a R<sub>f</sub> (retention factor) similar to that of commercial scopoletin (Figure S4B) suggesting its presence in the active fractions, although in the CG/MS analysis it was not possible to be identified (Figure S3F) due to its low concentration. Coumarins have been reported in several *Diospyros* species such as *D. filipendula*, and *D. ehretioides* (Wisetsai *et al.*, 2019; Wosawat *et al.*, 2021); and coumarin scopoletin has been detected in *D. kaki* leaves and *D. undulata* stem bark (Cesari *et al.*, 2013). The results from the NA inhibition assays suggest that these compounds may interfere with the assay as the two techniques employ different wavelengths. The AR assay is based on enzymes classified as oxidoreductases, such as galactose oxidase (GAO) and horseradish peroxidase (HRP). Scopoletin affects hydrogen peroxide and HRP in such a way that it can cause increased fluorescence (Miller *et al.*, 1975; Corbett, 1989). Coumarins, on the other hand, are reported to strongly interact with other peroxidases, inhibiting their enzymatic activity (Thada *et al.*, 2013), and interfering with the assay performance (Summers *et al.*, 2013). Added to this, the presence of antioxidant compounds, in addition to scopoletin, such as  $\alpha$ -tocopherol (native fluorescence at 334 nm), and other compounds don't identified (Figure S3F) may add another interference factor to the measurement (Parra *et al.*, 2018; Demirkaya-Miloglu *et al.*, 2013). This was confirmed on the DPPH assay in fractions R4, and 4R64 as yellow spots on a purple background (Figure S4C), suggesting also antioxidant activity in *D. anisandra*.



**Figure 3.1** Haemagglutination and neuraminidase inhibition assay.

Haemagglutination inhibition (HAI) assay of fractions obtained by VLC from the *n*-hexane extract of *D. anisandra* fruits (A), and pure compounds [plumbagin (C1), trans-9,12-octadecadienoic acid (C2), vitamin E (C3),  $\beta$ -sitosterol (C4), betulin (C5), and lupeol (C6)] (B). Neuraminidase activity of *n*-hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous (W) extracts using AR assay (C), and Neuraminidase inhibition (NAI) activity of root fractions (R4, 4R34, and 4R64) using AR, and MUNANA enzymatic assay using a positive control oseltamivir carboxylate (CO), with statistical analysis (D). Fluorescence emission at 535 nm of *n*-hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous (W) extracts (E). Fluorescence emission at 535 nm of *n*-hexane (R-Hx) and ethyl acetate (R-EtOAc) extracts compared with R-EtOAc fractions (R4, 4R34, 4R64) (F). (Dunnett's Test,  $p < 0.05$ ).

Finally, the GC/MS analysis confirmed the presence of large amounts of plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthalenedione) in *n*-hexane extracts (Figure S3A-S3E). This metabolite has

---

been identified in *D. anisandra* stem bark, and other *Diospyros* species, such as *D. shimbaensis* (Aronsson *et al.*, 2016; Quintal-Novelo *et al.*, 2013). The *n*-hexane and EtOAc extracts were highly cytotoxic compared to the aqueous (Table S2). The highly content of plumbagin suggests an association to the cytotoxicity, as it is known to be toxic and inducer of apoptosis in different cell lines, including the MDCK cells (Messeha *et al.*, 2018).

### 3.3 Experimental

#### 3.3.1 Plant material

Samples of *D. anisandra* were collected in February 2018 at Sierra Papacal, Yucatan, Mexico. A voucher specimen (collection number 71015) was deposited at the Herbarium of the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) in Mérida, Yucatan, Mexico.

#### 3.3.2 Extraction and fractionation

Leaves, fruit, stem bark and roots were dried and then ground (Pagani Mod. 1520) to reduce particle size. Each plant part was extracted separately three times with methanol by static maceration for 48 hours. Solvents were removed under pressure in a rotary evaporator (Buchi Mod. RII). A portion of each methanol extract was dissolved in MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) and the resulting mixture extracted three times with *n*-hexane to obtain an extract. The remaining aqueous portion was extracted with EtOAc following the same *n*-hexane procedure. The final aqueous portion was lyophilized. Each extract was evaluated with cytotoxic, haemagglutinin inhibition (HAI), and neuraminidase inhibition (NAI) assays.

Fractionation was done of the active *n*-hexane extract from *D. anisandra* fruit. The *n*-hexane extract (1000 mg) was processed with vacuum liquid chromatography (VLC) using bentonite (Tonsil®) as a stationary phase (2.5 × 5 cm). Eight final fractions (F1-F8) (Figure S1) were produced with a gradient elution system using mixtures of *n*-hexane/acetone/MeOH of increasing polarity. The fractions and the main extract were tested with the HAI assay. Active EtOAc extract from roots (9100 mg) was processed with VLC using bentonite as a stationary phase (6.5 × 5 cm). Eight final fractions (R1-R8) (Figure S1) were produced with a gradient elution system using mixtures of *n*-hexane/acetone/MeOH of increasing polarity. Active fraction R4 (462 mg) was fractionated by GCC (2.5 × 15 cm) using gradient elution with *n*-hexane/EtOAc mixtures, resulting in 87 fractions (4R1-4R87) (Figure S1). The fractions and the main extract were tested with the NAI assay.

---

### 3.3.3 GC/MS analysis

The components in the *n*-hexane and EtOAc extracts (fruit and root) were analysed with a gas chromatographer (Agilent Technologies 6890N) coupled with a mass selective detector (5975B). Chromatography conditions were split injection of 1  $\mu$ L of 10  $\mu$ g sample in dichloromethane; Ultra 1 phenyl capillary column (30 m  $\times$  0.25  $\mu$ m); flow rate of 1 mL/min (helium as carrier gas); initial column temperature of 140  $^{\circ}$ C for 3 minutes after injection; increased by 10  $^{\circ}$ C/min to 280  $^{\circ}$ C. Extract component identification was done by computer searches in commercial reference libraries. Mass spectra fragmentation patterns were compared with those from the NIST05 libraries and with commercial standards such as vitamin E,  $\beta$ -sitosterol and *trans*-9,12-octadecadienoic acid.

### 3.3.4 Bioassays

#### 3.3.4.1 Cells and viruses

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (Donated by Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico InDRE/IRR FR-58) were kept in 1X Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% foetal bovine serum (GIBCO), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (GIBCO). Cells were grown at 37  $^{\circ}$ C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Influenza virus strains were provided by the Virology Laboratory of the Dr. Hideyo Noguchi Regional Research Centre of the Autonomous University of Yucatan (Universidad Autónoma de Yucatán – UADY). The identified viruses were A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm and A/Mexico/InDRE797/10 (H1N1-H275Y) pdm.

#### 3.3.4.2 Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of each extract (*n*-hexane, EtOAc, and aqueous) was evaluated in MDCK cells. The cells were seeded in 96-well plates at a  $5 \times 10^4$  cells/well density and incubated for 24 hours at 37  $^{\circ}$ C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, according to previous reports (Cetina-Montejo et al. 2019). Cells were washed twice with PBS and incubated with 100  $\mu$ L of six different dilutions of each extract (100-3.125  $\mu$ M) in triplicate, using a cell control with only DMEM and 1% DMSO. Cells with extracts were incubated at 37  $^{\circ}$ C for 72 hours. Cell viability was quantified by staining with 0.4% crystal violet in methanol and then reading absorbance at 490 nm in a microplate reader (Victor 3x, Perkin Elmer 2030). The optical density (OD) of the treated cells was then compared

---

with that of the control cells, assumed to be 100% viable. Mean cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) was estimated by plotting the percent of cell viability versus extract concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 3.3.4.3 Haemagglutination inhibition (HAI) assay

The HAI assay was done to assess if the extracts and compounds inhibited haemagglutination activity. The assay was done in U-bottom 96-well plates. The *n*-hexane extract or compounds were serially diluted in PBS (100-12.5  $\mu\text{g/mL}$ ), mixed with 4 HA Units of virus, and incubated for 1 hour at 4 °C. Then, 50  $\mu\text{L}$  of a 1% solution of Turkey Red Blood cells (RBC) was added and the mixture incubated for 1 hour at 4 °C. The positive control was virus + RBC, and the negative control was RBC only.

#### 3.3.4.4 Neuraminidase activity inhibition (NAI) assay

The NAI assay was done to evaluate if the extracts or fractions affected neuraminidase activity. Two fluorescence techniques were utilized: Amplex<sup>®</sup> Red for preliminary evaluation and selection of active extracts and using the MUNANA assay on influenza virus AH1N1 neuraminidase. The Amplex<sup>®</sup> Red neuraminidase assay kit (Invitrogen) was used following manufacturer's instructions, preparing 2X working solution (50  $\mu\text{L}$  Amplex<sup>®</sup> Red solution, 10  $\mu\text{L}$  galactose oxidase solution, 250  $\mu\text{L}$  fetuin solution, and 45,900  $\mu\text{L}$  buffer solution). Evaluation of neuraminidase activity was done using purified NA enzyme from *C. prefringes*; 49  $\mu\text{L}$  extracts/fraction solutions were placed in 100  $\mu\text{g/mL}$  and 1  $\mu\text{L}$  enzyme solution added to each microplate well. Subsequently, 25  $\mu\text{L}$  of 2X working solution was added to each well and read at 465 nm absorption and 535 nm emission.

In the MUNANA assay, 12.5  $\mu\text{L}$  extract/fraction solution (100  $\mu\text{g/mL}$ ) and 12.5  $\mu\text{L}$  virus solution (previously titrated from H1N1 strains) were placed in each microplate well and incubated at 37 °C for 30 minutes. Subsequently, 25  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  MUNANA solution was placed in each well and kept under the same conditions. After adding 75  $\mu\text{L}$  0.1M stop solution (0.7507 g glycine dissolved in 100 ml 25% ethanol) to each well the plate was placed in a reader at 355 absorption and 535 nm emission. Relative neuraminidase activity ( $NA_R$ ) for both techniques was calculated as follows:

$$NA_R(\%) = \frac{A_{vc}}{A_v} \times 100$$

Where  $A_{vc}$  is virus activity in the presence of extract or fractions and  $A_v$  was activity with only the virus.

#### *3.3.4.5 DPPH antioxidant assay*

TLC (thin layer chromatography) analysis was realized in silica gel 60 F254 plates (Merck, Darmstadt, Germany), exposed in a *n*-Hexane/EtOAc (7:3) system as mobile phase. This plate was visualized at 365 nm using a Chromato-Vue® model C-75. Then, was sprayed with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) solution (0.2% in methanol). The presence of antioxidant compounds were visualized by yellow spots on a purple-pink background.

#### *3.3.5 Statistical analysis*

Bioassay evaluation results were expressed as standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were done using the one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc multiple comparisons test run with the PRISMA software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, version 5.01). Statistical significance (sample vs. control) was set at 0.05.



## CAPITULO IV.

### EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN SUBFRACCIONES ACTIVAS DE *Diospyros anisandra* CONTRA INFLUENZA AH1N1

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas son de las principales fuentes de obtención de moléculas de estudio con alguna actividad biológica potencial, en el caso de metabolitos con actividad antiviral el camino es largo, pero gracias a la tecnología y a la presencia de virus potencialmente peligrosos, este proceso se ha acelerado, permitiendo tener un banco de moléculas con aplicaciones para el tratamiento de las enfermedades virales ya presentes y futuras (Hughes *et al.*, 2011). Actualmente las dianas de estudio para el virus de la influenza, se basan en las proteínas superficiales de la membrana, y las nucleoproteínas virales (Yang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Las dos proteínas superficiales del virus de influenza que participan durante la etapa de reconocimiento de la célula hospedera y la liberación de la misma, son la HA y NA (Dou *et al.*, 2018; Benton *et al.*, 2017). En el caso de HA son pocas las moléculas en fases clínicas o preclínicas, que tienen como objetivo a dicha proteína, solamente una molécula sintética, el Arbidol, está aprobado su uso como tratamiento profiláctico de influenza en Rusia y China (Kadam & Wilson, 2017; Koszalka *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013), mientras que la NA a diferencia de la HA, al menos existen tres fármacos aprobados por la FDA con actividad anti-neuraminidasa, como lo es el Oseltamivir, Zanamivir y Peramivir.

Sin embargo, el shift y drift antigénico en estas dos proteínas (18 tipos de HA y 11 subtipos de NA), han provocado que el virus de influenza mute fácilmente. Por lo que tanto HA como NA siguen siendo un objetivo prometedor para el descubrimiento y diseño de antivirales que van desde anticuerpos, péptidos y moléculas de origen sintético y natural (Russell *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2017).

Para evaluar el efecto de inhibición sobre la hemaglutinina (IHA) del virus o de la interacción de las moléculas en la superficie de la célula huésped de cualquier fármaco de manera indirecta, se emplean ensayos de hemaglutinación. Debido a la capacidad de los virus de influenza para aglutinar eritrocitos de pavo, pollo o humanos, dichas técnicas permiten de manera cualitativa

identificar extractos, fracciones y/o compuestos, sugiriendo un posible mecanismo de acción de los mismos aislados a partir de plantas (Rajasekaran *et al.*, 2013; Chattopadhyay *et al.*, 2009;).

Por otro lado, existen diversos métodos enzimáticos que permiten evaluar la inhibición de la actividad de la NA de extractos, fracciones y compuestos que son objeto de estudio en el campo de nuevos antivirales, estos métodos utilizan moléculas que mimetizan el sustrato de la neuraminidasa del virus en el huésped: el ácido siálico (Nayak & Reichl, 2004). Algunos están basados en ensayos colorimétricos (ácido tiobarbitúrico (TBA)), fluorométricos (NA-Fluor™, Amplex® Red), quimioluminiscientes (NA-XDT™ y NA-Star™), entre los cuales los más utilizados y recomendados son los ensayos fluorescentes y quimioluminiscentes (Leang & Hurt, 2017; Gamaleldin *et al.*, 2016).

Las células MDCK se han convertido en una de las más utilizadas para el aislamiento y estudio del virus de influenza, ya que son células altamente manipulables y resistente a los efectos tóxicos de la suplementación por tripsina; además poseen receptores de ácido siálico de enlaces  $\alpha$ -2.3 y  $\alpha$ -2.6 permitiendo el crecimiento de un mayor número de cepas del virus de influenza y con una elevada tasa de replicación (Dukes *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 1997). Dichas células son infectadas con el virus, pero para ello, se requiere previamente evaluar la citotoxicidad de los compuestos sobre estas.

Posteriormente se puede evaluar, en un ensayo de uno o múltiples ciclos de replicación del virus, la proporción de células viables en términos de concentraciones letales (Sidwell & Smees, 2000). En un ensayo de un solo ciclo, se ha estimado que la duración del ciclo de replicación del virus desde su entrada hasta liberación de la célula, es de 8 a 10 horas aproximadamente en células MDCK (Gaush & Smith 1968), las células son infectadas a una alta multiplicidad de infección (MOI), mientras que en un ensayo de múltiples ciclos (72 horas) una MOI baja permitirá que los viriones recién generados puedan infectar a las células vecinas durante varios ciclos (Beyleveld *et al.*, 2013).

Por lo tanto, para evaluar la actividad antiviral de los extractos, fracciones y/o compuestos obtenidos a partir de plantas, una de las más utilizadas es el ensayo de reducción del efecto citopático (REC) de múltiples ciclos y de un solo ciclo y finalmente llevar a cabo la determinación del título viral en función de ensayos de hemaglutinación y TCID<sub>50</sub> (Tissue culture infection dose 50%).

---

En el presente capítulo se evaluó la actividad de inhibición de la hemaglutinina (IHA) y de la neuraminidasa (INA) de fracciones semipuras y compuestos identificados en fracciones activas como parte de los resultados del capítulo II para finalmente confirmar mediante ensayos de citotoxicidad y ensayos antivirales si dichas fracciones y compuestos tienen actividad contra el virus de influenza.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron dimetil sulfóxido (DMSO) estéril marca Sigma-Aldrich®, medio mínimo esencial eagle modificado Dulbecco (DMEM), solución salina de fosfatos (PBS pH 7.2), bicarbonato de sodio al 7.5% y antibióticos 10000 u/mL penicilina- 10000 µg/mL estreptomicina de marca InVitro; L-glutamina 200 µM, suero fetal bovino y 0.05% tripsina-EDTA de la marca GIBCO™; cajas de cultivo de forma rectangular 75 cm<sup>2</sup> (NEST®), placas de 96 pozos de fondo plano de marca Corning® para ensayos de citotoxicidad de los extractos, placas de 96, 24, 12 y 6 pozos de fondo plano marca NEST®, cámara de Neubauer (Hausser scientific), un microscopio invertido (Nikon eclipse, TE2000-U) y el equipo de lector de Elisa (Victor 3x, Perkin Elmer modelo 2030).

### 4.2.1. Virus y células.

Para los estudios de citotoxicidad y antivirales, se utilizaron células de riñón canino Madin Darby (MDCK-L y MDCK) que se mantuvieron en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, 1% de L-Glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. En cuanto a los virus, se trabajó con cepas proporcionadas por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) identificadas como A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, propagadas en células MDCK con 1 µg/ml de TPCK-tripsina (SIGMA) y almacenado a -70 °C hasta su uso.

### 4.2.2 Bioensayos

#### 4.2.2.1 Prueba de citotoxicidad

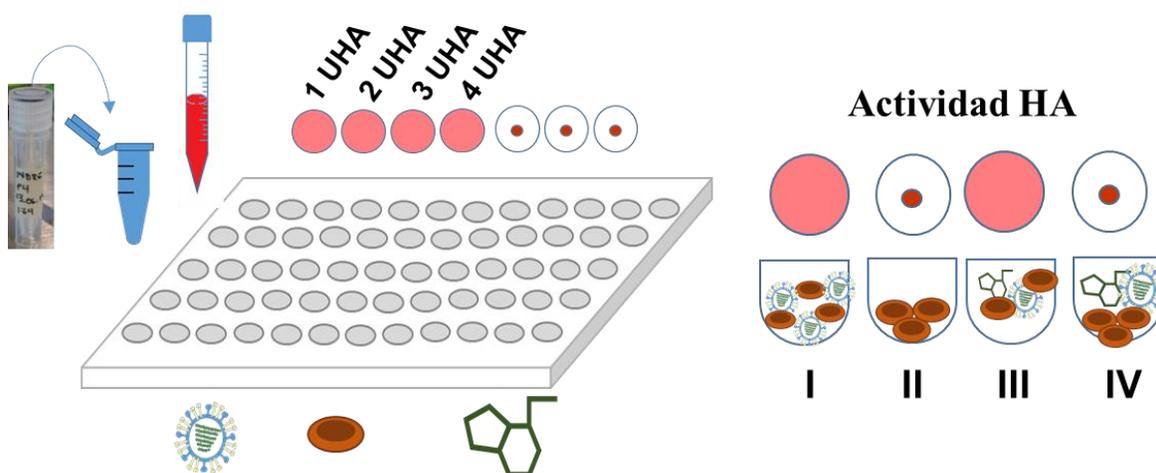
Se evaluaron extractos de baja, media y alta polaridad de hojas, frutos, raíces y tallos de *Diospyros anisandra* de la colecta realizada en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán (capítulo II). Así como compuestos puros identificados en fracciones de fruto y raíz obtenidas

durante los procesos de semipurificación (uvaol, betulina, escopoletina y ácido betulínico todos marca sigma-aldrich), y las subfracciones de fruto (3F23) y raíz (4R34). Se sembraron células MDCK-L en placas de 96 pozos al 40 % de su capacidad ( $3.84 \times 10^6$  células/ml) y se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (tiempo durante el cual la monocapa esta confluyente), después se realizaron dos lavados con PBS y se agregó a cada pozo 100 µL de diluciones de los extractos (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg), los cuales se efectuaron por cuadruplicado; así mismo para cada placa se incluyó dos testigo uno de células que tenía medio DMEM y otro con DMSO al 1 % (Figura C3.1A de la sección Apéndice C). Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas, después del tiempo de incubación se realiza una tinción colocando 50 µL en cada pozo de cristal violeta al 0.4 % en una mezcla metanol-agua durante un periodo de contacto aproximado de 30 a 45 minutos y se midió la absorbancia a 490 nm.

Se determinó la viabilidad celular [%Viabilidad=  $(DO_{\text{Células tratadas}}/DO_{\text{Control celular}}) \times 100$ ; a través de una regresión no lineal de la concentración del compuesto (µM) vs el porcentaje de viabilidad y se determinó la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>).

#### 4.2.2.2 Ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA)

En placas de 96 pozos de fondo U se adicionan diluciones seriadas de los compuestos con actividad antiviral, se mezclan con 4 unidades de HA del virus y se incuban por una hora a 4°C, después se adicionan 50 µL de una solución que contiene 1% de glóbulos rojos de pavo (RBC por sus siglas en ingles) y se incuban por 1 hora a 4°C como se observa en la figura 4.1; los controles incluyen virus + RBC como control negativo, compuesto antiviral + RBC, y RBC como control positivo de la hemaglutinación.



---

**Figura 4.1** Interpretación visual del ensayo de hemaglutinación.

I) virus+RBC II) RBC, III) virus+RBC+compuesto sin inhibición de la actividad de la hemaglutinina, y IV) virus+RBC+compuesto con inhibición de HA.

#### 4.2.2.3 Ensayo de inhibición de la actividad neuraminidasa (INA)

##### 4.2.2.3.1 Ensayo quimioluminiscente

Utilizando el protocolo de manufactura Applied Biosystem del kit NA-Star, en una placa blanca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 25  $\mu$ L de la solución de extractos/fracciones/compuestos a evaluar (a las concentraciones respectivas en molaridad para los compuestos puros y  $\mu$ g/ml para fracciones), posteriormente se adicionan 25  $\mu$ L de solución del virus utilizando la enzima viral de la cepa A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm (previamente titulado), dicha placa se mantuvo en agitación a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron en cada pozo 10  $\mu$ L del sustrato que se suspende previamente en el amortiguador del kit (1:1000), la microplaca se mantiene a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 30 minutos. Posteriormente se le adicionan 60  $\mu$ L en cada pozo de la solución aceleradora (incluida en el kit) e inmediatamente se le da lectura en el lector de microplacas VICTOR X (Perkin Elmer modelo 2030) de acuerdo al protocolo para luminiscencia (CPS 0.1s).

##### 4.2.2.3.2 Ensayo por métodos fluorescentes utilizando como sal de sodio hidratada del ácido 2'-(4-Metilumbiferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminico (4-MUNANA).

Utilizando la cepa A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm (ver metodología capítulo III).

Utilizando la sialidasa comercial obtenida a partir de *C. prefringes*, se preparó un amortiguador de acetato de sodio a una concentración de 50 nM y se ajustó a un pH de 5 con una solución 1 M de HCl. Posteriormente se preparó una solución Stock de enzima (0.2 U/mL) y de 4-MUNANA (1.5 mM), a partir de estas soluciones se hicieron las diluciones respectivas para establecer las concentraciones a trabajar (ver protocolo C1 en la sección Apéndice C). Se utilizaron placas de 96 pozos, y la lectura de la fluorescencia se llevó a cabo en un lector de microplacas CYTATION 3com (Biotek) a longitudes de emisión/excitación de 365/450 nm. Los volúmenes utilizados en los pozos correspondientes del amortiguador, inhibidor (compuestos y/o fracción a evaluar), la enzima y el sustrato, fueron 110  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ L y 20  $\mu$ L respectivamente.

Para ambas metodologías, la actividad neuraminidasa relativa se calcula como:

$$AE_R = \frac{AE_{vc}}{AE_v} \times 100$$

Donde  $AE_R$  es el porcentaje de actividad relativa de NA,  $AE_{vc}$  es la actividad del virus en presencia de los compuestos y  $AE_v$  es la actividad del virus sin compuesto (el control es la actividad de la enzima sin presencia de ningún inhibidor)

#### 4.2.2.3 Ensayo de reducción del efecto citopático (REC)

Se sembraron células MDCK a una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células/pozo, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de  $CO_2$ . Las células se infectaron con el virus a una MOI: 0.01 (1 hora de contacto). Posteriormente se retiró el sobrenadante y se adicionaron los compuestos a 4 concentraciones por debajo del  $CC_{50}$  (100, 50, 25 y 12.5  $\mu$ M para compuestos puros y  $\mu$ g/ml para subfracciones) en DMEM suplementado con tripsina TPCK (1  $\mu$ g/ml) y se mantuvieron a 37 °C con 5% de  $CO_2$  por 72 horas. Posteriormente se lavó la placa con PBS (2X) y se realizó una tinción colocando 50  $\mu$ L en cada pozo con cristal violeta al 0.4% en una mezcla metanol-agua durante un periodo de contacto aproximado de 30 a 45 minutos y se midió la absorbancia a 490 nm. Como control positivo se tienen células sin infectar y como control negativo se utilizan células infectadas (Figura C3.1B). La concentración de inhibición ( $IC_{50}$ ) se obtuvo por análisis de regresión de los datos.

#### 4.2.2.4 Ensayo de actividad antiviral en un ciclo de replicación

En cuanto al análisis de un solo ciclo (periodo de 10 horas), se utilizaron placas de 24 pozos donde se sembraron células MDCK a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pozo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de  $CO_2$  (Figura C3.2A). Una vez que la monocapa fue confluyente, los pozos se infectaron a una MOI de 1, y se incubaron por 1 hora (37 °C y 5% de  $CO_2$ ), posteriormente se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 200  $\mu$ L en cada pozo de una solución stock a una concentración por arriba de la concentración no citotóxica de uvaol (200  $\mu$ M) y la fracción 4R34 de *D. anisandra* (200  $\mu$ g/ml), en distintos periodos de incubación (0-2, 2-4, 4-6, y 6-8 horas de incubación) como se observa en la figura C3.2B (Apéndice C3). Como control negativo, solo se añadió DMEM después de la hora de infección viral. Una vez finalizadas las 10 horas, el sobrenadante de cada pozo fue recuperado y almacenado a -80 °C (Figura C3.2C) hasta la determinación del título viral mediante el ensayo de hemaglutinación y el ensayo  $TCDI_{50}$ .

---

#### 4.2.2.4.1 Determinación del título viral por ensayo de hemaglutinación

Se determinó el título viral de los sobrenadantes obtenidos de la cosecha de virus del ensayo de un solo ciclo. El procedimiento es el mismo descrito en la sección 5.2.2.2, brevemente se colocaron en los pozos respectivos 50  $\mu$ L de las diluciones seriadas de los sobrenadantes, para finalmente agregar 50  $\mu$ L de la solución de eritrocitos de pavo al 1% y mantener a 4 °C durante 30 a 40 minutos para obtener el título viral (Figura C3.3 del Apéndice C).

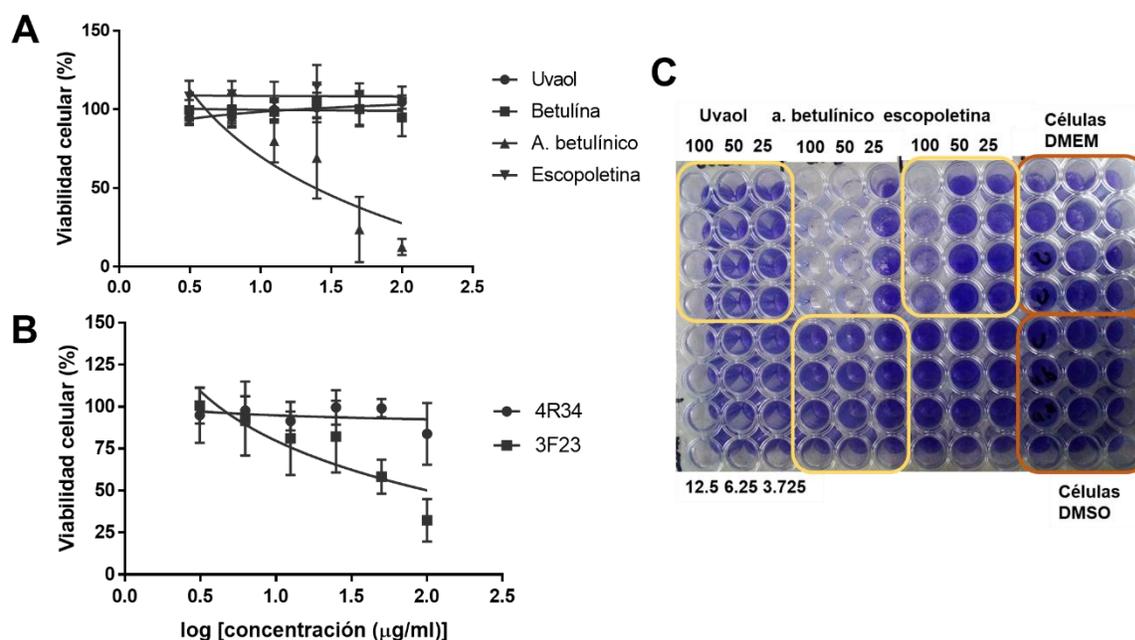
#### 4.2.2.4.2 Cuantificación de partículas virales mediante el método TCID<sub>50</sub>

Este ensayo consistió en sembrar microplacas de 96 pozos de fondo plano con células MDCK las cuales se incubaron por 24 horas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Una vez confluyente la monocapa, se colocaron 100  $\mu$ L de diluciones seriadas de las alícuotas almacenadas del sobrenadante recuperado del ensayo de un solo ciclo (ver la metodología en la sección C4 del Apéndice C). Se procedió a incubar a las condiciones establecidas (37 °C con 5% CO<sub>2</sub>) durante 72 horas. Se retiró el sobrenadante, se lavó cada placa 2 veces con PBS para finalmente realizar la tinción con cristal violeta al 0.4% con metanol-agua. Finalmente fue calculado el TCDI<sub>50</sub> utilizando la fórmula de Spearman-Karber (Sección C4 del apéndice C).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Evaluación del efecto citotóxico

Como resultado de los estudios biodirigidos llevados a cabo en el capítulo III de este trabajo, se evaluó el efecto citotóxico de 2 fracciones (3F23, 4R34) y 4 compuestos identificados en las fracciones activas (uvaol, ácido betulínico, betulina y escopoletina). Como se observa en la figura 4.2, la fracción 4R34 y los compuestos, uvaol, betulína y escopoletina, no mostraron ser citotóxicos, la viabilidad celular se mantuvo al 100% en todas las concentraciones analizadas (Figura 4.2 A y B). Por el contrario, la fracción 3F23 y el ácido betulínico, mostraron citotoxicidad con un CC<sub>50</sub> que se encuentran por debajo de los 70  $\mu$ g/mL y 50  $\mu$ M respectivamente (Tabla 4.1), en la figura 4.2 C se observa la ausencia de coloración violeta en los pozos que corresponden al ácido betulínico, prueba evidente de su efecto citotóxico a esas concentraciones.



**Figura 4.2** Ensayo de citotoxicidad

Se observa la viabilidad de células MDCK, expuestas a 6 concentraciones de compuestos puros (A), y subfracciones 3F23 y 4R34 (B), utilizando como control negativo células en medio DMEM y en DMSO al 1% en DMEM. Microplaca de 96 pozos teñida con una solución de cristal violeta al 0.4% en metanol-agua, donde los pozos ausentes de color, confirman la muerte celular por citotoxicidad (C).

#### 4.3.2 Evaluación de la actividad de inhibición de la hemaglutinina (IHA) e inhibición de la actividad sialidasa (INA) de compuestos y/o fracciones identificadas de *D. anisandra*

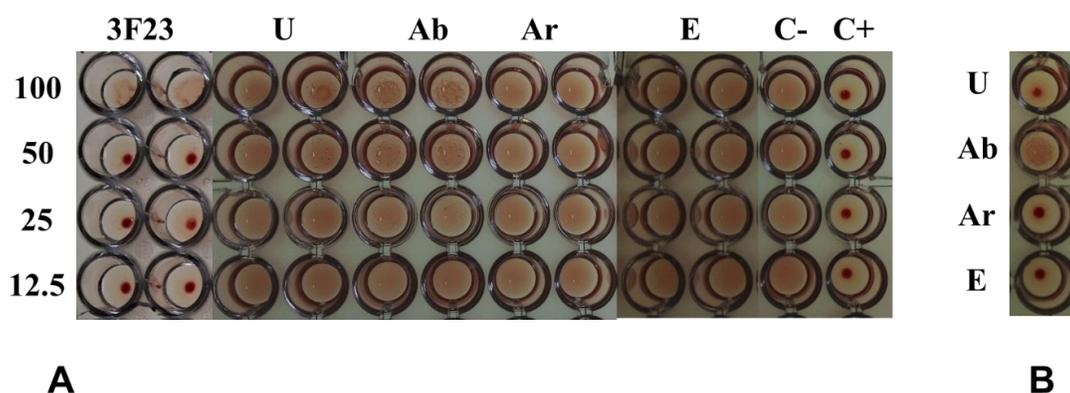
Se llevó a cabo un estudio biodirigido de extractos y fracciones obtenidas de *D. anisandra* (capítulo III). Con los compuestos identificados en las fracciones activas 3F23 y 4R34 se realizaron ensayos de inhibición de las dos proteínas más abundantes en la membrana de la superficie del virus, la HA y la NA.

##### 4.3.2.1 Inhibición de la hemaglutinación (IHA)

Los compuestos uvaol, ácido betulínico, betulina y escopoletina (aunque esta última no se comprobó por gases solo por CCD), las fracciones 3F23 y 4R34, fueron evaluadas. Únicamente la fracción 3F23 mostró actividad IHA en el rango de 50 a 12.5 µg/mL (figura 4.3), actividad que ya se había confirmado en la fracción F3 proveniente del extracto *n*-hexánico del fruto (Figura D1.A y D1.B Apéndice D); acorde con los ensayos de citotoxicidad, esta se encuentra por

debajo de los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que a dicha concentración no se observó la actividad IHA debido a una posible lisis celular de los eritrocitos causada por la citotoxicidad. Los compuestos por separado no mostraron ninguna actividad IHA. Adicionalmente se incluyó arbidol para observar si este compuesto, que se ha reportado con actividad a nivel HA (Nasser *et al.*, 2013; Cihan-Üstündağ *et al.*, 2020), mostraba algún efecto en el ensayo, pero no mostró actividad IHA en estos ensayos.

Por otro lado, el ácido betulínico (Ab), tuvo efecto sobre los eritrocitos que se observa en las dos concentraciones más altas de 100 y 50  $\mu\text{M}$ , posiblemente provocando un daño, ya que como se analizó en los ensayos de citotoxicidad, las concentraciones por arriba de 50  $\mu\text{M}$  ya es una concentración citotóxica (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Ensayo de Inhibición de la hemaglutinación.

Se evaluó la actividad de inhibición de la HA de la fracción 3F23 (100 a 12.4 mg/mL), el uvaol (U), el ácido betulínico (Ab), el arbidol (Ar) y la escopoletina (E) de 12.5 hasta 100 mM (**A**) y la evaluación de lisis de eritrocitos a 100 mM de los compuestos (**B**).

#### 4.3.2.2 Inhibición de la actividad sialidasa

Para determinar la actividad de los compuestos para inhibir la sialidasa del virus de influenza se utilizaron dos ensayos fluorescentes, el Amplex Red y utilizando como sustrato al 4-MUNANA (ver capítulo III). Los resultados de estos dos ensayos indicaron que la fracción 4R34 mostró actividad para inhibir la enzima. Por lo tanto, se realizó un ensayo adicional por quimioluminiscencia para determinar y corroborar si la fracción y los compuestos identificados en ella mostraban inhibición, como control se utilizó carboxilato de oseltamivir (CO) y se comparó con otras fracciones obtenidas a partir de la fracción R4 de los extractos de acetato de

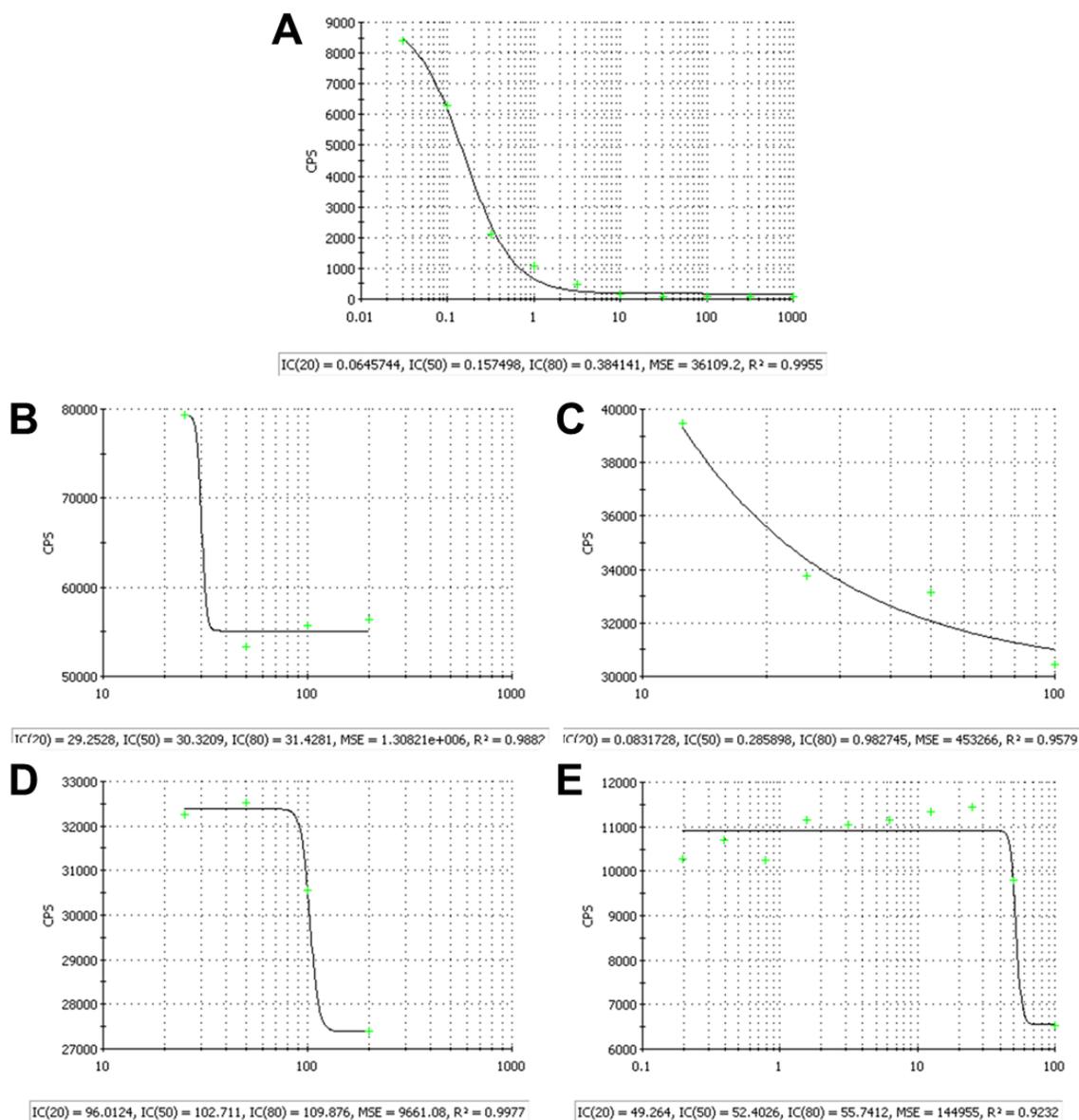
---

etilo de raíz (R4, 4R34, R9i) (Figura 4.4). El compuesto del oseltamivir claramente demostró tener una actividad INA y observamos en la figura 4.4 A que hay una relación dosis-respuesta, en cambio todas las subfracciones tienden a mostrar un efecto sobre la neuraminidasa viral a distintas concentraciones (Figura 4.4 B- 4.4 E) más sin embargo esta no es una relación dosis respuesta.

El análisis que proporcionó el equipo mediante el establecimiento del protocolo para el análisis de INA, se puede apreciar que las concentraciones para lograr inhibir la actividad de la NA en un 50% ( $IC_{50}$ ), están por arriba del CO (0.15 nM) mientras que, para la más baja de las fracciones evaluadas, que corresponde a R9i, fue de 0.2858  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4.4 C).

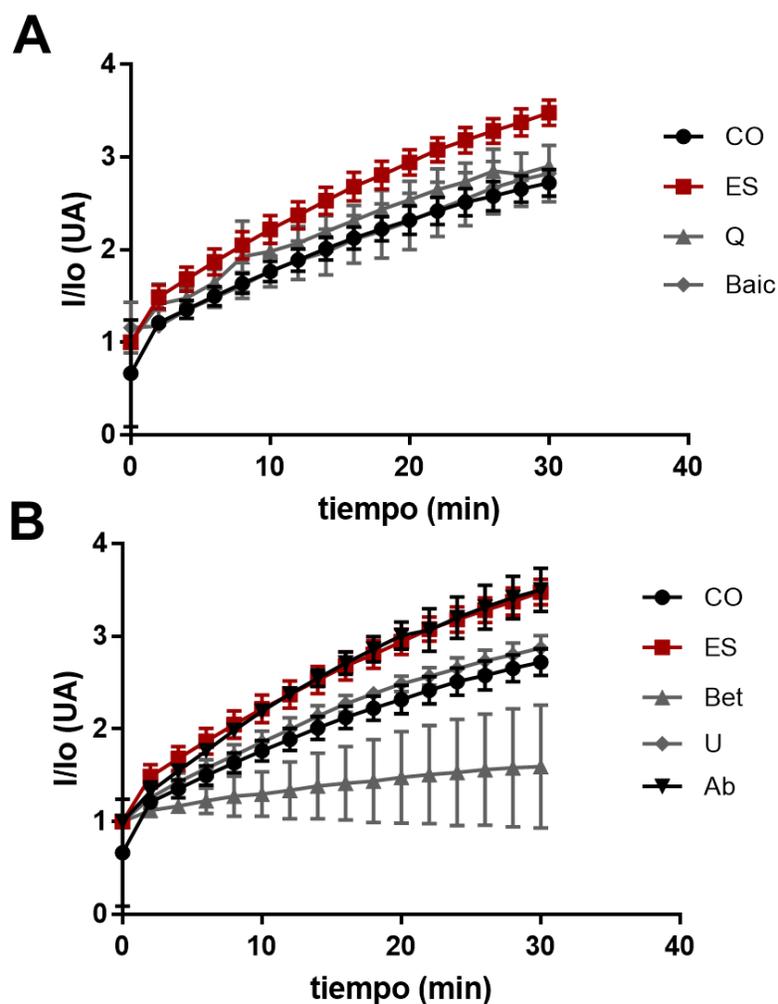
Por lo tanto, para confirmar que los resultados con el Amplex Red y el ensayo de MUNANA correspondían a un efecto de inhibición de la actividad sialidasa, se estableció un protocolo adaptado del ensayo fluorescente utilizando la enzima NA de *C. prefringes* (Ver apéndice C.1).

Utilizando las condiciones establecidas en el protocolo, se llevó a cabo la evaluación de los compuestos identificados en las subfracciones 3F23 y 4R34 y comparado con flavonoides con actividad INA, como la baicaleina y la quercetina (Sadati et al., 2019; Liu et al., 2015;). Como se observa en la figura 4.5 A y 4.5 B, la actividad de la enzima en presencia de los compuestos a concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  tanto en el caso de flavonoides como terpenos, se ve reducida, a excepción del ácido betulínico (Ab). En cuanto a la fracción 4R34 muestra un comportamiento similar al del CO (figura 4.6 A), al comparar todos los compuestos al término de los 30 minutos del ensayo, el ácido betulínico no mostró ningún efecto a la concentración utilizada sobre la actividad de la NA, en cambio la betulína si tuvo efecto en dicha actividad, logrando reducir hasta un 50% comparado con el CO, mientras que los demás compuestos evaluados redujeron la actividad en un 10% de manera similar al CO (figura 4.6 B). Cabe mencionar que el efecto del CO sobre la actividad NA es relativamente bajo respecto a los resultados de los ensayos realizados anteriormente, pero es debido a que la concentración utilizada fue de 50  $\mu\text{M}$ , una concentración muy baja comparado con los 100  $\mu\text{M}$  de las otras moléculas.



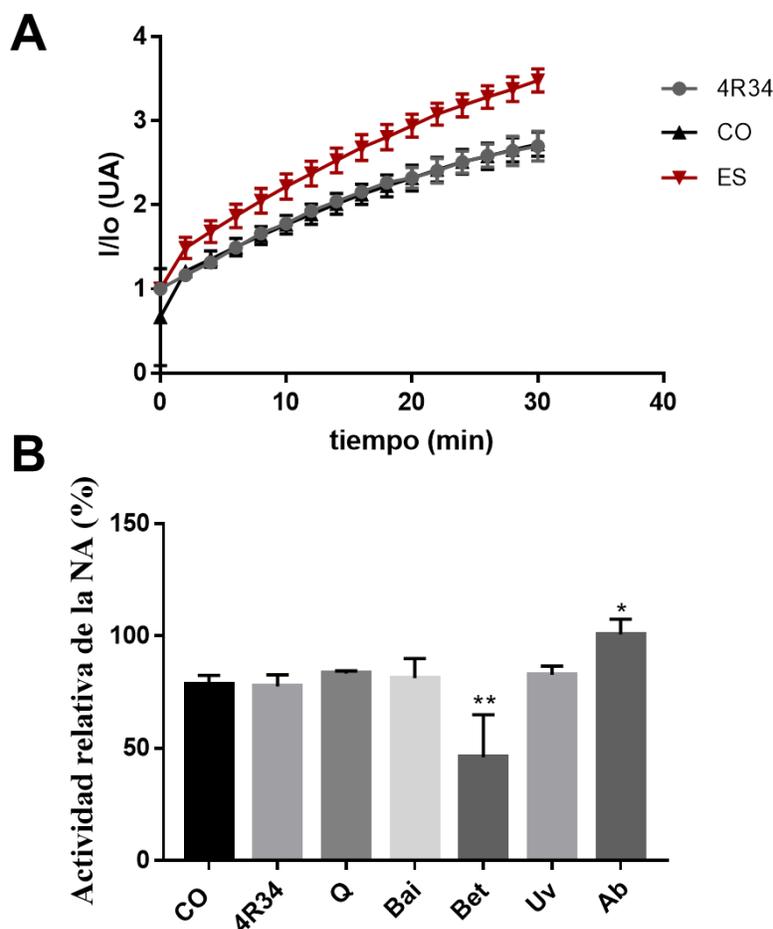
**Figura 4.4** Ensayo de inhibición de la actividad de la neuraminidasa utilizando una técnica quimioluminiscente.

Evaluación de la actividad neuraminidasa de oseltamivir (A) a partir de una solución stock de 50  $\mu\text{M}$ . Evaluación de la actividad neuraminidasa de R4 (B), R9i (C) y 4R34 (D) a concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5  $\mu\text{g/mL}$ ; y la evaluación de 4R34 a concentraciones 1:2 a partir de una solución Stock de 200  $\mu\text{g/mL}$  (E).



**Figura 4.5** Evaluación de la actividad relativa de la neuraminidasa en función de tiempo mediante un ensayo fluorescente.

Se evaluó la intensidad de la fluorescencia (I) de la actividad de la neuraminidasa respecto a la fluorescencia al tiempo inicial (I<sub>0</sub>) a través del tiempo de flavonoides [quercetina (Q), Baicaleína (Baic)] (A) y terpenos [Betulina (Bet), Uvaol (U)] (B) a concentraciones de 100  $\mu$ M utilizando carboxilato de oseltamivir (CO) como control de inhibición de la NA (50 nM) utilizando 0.2 U/mL de enzima y 0.5 mM de sustrato (ES).



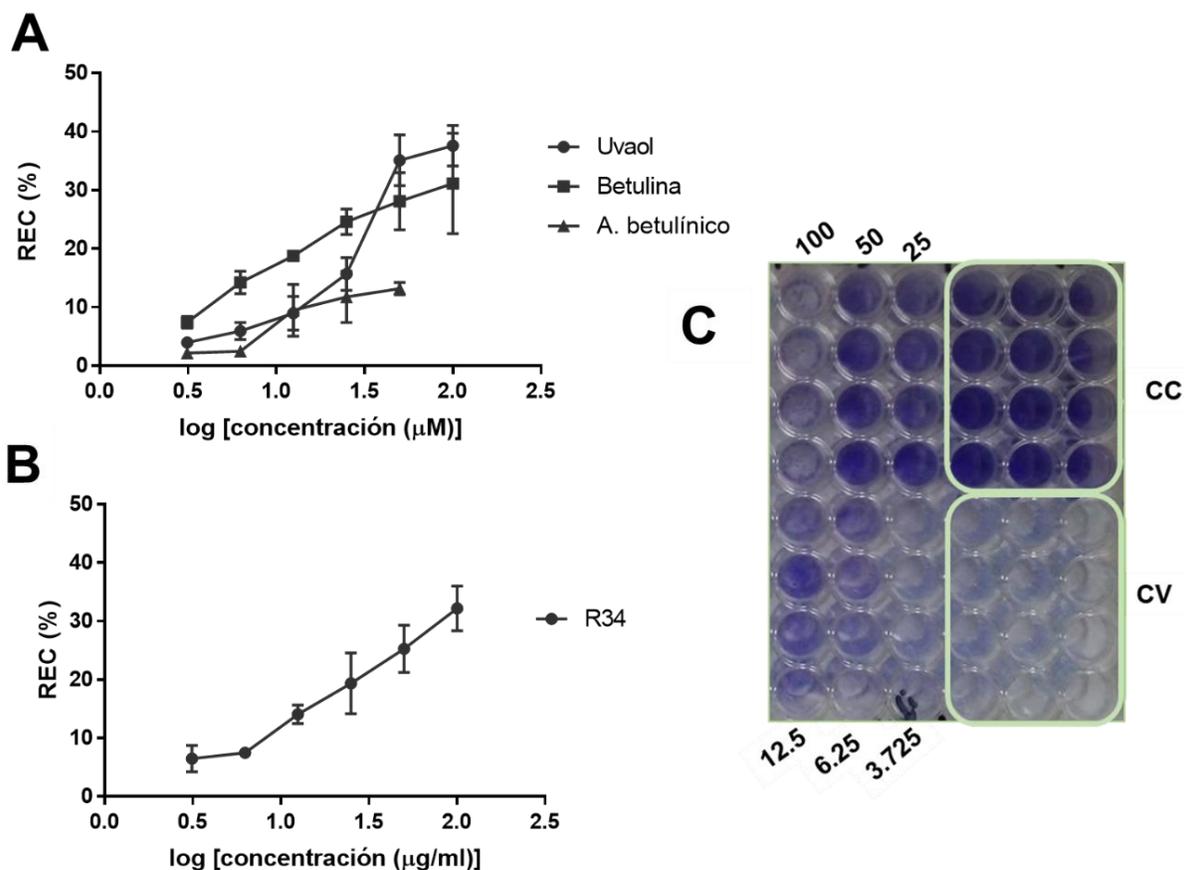
**Figura 4.6** Evaluación de la actividad relativa de la neuraminidasa

Se evaluó la intensidad de la fluorescencia ( $I$ ) de la neuraminidasa respecto a la fluorescencia al tiempo inicial ( $I_0$ ) a través del tiempo de la fracción 4R34 a 100  $\mu\text{g/mL}$  utilizando como control positivo carboxilato de oseltamivir (CO) control negativo de la INA el complejo enzima-sustrato (ES) (A), y la actividad relativa de la NA en presencia de compuestos y fracciones a los 30 minutos (B).

#### 4.3.3 Evaluación de la actividad antiviral

##### 4.3.3.1 Reducción del efecto citopático (REC)

Los resultados del ensayo de REC utilizando la cepa de virus influenza A/Yucatan/2370/2009 indican que las muestras evaluadas reducen el efecto citopático por debajo del 40% aún a las más altas concentraciones empleadas (Figura 4.6 A y 4.6 B). Estos resultados indican que se tendría que utilizar concentraciones mayores para lograr una reducción mayor o igual al 50%.



**Figura 4.7** Ensayo de reducción del efecto citopático (REC) de las células MDCK.

Se evaluaron compuestos a las concentraciones no citotóxica de uvaol, betulina y ácido betulínico (A), y 4R34 (B). Además, se muestra el comportamiento de manera visual de la fracción 4R34 respecto el control positivo (células en medio DMEM) y como control negativo células infectadas con la cepa A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm teñidas con una solución de cristal violeta al 0.4% en metanol (C).

Al realizar el análisis de regresión no lineal, se determinaron los valores de  $IC_{50}$  y se obtuvo el índice de selectividad (IS). En la tabla 4.1 observamos que los índices de selectividad para los compuestos y/o fracciones evaluadas no llega en ningún caso a la unidad, y por lo tanto, se requieren de valores de  $IC_{50}$  para que el IS este por encima de 1, valor que nos indica que tan efectivo es la molécula, por otro lado como se aprecia en la misma tabla, los datos de algunos de ellos no fueron determinados (ND), pues en el ensayo REC no mostraron ningún efecto sobre la cepa viral.

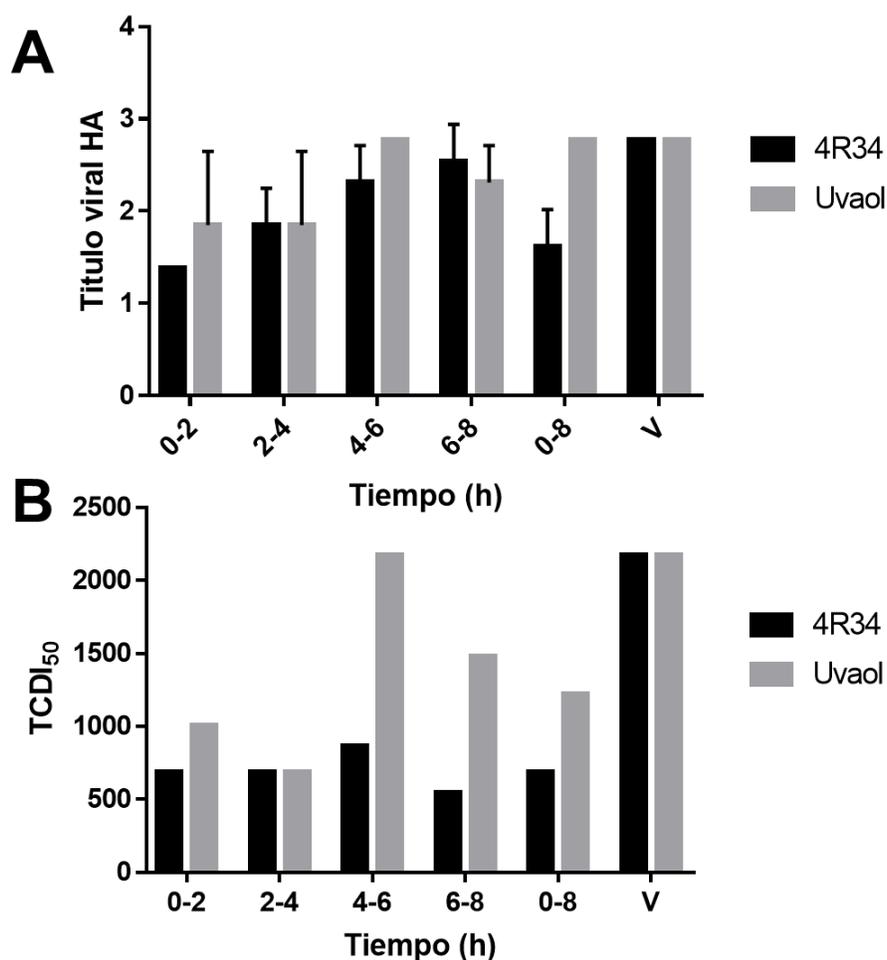
**Tabla 4.1 Índice de selectividad de compuestos identificados en fracciones de *Diospyros anisandra*.**

Compuesto/fracción	CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IS
Uvaol	286.10	344.98	0.82
betulina	1194.52	1273.88	0.93
A. betulínico	28.64	143005.48	0
Escopoletina	101.25	ND	ND
4R34	404.81	1203.13	0.33
3F23	70.86	ND	ND

#### 4.3.3.2 Análisis de la actividad antiviral en un ciclo de replicación

Para este ensayo, el uvaol y 4R34 fueron los dos candidatos a evaluar en función de los resultados obtenidos tanto en las pruebas de INA, citotoxicidad y REC. Los sobrenadantes recuperados al finalizar las 10 horas de incubación, fueron evaluados en el ensayo de hemaglutinación para la determinación del título viral, como resultado se observa en la figura 4.8 A, que la fracción 4R34 mostró una reducción en el título viral a nivel HA durante las primeras 2 horas (0-2 h) y después de 8 horas (0-8), mientras que el uvaol no tuvo una diferencia significativa en ninguno de los tiempos de contacto (inhibidor + medio).

En cuanto a la cuantificación de partículas virales por el método TCID<sub>50</sub>, hubo una reducción de las partículas virales en el periodo de 6 a 8 horas con la fracción 4R34, mientras que el uvaol a las primeras horas produjo una reducción de las partículas virales como se observa claramente en la Figura 4.8 B.



**Figura 4.8** Titulo viral obtenido a partir del ensayo de hemaglutinación (A) y cuantificación de partículas virales en función del ensayo TCID<sub>50</sub> (B).

#### 4.4 DISCUSIÓN

Los resultados de citotoxicidad de los distintos tipos de extractos, concuerdan con reportes previos, donde los extractos con mayor contenido de moléculas polares mostraron ser menos citotóxicos (200 µg/mL) que los extractos con moléculas menos polares (Mehrbood *et al.*, 2018). En el caso de *D. anisandra*, la plumbagina es un compuesto muy citotóxico que está presente en los extractos de baja polaridad (Messeha *et al.*, 2018; Kuete *et al.*, 2016). En este capítulo, se logró determinar que, de las fracciones y compuestos identificados a partir de los extractos *n*-hexánicos del fruto y de AcOEt de la raíz, el ácido betulínico y la fracción 3F23 mostraron

actividad citotóxica. La fracción 3F23 (proviene de extractos *n*-hexánicos de fruto, por lo que es de interés indagar sobre que compuesto pudiera estar teniendo dicho efecto negativo en las células. Por otro lado la citotoxicidad del ácido betulínico ya ha sido reportada (Sousa *et al.*, 2017), incluso se ha estudiado potencializar su citotoxicidad modificando su estructura mediante amidaciones a su estructura química (Hoenke *et al.*, 2020).

En cuanto a los ensayos a nivel HA y NA, hasta ahora se ha identificado que los compuestos presentes en las fracciones y subfracciones de extractos *n*-hexánicos de fruto tienen un efecto sobre la hemaglutinina viral de manera sinérgica, ya que de manera individual no presentaron dicha actividad (Juárez-Méndez *et al.*, 2021). En el caso de la fracción 3F23 obtenida de la fracción F3 del fruto, siguió mostrando actividad IHA.

Los ensayo de quimioluminiscencia se han utilizado para el cribado de compuestos con actividad anti-influenza (Kyme *et al.*, 2019; Beyleveld *et al.*, 2013). Se ha reportado el uso de este ensayo para evaluar el potencial de las flavonas como inhibidores de la neuraminidasa de los neumococos (Walther *et al.*, 2015), y del ácido pterodóntico aislado a partir de *Laggera pterodonta* contra la neuraminidasa del virus de la influenza (Guan *et al.*, 2017). En el caso de las fracciones obtenidas a partir de los extractos de AcOEt de raíz (R9i, 4R34 y R4), mostraron inhibir la actividad de la sialidasa viral, confirmando los resultados obtenidos en el capítulo III con las dos técnicas fluorescentes.

Al llevar la fracción 4R34 y moléculas del tipo terpeno identificadas en dichas fracciones como el uvaol y la betulina en el ensayo INA utilizando una sialidasa bacteriana (NA de *Clostridium perfringens*), se confirmó una vez más la disminución de la actividad de la sialidasa por la fracción 4R34, así como la betulina. A pesar de que los resultados no reflejaron un comportamiento dosis-respuesta, los resultados obtenidos son prometedores, ya que tanto los extractos como los compuestos, además del estudio contra virus, pueden ser evaluados contra microorganismos que utilicen este tipo de enzimas para su sobrevivencia y causantes de enfermedades como *S. pneumoniae* (Lipničánová *et al.*, 2020; Wren *et al.*, 2017).

En el ensayo REC, la betulina y el uvaol, mostraron actividad antiviral a altas concentraciones. En un trabajo realizado en el 2018 por Kazakova y colaboradores, realizaron un estudio sobre la actividad de derivados de esta contra el virus de la influenza (A H7N1), herpes simple (HSV-1), ECHO 6 y HIV-1, donde los compuestos acilados de la betulina y el ácido betulínico no mostraron inhibición sobresaliente respecto a otros compuestos como el ácido betulínico

(Kazakova *et al.*, 2018), pero esto da pie a realizar modificaciones químicas para potencializar dicha actividad (Xiao *et al.*, 2016) y aprovechar otras actividades biológicas que de ellas se han reportado como el uvaol, que ha demostrado atenuar procesos de inflamación relacionados con alergias, secreción de la mucosa y colapso alveolar; así como ser antiproliferativo (Du *et al.*, 2020; Agra *et al.*, 2016; Sánchez-Quesada *et al.*, 2013). Por otro lado, existen reportes de la actividad antiviral del ácido betulínico contra influenza A/PR/8 en células A549 a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Hong *et al.*, 2015), pero en este trabajo con células MDCK y la cepa de A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm fue deficiente.

Lo interesante de este trabajo, es que en el ensayo de un solo ciclo, el 4R34 y el uvaol parecen reducir las partículas virales a las primeras horas de infección del virus, y además la fracción 4R34 también lo hace después de seis horas, lo que sugiere que al contener una mezcla de compuestos, pueda tratarse de un efecto sinérgico de las moléculas presentes (Serkedjieva *et al.*, 2010). Estudios han demostrado que la mezcla de compuestos tiene un efecto mayor sobre virus como es el caso del virus causante de la reciente pandemia SARS-CoV-2 y que también se ha demostrado el mismo efecto contra el virus de la influenza (Colunga *et al.*, 2020; Ianevski *et al.*, 2020). Por lo que no se descarta la idea de seguir ahondando en la actividad biológica de los compuestos presentes en la fracción 4R34.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 DISCUSIÓN

Los virus siempre han influido en la vida e historia de la humanidad, actualmente la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2, es prueba evidente de como las enfermedades virales son una amenaza para la salud humana (Piret & Boivin 2021). Para el periodo 2019-2020 (antes de la aparición del virus causante de la COVID-19), los casos presentes en México por influenza estaban alrededor de siete mil, actualmente en lo que va de la temporada de influenza estacional 2021-2022, se han confirmado 2417 casos positivos a influenza del subtipo AH3N2 (DGE, 2022). Estas últimas cifras revelan una disminución en los casos, pero los especialistas en el área no bajan la guardia.

Teniendo en cuenta la evolución constante de los virus de la influenza, los escasos tratamientos antivirales, la resistencia que han mostrado ante fármacos aprobados, diseño y aplicación de vacunas, son razones fundamentales para la toma de decisiones y estrategias de prevención y control (Ayora-Talavera *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2020). Por lo anterior, en la actualidad se buscan alternativas en distintas fuentes naturales y sintéticas de compuestos con actividad antiviral. Las plantas son un recurso renovable por excelencia para la obtención de metabolitos con actividad biológica (Khan *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019)

*Diospyros anisandra* es una especie vegetal cuasi endémica de la península biótica de la provincia de Yucatán. Dicha planta posee propiedades antimicrobianas, antihelmínticas y antivirales (Cetina-Montejo *et al.*, 2019; Flota-Burgos *et al.*, 2017; Borges-Argaez *et al.*, 2007) y se ha reportado los usos medicinales en hoja para el tratamiento de erupciones en la piel (Ankli *et al.*, 2002). Es abundante en compuestos quinónicos y terpenoides (Juárez-Méndez *et al.*, 2021; Uc-Cachón *et al.*, 2014; Quintal-Novelo *et al.*, 2013), entre los que destaca el epóxido de zeylanona, quinona que fue aislada e identificada por primera vez en este género y que ha mostrado poseer actividades antivirales contra cepas del virus de influenza del tipo A y B (Cetina-Montejo *et al.*, 2019).

Los estudios de este grupo de trabajo han explorado ampliamente los compuestos en corteza entre los que se han identificado siete quinonas (plumbagina, maritinona, 3,3'-biplumbagina,

---

chitranona, *cis*-isoshinanolona, eliptonona y droserona), cuatro triterpenos (lupeol, aldehído de betulína, betulina y ácido betulínico ) y tres sesquiterpenos (1 $\beta$ -hidroxi 4(15),5 E,10(14)-germacatrieno, teucdiol A y selin-4(15)-en-1  $\beta$ ,11-diol (Uc-Cachón *et al.*, 2013). Recientemente, se logró la identificación y aislamiento de taraxerol y taraxerona en hojas y raíz (Jimenez-Alcala, tesis en curso)

En el presente trabajo, los estudios realizados en los extractos *n*-hexánicos de fruto, hoja y raíz, confirmaron que esta especie es rica en quinonas, especialmente en plumbagina distribuida en toda la planta (raíz, hoja, tallo, fruto). Se encontró que las fracciones *n*-hexánicas de fruto y fracciones obtenidas a partir de extractos de AcOEt de raíz, contienen lupeol y uvaol, este último triterpeno no ha sido reportado en este género. En el caso del análisis mediante HPLC de extractos de mediana polaridad nos permitió tener una idea de la complejidad de compuestos presentes en dichos extractos y/o fracciones, donde el pico más abundante se localizó a un TR aproximadamente a los 29 minutos. A pesar de que mediante CG-EM no se pudo confirmar la presencia de cumarinas en el extracto de AcOEt de raíz, el análisis por CCD mostró la presencia de escopoletina, dicha molécula ya se ha confirmado en raíces de *D. filipéndula*, y en tallo de *D. ehretioides*. (Wosawat *et al.*, 2020), lo que permite concluir que esta especie posee cumarinas las cuales destacan por la gama de actividades biológicas y la versatilidad que poseen para ser modificadas químicamente incrementando dichas propiedades (Annunziata *et al.*, 2020).

En los ensayos de IHA, la fracción 3F23 mostró poseer dicha actividad mientras que los compuestos identificados en dicha fracción de manera individual, no la mostraron, lo cual es un indicio que los compuestos presentes en 3F23 actúan de manera sinérgica (Ji *et al.*, 2020). En cuanto a la fracción 4R34 inhibió la actividad de la sialidasa viral y la bacteriana empleando métodos fluorométricos, así como el uvaol y la betulina, aunque dicha actividad fue escasa comparada con otras moléculas reportadas en la literatura (Xiao *et al.*, 2018), todos, de interés para futuros análisis con la especie *D. anisandra*, ya que los estudios biodirigidos de las fracciones obtenidas a partir de plantas, permiten tener una batería de moléculas que actúen a nivel HA y NA para potencializar el efecto de los antivirales contra los virus de influenza (Shyr *et al.*, 2021; Melville *et al.*, 2018; Mercorelli *et al.*, 2018), y en el caso de la actividad sialidasa brinda la oportunidad de atacar una variedad de enfermedades que son causadas por virus y/o microorganismos capaces de aprovechar dicha enzima para su proliferación (Wang, 2020).

---

Finalmente, al evaluar las fracciones contra la cepa viral A/Yucatan/2370/09 (H1N1) pdm, en el ensayo REC, tanto como la fracción 4R34 como el uvaol y la betulina mostraron IS mayores respecto a la fracción 3F23, escopoletina y ácido betulínico; mientras que, en el ensayo de un solo ciclo, 4R34 resultó reducir los títulos virales en las primeras y últimas horas de infección de la cepa viral. Hasta ahora en la literatura solo se ha reportado que la betulina y el ácido betulínico han mostrado actividad antiviral contra cepas virales de influenza (Al-Salihi & Alberti, 2021), pero es la primera vez que se evalúa contra una cepa del subtipo H1N1.

De manera general, la presencia de quinonas y terpenos en plantas, tienen funciones que aún se desconocen, en el caso de las quinonas se ha descrito el papel que juega en la inducción de estructuras especializadas para la alimentación de las plantas conocidas como haustorias en plantas que parasitan raíces, en moléculas de señalización y participación en procesos de fotosíntesis (Pichersky & Raguso 2018). En cambio, las actividades biológicas externas a la planta, poseen un espectro amplio que va desde antimicrobianos, anti proliferativos, anticancerígenos y antivirales (Hordyjewska *et al.*, 2019; Wink, 2015). Mencionado lo anterior el estudio de extractos y compuestos puros a partir de *D. anisandra* y plantas son fuentes primordiales para la generación de antivirales y tratamiento para las infecciones virales actuales y futuras (Mohan *et al.*, 2020).

## 5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- Los compuestos identificados en corteza, por el grupo de investigación de la Dra Rocio (Uc-Cachón *et al.*, 2013) también fueron localizados en hoja, fruto, tallo y raíz de *D. anisandra*, siendo la plumbagina el compuesto más abundante en todas las partes de la planta, por lo que *D. anisandra* es una fuente rica en compuestos del tipo quinona. Esta es la primera vez que se exploran los metabolitos presentes en fruto y raíz de dicha especie, tanto en extractos *n*-hexánicos como de AcOEt.
- Se confirmó la presencia de terpenos del tipo lupano y ursano, siendo el uvaol reportado por primera vez en el fruto de esta especie. Mientras que la presencia de compuestos fluorescentes como la escopoletina que fue confirmada por CCD ya se ha reportado en *D. filipéndula*, y en tallo de *D. ehretioides*.
- Las fracciones obtenidas a partir de la fracción 3F3 exhibieron inhibición de la actividad HA, mientras que los compuestos identificados en dichas fracciones evaluados de

---

manera individual no mostraron dicha actividad, lo que sugiere un efecto sinérgico de los compuestos presentes en las fracciones.

- Por otro lado, la fracción 4R34, obtenida a partir de fracciones de los extractos de AcOEt, mostró inhibición de la actividad NA en todos los ensayos utilizados, pero la presencia de compuestos fluorescentes en dicha fracción, indica que estos pudieron interferir en los resultados.
- Finalmente, el estudio biodirigido mediante los ensayos de inhibición de la HA y la actividad de la NA, nos permitió evaluar los compuestos presentes en las fracciones activas 3F23 y 4R34, los resultados mostraron que el uvaol y la fracción 4R34 mostraron actividad antiviral contra una cepa H1N1, por lo que *D. anisandra* es una fuente de metabolitos con posible actividad antiviral.

### 5.3 PERSPECTIVAS

Debido a que *D. anisandra* es una fuente de metabolitos del tipo quinona, terpenoide y con propiedades fluorescentes, se requiere caracterizar la presencia de estos y su función en el metabolismo de la planta para comprender las condiciones óptimas para su propagación *in vitro* y el estudio de genes que codifiquen para la biosíntesis de estas moléculas.

Las fracciones obtenidas a partir de la fracción F3 (3F23) y de la fracción R4 (4R34) mostraron inhibición de la HA y la actividad NA. Esto resulta interesante ya que en *D. anisandra* no se han estudiado compuestos de mediana polaridad, además la presencia de compuestos fluorescentes en las fracciones de AcOEt, permite abrir un campo de estudio en los mecanismos de acción a nivel enzimático y con aplicaciones como marcadores moleculares que requieran el uso de nuevas moléculas con propiedades fluorescentes.

En el caso de la actividad antiviral de las moléculas estudiadas contra el virus de influenza a nivel de las dos proteínas superficiales HA y NA, nos permite concluir que esta especie sugiere que estas moléculas puedan ser evaluadas a futuro en otras dianas, como la proteína Spike del SARS-CoV-2, el virus del dengue, zika entre otros para poder conocer el potencial de estos metabolitos. Por lo que la especie *D. anisandra* continúa siendo una fuente de metabolitos con actividades farmacológicas interesantes.

---

**REFERENCIAS**

- Adeuyi, A., Rotimi, A. O. (2014). Fatty Acid Composition and Lipid Profile of *Diospyros mespiliformis*, *Albizia Lebbeck*, and *Caesalpinia Pulcherrima* Seed Oils from Nigeria. *International Journal of Food Science*, 283614.
- Agra, L. C., Lins, M. P., da Silva Marques, P., Smaniotto, S., Bandeira de Melo, C., Lagente, V., Barreto, E. (2016). Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *European journal of pharmacology*, 780, 232–242.
- Akak, C. M., Céline M. D., Augustin E. N., Peng F. T., Lian D. L. 2010. “New Coumarin Glycosides from the Leaves of *Diospyros crassiflora* (Hiern).” *Fitoterapia* 81 (7): 873–77.
- Al-Salihi, S., & Alberti, F. (2021). Naturally Occurring Terpenes: A Promising Class of Organic Molecules to Address Influenza Pandemics. *Natural products and bioprospecting*, 11(4), 405–419.
- Ali, S. I., Sheikh, W. M., Rather, M. A., Venkatesalu, V., Muzamil Bashir, S., Nabi, S. U. (2021). Medicinal plants: Treasure for antiviral drug discovery. *Phytotherapy research : PTR*, 35(7), 3447–3483.
- Amorij, J. P., Meulenaar, J., Hinrichs, W. L., Stegmann, T., Huckriede, A., Coenen, F., Frijlink, H. W. (2007). Rational design of an influenza subunit vaccine powder with sugar glass technology: preventing conformational changes of haemagglutinin during freezing and freeze-drying. *Vaccine*, 25(35), 6447–6457.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of ethnopharmacology*, 79(1), 43–52.
- Annunziata, F., Pinna, C., Dallavalle, S., Tamborini, L., Pinto, A. (2020). An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4618.
- Aronsson, P., Munissi, J., Gruhonjic, A., Fitzpatrick, P. A., Landberg, G., Nyandoro, S. S., Erdelyi, M. (2016). Phytoconstituents with Radical Scavenging and Cytotoxic Activities from *Diospyros shimbaensis*. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 4(1), 3.

- 
- Ayora-Talavera, G., Flores, G. M., Gómez-Carballo, J., González-Losa, R., Conde-Ferraez, L., Puerto-Solís, M., López-Martínez, I., Díaz-Quiñonez, A., Barrera-Badillo, G., Acuna-Soto, R., Livinski, A. A., Alonso, W. J. (2017). Influenza seasonality goes south in the Yucatan Peninsula: The case for a different influenza vaccine calendar in this Mexican region. *Vaccine*, 35(36), 4738–4744.
- Ayora-Talavera, G. (1999). Influenza : Historia de Una Enfermedad. *Revista Biomedica*, 10 (1): 57–61.
- Bagla, V. P., Lubisi, V. Z., Ndiitwani, T., Mokgotho, M. P., Mampuru, L., Mbazima, V. (2016). Antibacterial and Antimetastatic Potential of Diospyros lycioides Extract on Cervical Cancer Cells and Associated Pathogens. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2016, 5342082.
- Benton, D. J., Wharton, S. A., Martin, S. R., McCauley, J. W. (2017). Role of Neuraminidase in Influenza A(H7N9) Virus Receptor Binding. *Journal of virology*, 91(11), e02293-16.
- Berlanda Scorza F. (2017). Advancing new vaccines against pandemic influenza in low-resource countries. *Vaccine*, 35(40), 5397–5402.
- Beylveld, G., White, K. M., Ayllon, J., Shaw, M. L. (2013). New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targeting viral and host functions. *Antiviral research*, 100(1), 120–132.
- Borges-Argáez, R., Canche-Chay, C. I., Peña-Rodríguez, L. M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G. M. (2007). Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*, 78(5), 370–372.
- Buchanan, B. B., Grisse, W., Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Cann, A. J. (2005). *Principles of molecular virology* (4th edition). Academic press.
- Cao, R., Zhang, H., Guo, J., Liu, X. H., Liu, C., Zhu, C. H., Wu, X. Z. (2015). A Novel Pharmacological Method to Study the Chinese Medicinal Formula Hua-Zheng-Hui-Sheng-Dan. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 436807.
- Cao, Y. Y., Yu, J., Liu, T. T., Yang, K. X., Yang, L. Y., Chen, Q., Shi, F., Hao, J. J., Cai, Y.,

- 
- Wang, M. R., Lu, W. H., Zhang, Y. (2018). Plumbagin inhibits the proliferation and survival of esophageal cancer cells by blocking STAT3-PLK1-AKT signaling. *Cell death & disease*, 9(2), 17.
- Carnevali, G., Tapia-Muñoz, J. L., de Stefano, R. D., & Morillo, I. R. (2010). Flora ilustrada de la Península de Yucatán: Listado florístico. Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC Yucatán, México.
- Carter, J., Saunders, V., Saunders, V. A. (2007). *Virology: principles and applications*. John Wiley & Sons.
- Cesari, I., Queiroz, E. F., Favre-Godal, Q., Marcourt, L., Caccialanza, G., Moundipa, P. F., Brusotti, G., Wolfender, J. L. (2013). Extensive phytochemical investigation of the polar constituents of *Diospyros bipindensis* Gürke traditionally used by Baka pygmies. *Phytochemistry*, 96, 279–287.
- Cetina-Montejo, 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.
- Chattopadhyay, D., Sarkar, M. C., Chatterjee, T., Sharma Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S., Khan, M. T. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New biotechnology*, 25(5), 347–368.
- Cihan-Üstündağ, G., Zopun, M., Vanderlinden, E., Ozkirimli, E., Persoons, L., Çapan, G., Naesens, L. (2020). Superior inhibition of influenza virus hemagglutinin-mediated fusion by indole-substituted spirothiazolidinones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 28(1), 115130.
- Corbett J. T. (1989). The scopoletin assay for hydrogen peroxide. A review and a better method. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 18(4), 297–307.
- Colunga Biancatelli, R., Berrill, M., Catravas, J. D., & Marik, P. E. (2020). Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Frontiers in immunology*, 11, 1451.
- Demirkaya-Miloglu, F., Kadioglu, Y., Senol, O., Yaman, M. E. (2013). Spectrofluorimetric Determination of  $\alpha$ -Tocopherol in Capsules and Human Plasma. *Indian journal of*

- 
- pharmaceutical sciences*, 75(5), 563–568.
- Derksen, A., Kühn, J., Hafezi, W., Sendker, J., Ehrhardt, C., Ludwig, S., Hensel, A. (2016). Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A virus. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 144–152.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336.
- Ding, Y., Cao, Z., Cao, L., Ding, G., Wang, Z., Xiao, W. (2017). Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. *Scientific reports*, 7, 45723.
- Dobrovolny, H. M., & Beauchemin, C. (2017). Modelling the emergence of influenza drug resistance: The roles of surface proteins, the immune response and antiviral mechanisms. *PloS one*, 12(7), e0180582.
- 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, 1581.
- Du, S. Y., Huang, H. F., Li, X. Q., Zhai, L. X., Zhu, Q. C., Zheng, K., Song, X., Xu, C. S., Li, C. Y., Li, Y., He, Z. D., Xiao, H. T. (2020). Anti-inflammatory properties of uvaol on DSS-induced colitis and LPS-stimulated macrophages. *Chinese medicine*, 15, 43.
- Dukes, J. D., Whitley, P., Chalmers, A. D. (2011). The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC cell biology*, 12, 43.
- Duno-de Stefano, Rodrigo, Can-Itza, Lilia Lorena, Rivera-Ruiz, Agesilas, Calvo-Irabién, Luz María. (2012). Regionalización y relaciones biogeográficas de la Península de Yucatán con base en los patrones de distribución de la familia Leguminosae. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(4), 1053-1072.
- Duran, R., Trejo-Torres J. C., Ibarra-Manriquez, G. (1998). Endemic Phytotaxa of the Peninnsula of Yucatan. *Harvard Papers in Botany* 3 (2): 263.
- Edinger, T. O., Pohl, M. O., Stertz, S. (2014). Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *The Journal of general virology*, 95(Pt 2), 263–277.
-

- 
- Ferrer, A., Altabella, T., Arró, M., Boronat, A. (2017). Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in lipid research*, 67, 27–37.
- Fink, D.W. & Koehler, W. R. (1970). pH Effects on fluorescence of umbelliferone. *Analytical Chemistry* 1970 42 (9), 990-993
- Flota-Burgos, G. J., Rosado-Aguilar, J. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Arjona-Cambranes, K. A. (2017). Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching. *Veterinary parasitology*, 248, 74–79.
- Forouzanfar, F., Torabi, S., Askari, V. R., Asadpour, E., Sadeghnia, H. R. (2016). Protective Effect of *Diospyros kaki* against Glucose-Oxygen-Serum Deprivation-Induced PC12 Cells Injury. *Advances in pharmacological sciences*, 2016, 3073078.
- Foxman, E. F., Storer, J. A., Fitzgerald, M. E., Wasik, B. R., Hou, L., Zhao, H., Turner, P. E., Pyle, A. M., Iwasaki, A. (2015). Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), 827–832.
- Galabov, A. S., Mileva, M., Simeonova, L., Gegova, G. (2015). Combination activity of neuraminidase inhibitor oseltamivir and  $\alpha$ -tocopherol in influenza virus A (H3N2) infection in mice. *Antivir Chem Chemother*, 24(3-4):83-91.
- Gamaleldin Elsadig Karar, M., Matei, M. F., Jaiswal, R., Illenberger, S., Kuhnert, N. (2016). Neuraminidase inhibition of Dietary chlorogenic acids and derivatives - potential antivirals from dietary sources. *Food & function*, 7(4), 2052–2059.
- Gamblin, S. J., Vachieri, S. G., Xiong, X., Zhang, J., Martin, S. R., Skehel, J. J. (2021). Hemagglutinin Structure and Activities. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 11(10), a038638.
- Gao, H., Cheng, N., Zhou, J., Wang, B., Deng, J., Cao, W. (2014). Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruits. *Journal of food science and technology*, 51(5), 950–956.
-

- 
- García Díaz, R., Cuevas Sánchez, J. A., Segura Ledesma, S., Basurto Peña, F. (2015). Panbiogeographic analysis of *Diospyros* spp.(Ebenaceae) in Mexico. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(1), 187-200.
- Gaush, C. R., & Smith, T. F. (1968). Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Applied microbiology*, 16(4), 588–594.
- Gelderblom, H. R. (1996). Structure and Classification of Viruses. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Ghildiyal, R., Gabrani, R. (2020). Antiviral therapeutics for chikungunya virus. *Expert opinion on therapeutic patents*, 30(6), 467–480.
- Giese, S., Ciminski, K., Bolte, H., Moreira, É. A., Lakdawala, S., Hu, Z., David, Q., Kolesnikova, L., Götz, V., Zhao, Y., Dengjel, J., Chin, Y. E., Xu, K., Schwemmler, M. (2017). Role of influenza A virus NP acetylation on viral growth and replication. *Nature communications*, 8(1), 1259.
- Grech, V., & Borg, M. (2020). Influenza vaccination in the COVID-19 era. *Early human development*, 148, 105116.
- Grijalva-Otero, I., Talavera, J. O., Solorzano-Santos, F., Vazquez-Rosales, G., Vladislavovna-Doubova, S., Pérez-Cuevas, R., Miranda-Novales, G., García-Peña, C., Espinel-Bermúdez, C., Torres, J., de la Peña, J. E. (2009). Critical analysis of deaths due to atypical pneumonia during the onset of the influenza A (H1N1) virus epidemic. *Archives of medical research*, 40(8), 662–668.
- Guan, W., Li, J., Chen, Q., Jiang, Z., Zhang, R., Wang, X., Yang, Z., Pan, X. (2017). Pterodontic Acid Isolated from *Laggera pterodonta* Inhibits Viral Replication and Inflammation Induced by Influenza A Virus. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(10), 1738.
- Guerra, F. (1966). Aztec medicine. *Medical History*, 10(4), 315-338.
- Harapan, H., Itoh, N., Yufika, A., Winardi, W., Keam, S., Te, H., Megawati, D., Hayati, Z., Wagner, A. L., Mudatsir, M. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of infection and public health*, 13(5), 667–673.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. (2014). Role of tocopherol (vitamin E) in plants: abiotic

- 
- stress tolerance and beyond. In Emerging technologies and management of crop stress tolerance. Academic Press, pp. 267-289.
- Heo Y. A. (2018). Baloxavir: First Global Approval. *Drugs*, 78(6), 693–697.
- Herath, W. W., Rajasekera, N. D., Sultanbawa, M. U. S., Wannigama, G. P., Balasubramaniam, S. (1978). Triterpenoid, coumarin and quinone constituents of eleven *Diospyros* species (*Ebenaceae*). *Phytochemistry*, 17(5), 1007-1009
- Herold, S., Becker, C., Ridge, K. M., Budinger, G. R. (2015). Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *The European respiratory journal*, 45(5), 1463–1478.
- Hirst, G. K. (1942). The Quantitative Determination of Influenza Virus and Antibodies by Means of Red Cell Agglutination. *Journal of Experimental Medicine*, 75(1), 49–64.
- Hoenke, S., Heise, N. V., Kahnt, M., Deigner, H. P., Csuk, R. (2020). Betulinic acid derived amides are highly cytotoxic, apoptotic and selective. *European journal of medicinal chemistry*, 207, 112815.
- Hong, E. H., Song, J. H., Kang, K. B., Sung, S. H., Ko, H. J., Yang, H. (2015). Anti-Influenza Activity of Betulinic Acid from *Zizyphus jujuba* on Influenza A/PR/8 Virus. *Biomolecules & therapeutics*, 23(4), 345–349.
- Hordyjewska, A., Ostapiuk, A., Horecka, A., Kurzepa, J. (2019). Betulin and betulinic acid: Triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews*, 18(3), 929-951
- Huang, F., Chen, J., Zhang, J., Tan, L., Lu, G., Luo, Y., Pan, T., Liang, J., Li, Q., Luo, B., Zhang, H., Lu, G. (2018). Identification of a novel compound targeting the nuclear export of influenza A virus nucleoprotein. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(3), 1826–1839.
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1239–1249.
- Ianevski, A., Yao, R., Biza, S., Zusinaite, E., Mannik, A., Kivi, G., Planken, A., Kurg, K., Tombak, E. M., Ustav, M., Jr, Shtaida, N., Kuleskiy, E., Jo, E., Yang, J., Lysvand, H., Løseth, K.,
-

- 
- Oksenyich, V., Aas, P. A., Tenson, T., Vitkauskienė, A., ...Kainov, D. E. (2020). Identification and Tracking of Antiviral Drug Combinations. *Viruses*, 12(10), 1178.
- Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., Kawaoka, Y. (1997). Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *Journal of virology*, 71(4), 3357–3362.
- Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ahmadian Chashmi, N. (2019). Effect of biotic and abiotic elicitors on production of betulin and betulinic acid in the hairy root culture of *Betula pendula* Roth. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 49(10), 1010–1019.
- Jaradat, N., Khasati, A. I., Al-Maharik, N., Eid, A. M., Jundi, W., Zatar, N., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. (2021). Isolation, identification, and antimycotic activity of plumbagin from *Plumbago europaea* L. roots, leaves and stems. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 34(4), 1421–1428.
- 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.
- Ji, S., Bai, Q., Wu, X., Zhang, D. W., Wang, S., Shen, J. L., Fei, G. H. (2020). Unique synergistic antiviral effects of Shufeng Jiedu Capsule and oseltamivir in influenza A viral-induced acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 121, 109652.
- Juárez-Méndez, M. T., Borges-Argáez, R., Ayora-Talavera, G., Escalante-Rebolledo, S. E., Escalante-Erosa, F., Cáceres-Farfán, M. (2021). *Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-hemagglutinin-neuraminidase activity on influenza AH1N1pdm09 virus. *Natural product research*, 1–6. Advance online publication.
- Jímenez-Alcalá G.L. (2022). Evaluación de la actividad antiviral de terpenos aislados de *Diospyros anisandra* Blake. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. pp
- Kadam, R. U., & Wilson, I. A. (2017). Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(2), 206–214.
-

- 
- Kakisaka, M., Sasaki, Y., Yamada, K., Kondoh, Y., Hikono, H., Osada, H., Tomii, K., Saito, T., Aida, Y. (2015). A Novel Antiviral Target Structure Involved in the RNA Binding, Dimerization, and Nuclear Export Functions of the Influenza A Virus Nucleoprotein. *PLoS pathogens*, 11(7), e1005062.
- Kapoor, R., Sharma, B., Kanwar, S. S. (2017). Antiviral phytochemicals: an overview. *Biochemistry & Physiology*, 6(2), 7.
- Kashif, M., Akhtar, N., Mustafa, R. (2017). An overview of dermatological and cosmeceutical benefits of *Diospyros kaki* and its phytoconstituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 650-662.
- Kazakova, O. B., Smirnova, I. E., Baltina, L. A., Boreko, E. I., Savinova, O. V., Pokrovskii, A. G. (2018). Antiviral activity of acyl derivatives of betulin and betulonic and dihydroquinopimaric acids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 44(6), 740-744.
- Khan, S., Nazir, M., Raiz, N., Saleem, M., Zengin, G., Fazal, G., Mahomoodally, F. M. (2019). Phytochemical profiling, in vitro biological properties and in silico studies on *Caragana ambigua* stocks (Fabaceae): A comprehensive approach. *Industrial Crops and Products*, 131, 117-124.
- Kikuchi, T., & Watanabe, A. (2019). Baloxavir heralds a new era in influenza virus biology. *Respiratory investigation*, 57(1), 1–2.
- Kim, G. N., Shin, M. R., Shin, S. H., Lee, A. R., Lee, J. Y., Seo, B. I., Kim, M. Y., Kim, T. H., Noh, J. S., Rhee, M. H., Roh, S. S. (2016). Study of Antiobesity Effect through Inhibition of Pancreatic Lipase Activity of *Diospyros kaki* Fruit and Citrus unshiu Peel. *BioMed research international*, 2016, 1723042.
- Kim, H., Webster, R. G., Webby, R. J. (2018). Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral immunology*, 31(2), 174–183.
- Koonin, E. V., Krupovic, M., Agol, V. I. (2021). The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution?. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 85(3), e0005321.
- Kordyukova, L. V., Shtykova, E. V., Baratova, L. A., Svergun, D. I., Batishchev, O. V. (2019).
-

- 
- Matrix proteins of enveloped viruses: a case study of Influenza A virus M1 protein. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 37(3), 671–690.
- Kosik, I., & Yewdell, J. W. (2019). Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin-Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. *Viruses*, 11(4), 346.
- Koszalka, P., Tilmanis, D., Hurt, A. C. (2017). Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. *Influenza and other respiratory viruses*, 11(3), 240–246.
- Krammer, F., Smith, G., Fouchier, R., 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(1), 3.
- Krejčová, L., & Petr M. 2015. Structure of Influenza Viruses, Connected with Influenza Life Cycle." *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 1: 13–19.
- Kuete, V., Omosa, L. K., Tala, V. R., Midiwo, J. O., Mbaveng, A. T., Swaleh, S., Karaosmanoğlu, O., Sivas, H. (2016). Cytotoxicity of Plumbagin, Rapanone and 12 other naturally occurring Quinones from Kenyan Flora towards human carcinoma cells. *BMC pharmacology & toxicology*, 17(1), 60.
- Kyme, H., Lee, C. T., Kim, Y. T., Lee, J. H. (2019). Self-enzyme chemiluminescence immunoassay capable of rapidly diagnosing the infection of influenza A (H1N1) virus. *Talanta*, 192, 189–196.
- Lampejo T. (2020). Influenza and antiviral resistance: an overview. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(7), 1201–1208.
- Leang, S. K., & Hurt, A. C. (2017). Fluorescence-based Neuraminidase Inhibition Assay to Assess the Susceptibility of Influenza Viruses to The Neuraminidase Inhibitor Class of Antivirals. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (122), 55570.
- Lee G. Y., & Han S. N. (2018). The role of vitamin E in immunity. *Nutrients*. 10: 1614.
- Lee, J. H., Oh, M., Seok, J. H., Kim, S., Lee, D. B., Bae, G., Bae, H. I., Bae, S. Y., Hong, Y. M., Kwon, S. O., Lee, D. H., Song, C. S., Mun, J. Y., Chung, M. S., Kim, K. H. (2016). Antiviral Effects of Black Raspberry (*Rubus coreanus*) Seed and Its Gallic Acid against Influenza

- 
- Virus Infection. *Viruses*, 8(6), 157.
- Leite, J. A., Resende, P., Araya, J. L., Barrera, G. B., Baumeister, E., Caicedo, A. B., Coppola, L., de Mello, W. A., de Mora, D., Cordeiro Dos Santos, M., Fasce, R., Fernández, J., Goñi, N., Martínez, I. L., Mayhua, J. O., Motta, F., Nuñez, M., Ojeda, J., Ortega, M. J., Ospitia, E., Palekar, R. (2020). Genetic evolution of influenza viruses among selected countries in Latin America, 2017-2018. *PloS one*, 15(3), e0227962.
- Leung N. (2021). Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nature reviews. Microbiology*, 19(8), 528–545.
- Li, T. C., Chan, M. C., & Lee, N. (2015). Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. *Viruses*, 7(9), 4929–4944.
- Li, Y., Xu, Y. L., Lai, Y. N., Liao, S. H., Liu, N., Xu, P. P. (2017). Intranasal co-administration of 1,8-cineole with influenza vaccine provide cross-protection against influenza virus infection. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 34, 127–135.
- Lipničánová, S., Chmelová, D., Ondrejovič, M., Frečer, V., Miertuš, S. (2020). Diversity of sialidases found in the human body - A review. *International journal of biological macromolecules*, 148, 857–868.
- Liu, J., Zu, M., Chen, K., Gao, L., Min, H., Zhuo, W., Chen, W., Liu, A. (2018). Screening of neuraminidase inhibitory activities of some medicinal plants traditionally used in Lingnan Chinese medicines. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 102.
- Liu, Z., Zhao, J., Li, W., Wang, X., Xu, J., Xie, J., Tao, K., Shen, L., Zhang, R. (2015). Molecular docking of potential inhibitors for influenza H7N9. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2015, 480764.
- Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N. G., Menichini, F. (2009). Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 64(4), 264–270.
- Louten J. (2016). Virus Transmission and Epidemiology. *Essential Human Virology*, 71–92.
-

- 
- Łuksza, M., & Lässig, M. (2014). A Predictive Fitness Model for Influenza. *Nature*, 507 (7490): 57–61.
- Lv, X. J., Li, Y., Ma, S. G., Qu, J., Liu, Y. B., Li, Y. H., Zhang, D., Li, L., Yu, S. S. (2016). Antiviral Triterpenes from the Twigs and Leaves of *Lyonia ovalifolia*. *Journal of natural products*, 79(11), 2824–2837.
- Mallavadhani, U. V., Panda, A. K., Rao, Y. R. (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, 49(4), 901–951.
- 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, 39.
- McKimm-Breschkin J. L. (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and other respiratory viruses*, 7 Suppl 1(Suppl 1), 25–36.
- Medina, R. A., & García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), 590–603.
- Mehrbod, P., Abdalla, M. A., Njoya, E. M., Ahmed, A. S., Fotouhi, F., Farahmand, B., Gado, D. A., Tabatabaian, M., Fasanmi, O. G., Eloff, J. N., McGaw, L. J., Fasina, F. O. (2018). South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 112.
- Melville, K., Rodriguez, T., & Dobrovolny, H. M. (2018). Investigating Different Mechanisms of Action in Combination Therapy for Influenza. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1207.
- Mercorelli, B., Palù, G., Loregian, A. (2018). Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We?. *Trends in microbiology*, 26(10), 865–876.
- Messeha, S. S., Zarmouh, N. O., Mendonca, P., Alwagdani, H., Kolta, M. G., Soliman, K. (2018). The inhibitory effects of plumbagin on the NF-κB pathway and CCL2 release in racially different triple-negative breast cancer cells. *PLoS one*, 13(7), e0201116.
- Mifsud, E. J., Hayden, F. G., Hurt, A. C. (2019). Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral research*, 169, 104545.
-

- 
- Miller, R. W., Sirois, J. C., Morita, H. (1975). The reaction of coumarins with horseradish peroxidase. *Plant physiology*, 55(1), 35–41.
- Mina, M. J., & Klugman, K. P. (2014). The role of influenza in the severity and transmission of respiratory bacterial disease. *The Lancet. Respiratory medicine*, 2(9), 750–763.
- Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K., Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB life*, 71(4), 430–441.
- Mohan, S., Elhassan Taha, M. M., Makeen, H. A., Alhazmi, H. A., Al Bratty, M., Sultana, S., Ahsan, W., Najmi, A., Khalid, A. (2020). Bioactive Natural Antivirals: An Updated Review of the Available Plants and Isolated Molecules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), 4878.
- 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.
- Nasser, Z. H., Swaminathan, K., Müller, P., Downard, K. M. (2013). Inhibition of influenza hemagglutinin with the antiviral inhibitor arbidol using a proteomics based approach and mass spectrometry. *Antiviral research*, 100(2), 399–406.
- Nayak, D. P., & Reichl, U. (2004). Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *Journal of virological methods*, 122(1), 9–15.
- Nemanichvili, N., Tomris, I., Turner, H. L., McBride, R., Grant, O. C., van der Woude, R., Aldosari, M. H., Pieters, R. J., Woods, R. J., Paulson, J. C., Boons, G. J., Ward, A. B., Verheije, M. H., de Vries, R. P. (2019). Fluorescent Trimeric Hemagglutinins Reveal Multivalent Receptor Binding Properties. *Journal of molecular biology*, 431(4), 842–856.
- 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., Khoi, N. M., Park, S., Kwak, H. J., Nhiem, N. X., Trang, B., 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.
- Nisar, M., Shah, S. M., Khan, I., Sheema, Sadiq, A., Khan, S., Shah, S. M. (2015). Larvicidal,
-

- 
- insecticidal, brine shrimp cytotoxicity and anti-oxidant activities of *Diospyros kaki* (L.) reported from Pakistan. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28(4), 1239–1243.
- O'Hanlon, R., & Shaw, M. L. (2019). Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. *Current opinion in virology*, 35, 14–18.
- Ohfuji, S., Kobayashi, M., Ide, Y., Egawa, Y., Saito, T., Kondo, K., Ito, K., Kase, T., Maeda, A., Fukushima, W., Hirota, Y. (2017). Key points in evaluating immunogenicity of pandemic influenza vaccines: A lesson from immunogenicity studies of influenza A(H1N1)pdm09 vaccine. *Vaccine*, 35(39), 5303–5308.
- Oliveira, A. F., Teixeira, R. R., Oliveira, A. S., Souza, A. P., Silva, M. L., Paula, S. O. (2017). Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(3), 505.
- Omoto, S., Speranzini, V., Hashimoto, T., Noshi, T., Yamaguchi, H., Kawai, M., Kawaguchi, K., Uehara, T., Shishido, T., Naito, A., Cusack, S. (2018). Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Scientific reports*, 8(1), 9633.
- Orabi, M. A., & Orabi, E. A. (2016). Antiviral and antioxidant activities of flavonoids of *Ficus virens*: Experimental and theoretical investigations. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3), 120.
- 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.
- Pant, M., Lal, A., Rana, S., Rani, A. (2012). *Plumbago zeylanica* L.: a mini review. *International Journal of Pharmaceutical Applications*, 3(3), 399-405.
- Parra, C., Soto, E., León, G., Salas, C. O., Heinrich, M., Echiburú-Chau, C. (2018). Nutritional composition, antioxidant activity and isolation of scopoletin from *Senecio nutans*: support of ancestral and new uses. *Natural product research*, 32(6), 719–722.
- Patil, D., Roy, S., Dahake, R., Rajopadhye, S., Kothari, S., Deshmukh, R., Chowdhary, A.
-

- 
- (2013). Evaluation of *Jatropha curcas* Linn. leaf extracts for its cytotoxicity and potential to inhibit hemagglutinin protein of influenza virus. *Indian journal of virology: an official organ of Indian Virological Society*, 24(2), 220–226.
- Pérez-Sarabia, J.E., Duno de Stefano, R., Carnevali Fernández-Concha, G., Ramírez Morillo, I., Méndez-Jiménez, N., Zamora-Crescencio, P., Gutiérrez-Báez, C., & Cetzal-Ix, W.. (2017). El conocimiento florístico de la Península de Yucatán, México. *Polibotánica*, (44), 39-49
- Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1–5.
- Peyrat, L. A., Eparvier, V., Eydoux, C., Guillemot, J. C., Stien, D., Litaudon, M. (2016). Chemical diversity and antiviral potential in the pantropical *Diospyros* genus. *Fitoterapia*, 112, 9–15.
- Pichersky, E., Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439–445.
- Pichersky, E., Raguso, R. A. (2018). Why do plants produce so many terpenoid compounds?. *The New phytologist*, 220(3), 692–702.
- Piret, J., Boivin, G. (2021). Pandemics Throughout History. *Frontiers in microbiology*, 11, 631736.
- Pleschka S. (2013). Overview of influenza viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 370, 1–20.
- Proskurnina, E. V., Izmailov, D. Y., Sozarukova, M. M., Zhuravleva, T. A., Leneva, I. A., Poromov, A. A. (2020). Antioxidant Potential of Antiviral Drug Umifenovir. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(7), 1577.
- Quintal, Carlos, Rocío Borges, Andres Uc, Gonzalo Canché, and M. Cáceres. 2013. "A Selective Chemical Method for the Separation of Quinones from the Stem Bark of *Diospyros Anisandra*" 5 (4): 2–6.
- Quosdorf, S., Schuetz, A., Kolodziej, H. (2017). Different Inhibitory Potencies of Oseltamivir Carboxylate, Zanamivir, and Several Tannins on Bacterial and Viral Neuraminidases as Assessed in a Cell-Free Fluorescence-Based Enzyme Inhibition Assay. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 1989.
-

- 
- Rajasekaran, D., Palombo, E. A., Chia Yeo, T., Lim Siok Ley, D., Lee Tu, C., Malherbe, F., Grollo, L. (2013). Identification of traditional medicinal plant extracts with novel anti-influenza activity. *PloS one*, 8(11), e79293.
- Ramirez-Gonzalez J. E., Gonzalez-Duran E., Alcantara-Perez P., *et al.* (2011). Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Mexico. *Emerg Infect Dis*, 17(2):283-286.
- Rasamison, V. E., Rakotondraibe, H. L., Razafintsalama, V., Rakotonandrasana, S., Ratsimbason, M. A., Rafidinarivo, E. (2016). Chemical constituents from stems and leaves of *Diospyros gracilipes* Hiern and the antimicrobial and cytotoxic principles. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 109.
- Rauf, A., Hadda, T. B., Patel, S., Uddin, G., Bawazeer, S., Abu-Izneid, T., Ahmad, B. (2017b). Identification, structure elucidation, and antioxidant potential of a new compound from *Diospyros lotus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(5), 849-851.
- Rauf, A., Uddin, G., Patel, S., Khan, A., Halim, S. A., Bawazeer, S., Ahmad, K., Muhammad, N., Mubarak, M. S. (2017a). *Diospyros*, an under-utilized, multi-purpose plant genus: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 91, 714–730. h
- Reardon, T. R., Murray, A. J., Turi, G. F., Wirblich, C., Croce, K. R., Schnell, M. J., Jessell, T. M., Losonczy, A. (2016). Rabies Virus CVS-N2c( $\Delta$ G) Strain Enhances Retrograde Synaptic Transfer and Neuronal Viability. *Neuron*, 89(4), 711–724.
- Reina, J., & Reina, N. (2019). Baloxavir marboxil: un potente inhibidor de la endonucleasa cap-dependiente de los virus gripales. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(1), 1.
- Richart, S. M., Li, Y. L., Mizushina, Y., Chang, Y. Y., Chung, T. Y., Chen, G. H., Tzen, J. T., Shia, K. S., Hsu, W. L. (2018). Synergic effect of curcumin and its structural analogue (Monoacetylcurcumin) on anti-influenza virus infection. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 1015–1023.
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Dorantes-Euán, A. (2008). Actividad ixodocida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(3),297-301.
-

- 
- Rosário-Ferreira, N., Preto, A. J., Melo, R., Moreira, I. S., Brito, R. (2020). The Central Role of Non-Structural Protein 1 (NS1) in Influenza Biology and Infection. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1511.
- Roy, A., Bharadvaja, N. A Review on Multi-Purpose medicinal plant *Plumbago zeylanica* and in-vitro production of plumbagin. *Scope of Phytochemically Unexplored Medicinal Plants*, 129-39.
- Russell, C. J., Hu, M., Okda, F. A. (2018). Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends in microbiology*, 26(10), 841–853.
- Sadati, S. M., Gheibi, N., Ranjbar, S., Hashemzadeh, M. S. (2019). Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Biomedical reports*, 10(1), 33–38.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *International journal of environmental research and public health*, 17(10), 3376.
- Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltrán, G., Gaforio, J. J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(50), 12173–12182.
- Sánchez Ruiz, J. F., Tejeda Rosales, M. E., Sánchez Tejeda, J. F., Sánchez Tejeda, M. G. (2012). La farmacia, la medicina y la herbolaria en el código florentino. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(3), 55-66.
- Saunders-Hastings, P. R., & Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 5(4), 66.
- Serkedjieva, J., Nikolova, E., Kirilov, N. (2010). Synergistic inhibition of influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and epsilon-aminocaproic acid *in vitro* and *in vivo*. *Acta virologica*, 54(2), 137–145.
- 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), 1650.

- 
- Sharma, G., Vasanth Kumar, S., Wahab, H. A. (2018). Molecular docking, synthesis, and biological evaluation of naphthoquinone as potential novel scaffold for H5N1 neuraminidase inhibition. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 36(1), 233–242.
- Sharma, V. (2017). Brief review on the genus *Diospyros*: a rich source of naphthoquinones. *Asian J Adv Basic Sci*, 5(2), 34-53.
- Shen, X., Zhang, X., Liu, S. (2013). Novel hemagglutinin-based influenza virus inhibitors. *Journal of thoracic disease*, 5 Suppl 2(Suppl 2), S149–S159.
- Shen, Z., Lou, K., Wang, W. (2015). New small-molecule drug design strategies for fighting resistant influenza A. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 5(5), 419–430.
- Shtyrya, Y. A., Mochalova, L. V., Bovin, N. V. (2009). Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta naturae*, 1(2), 26–32.
- Shoji, M., Woo, S. Y., Masuda, A., Win, N. N., Ngwe, H., Takahashi, E., Kido, H., Morita, H., Ito, T., Kuzuhara, T. (2017). Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 96.
- Shyr, Z. A., Cheng, Y. S., Lo, D. C., & Zheng, W. (2021). Drug combination therapy for emerging viral diseases. *Drug discovery today*, 26(10), 2367–2376.
- Siddique, H. R., & Saleem, M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life sciences*, 88(7-8), 285–293.
- Sidwell, R. W., & Smee, D. F. (2000). *In vitro* and *in vivo* assay systems for study of influenza virus inhibitors. *Antiviral research*, 48(1), 1–16.
- Sleman, S. S. (2018). How influenza a causes “epidemics and pandemics” among the population: novel targets for anti-influenza molecules. *Biom Biostat Int J*, 7(5), 452-5.
- Somwong, P., & Theanphong, O. (2021). Quantitative analysis of triterpene lupeol and anti-inflammatory potential of the extracts of traditional pain-relieving medicinal plants *Derris scandens*, *Albizia procera*, and *Diospyros rhodocalyx*. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 12(2), 147–151.

- 
- Song, G., Shen, X., Li, S., Li, Y., Liu, Y., Zheng, Y., Lin, R., Fan, J., Ye, H., Liu, S. (2015). Structure-activity relationships of 3-O- $\beta$ -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel H5N1 entry inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 93, 431–442.
- Sousa, P. L., Souza, R., Tessarolo, L. D., de Menezes, R., Sampaio, T. L., Canuto, J. A., Martins, A. (2017). Betulinic acid induces cell death by necrosis in *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 174, 72–75.
- Steinhauer D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 258(1), 1–20.
- Suchaichit, N. P., Suchaichit, N., Kanokmedhakul, K., Poopasit, K., Moosophon, P., Kanokmedhakul, S. (2018). Two new naphthalenones from *Diospyros undulata* stem bark and their cytotoxic activity. *Phytochemistry Letters*, 24, 132-135.
- Summers, F. A., Zhao, B., Ganini, D., Mason, R. P. (2013). Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light. *Methods in enzymology*, 526, 1–17.
- Takashita E. (2021). Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 11(5), a038687.
- 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.
- Thada, R., Chockalingam, S., Dhandapani, R. K., Panchamoorthy, R. (2013). Extraction and quantitation of coumarin from cinnamon and its effect on enzymatic browning in fresh apple juice: a bioinformatics approach to illuminate its antibrowning activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(22), 5385–5390.
- Thakor, N., & Janathia, B. (2021). Plumbagin: A potential candidate for future research and development. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10.2174/1389201023666211230113146. Advance online publication.
- Thompson, A. J., de Vries, R. P., Paulson, J. C. (2019). Virus recognition of glycan receptors. *Current opinion in virology*, 34, 117–129.

- 
- Te Velhuis, A. J., & Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature reviews. Microbiology*, 14(8), 479–493.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ueda, K., Kawabata, R., Irie, T., Nakai, Y., Tohya, Y., Sakaguchi, T. (2013). Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. *PloS one*, 8(1), e55343.
- Vavricka, C. J., Liu, Y., Kiyota, H., Sriwilaijaroen, N., Qi, J., Tanaka, K., Wu, Y., Li, Q., Li, Y., Yan, J., Suzuki, Y., Gao, G. F. (2013). Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors. *Nature communications*, 4, 1491.
- von Itzstein M. (2007). The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(12), 967–974.
- Walley, J. W., Kliebenstein, D. J., Bostock, R. M., Dehesh, K. (2013). Fatty acids and early detection of pathogens. *Current opinion in plant biology*, 16(4), 520–526.
- Walther, E., Richter, M., Xu, Z., Kramer, C., von Grafenstein, S., Kirchmair, J., Grienke, U., Rollinger, J. M., Liedl, K. R., Slevogt, H., Sauerbrei, A., Saluz, H. P., Pfister, W., Schmidtke, M. (2015). Antipneumococcal activity of neuraminidase inhibiting artocarpin. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 305(3), 289–297.
- Wang Y. H. (2020). Sialidases From *Clostridium perfringens* and Their Inhibitors. *Frontiers in*

- 
- cellular and infection microbiology*, 9, 462.
- Wang, S., Alseekh, S., Fernie, A. R., Luo, J. (2019). The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Molecular plant*, 12(7), 899–919.
- Wang, X., Jia, W., Zhao, A., Wang, X. (2006). Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytotherapy research : PTR*, 20(5), 335–341.
- Wang, Y., Yan, W., Chen, Q., Huang, W., Yang, Z., Li, X., Wang, X. (2017). Inhibition viral RNP and anti-inflammatory activity of coumarins against influenza virus. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 87, 583–588.
- Wen, F., & Wan, X. F. (2019). Influenza Neuraminidase: Underrated Role in Receptor Binding. *Trends in microbiology*, 27(6), 477–479.
- Wilks, S., de Graaf, M., Smith, D. J., Burke, D. F. (2012). A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine*, 30(29), 4369–4376.
- Wink M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 2(3), 251–286.
- Wisetsai, A., Schevenels, F. T., & Lekphrom, R. (2021). Chemical constituents and their biological activities from the roots of *Diospyros filipendula*. *Natural product research*, 35(16), 2739–2743.
- Wohlbold, T. J., & Krammer, F. (2014). In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses*, 6(6), 2465–2494.
- Woolhouse, M., Scott, F., Hudson, Z., Howey, R., Chase-Topping, M. (2012). Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1604), 2864–2871.
- Wosawat, P., Senawong, T., Suchaichit, N., Suchaichit, N. P., Kanokmedhakul, K., Kanokmedhakul, S., Moosophon, P. (2021). Cytotoxic compounds from the stems of *Diospyros ehretioides* and their bioactivity. *Natural product research*, 35(23), 4922–4929.
- Wren, J. T., Blevins, L. K., Pang, B., Basu Roy, A., Oliver, M. B., Reimche, J. L., Wozniak, J. E., Alexander-Miller, M. A., Swords, W. E. (2017). Pneumococcal Neuraminidase A (NanA)
-

- 
- Promotes Biofilm Formation and Synergizes with Influenza A Virus in Nasal Colonization and Middle Ear Infection. *Infection and immunity*, 85(4), e01044-16.
- Wu, W., Lin, D., Shen, X., Li, F., Fang, Y., Li, K., Xun, T., Yang, G., Yang, J., Liu, S., He, J. (2015). New influenza A Virus Entry Inhibitors Derived from the Viral Fusion Peptides. *PLoS one*, 10(9), e0138426.
- Wu, Y., Gao, F., Qi, J., Bi, Y., Fu, L., Mohan, S., Chen, Y., Li, X., Pinto, B. M., Vavricka, C. J., Tien, P., Gao, G. F. (2016). Resistance to Mutant Group 2 Influenza Virus Neuraminidases of an Oseltamivir-Zanamivir Hybrid Inhibitor. *Journal of virology*, 90(23), 10693–10700.
- Xiao, S., Si, L., Tian, Z., Jiao, P., Fan, Z., Meng, K., Zhou, X., Wang, H., Xu, R., Han, X., Fu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Zhou, D. (2016). Pentacyclic triterpenes grafted on CD cores to interfere with influenza virus entry: A dramatic multivalent effect. *Biomaterials*, 78, 74–85.
- Xie, Y., Huang, B., Yu, K., Shi, F., Liu, T., Xu, W. (2013). Caffeic acid derivatives: a new type of influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(12), 3556–3560.
- Yang, J., Huang, Y., Liu, S. (2019). Investigational antiviral therapies for the treatment of influenza. *Expert opinion on investigational drugs*, 28(5), 481–488.
- Yang, J., Li, M., Shen, X., Liu, S. (2013). Influenza A virus entry inhibitors targeting the hemagglutinin. *Viruses*, 5(1), 352–373.
- Yang, S. J., Jo, H., Kim, K. A., Ahn, H. R., Kang, S. W., Jung, S. H. (2016). *Diospyros kaki* Extract Inhibits Alkali Burn-Induced Corneal Neovascularization. *Journal of medicinal food*, 19(1), 106–109.
- Yen, H. L., Hoffmann, E., Taylor, G., Scholtissek, C., Monto, A. S., Webster, R. G., Govorkova, E. A. (2006). Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *Journal of virology*, 80(17), 8787–8795.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(5), 559.
- Yuan, L., Zhao, Y., Sun, X. L. (2020). Sialidase substrates for Sialidase assays - activity, specificity, quantification and inhibition. *Glycoconjugate journal*, 37(5), 513–531.
-

- Zapata, B., Rojas, M., Betancur-Galvis, L., Mesa-Arango, A. C., Pérez-Guaita, D., González, M. A. (2013). Cytotoxic, immunomodulatory, antimycotic, and antiviral activities of semisynthetic 14-hydroxyabietane derivatives and triptoquinone C-4 epimers. *MedChemComm*, 4(9), 1239-1246.
- Zeng, L. Y., Yang, J., Liu, S. (2017). Investigational hemagglutinin-targeted influenza virus inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs*, 26(1), 63–73.
- Zhang, Q., Liang, T., Nandakumar, K. S., Liu, S. (2021). Emerging and state of the art hemagglutinin-targeted influenza virus inhibitors. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 22(6), 715–728.
- Zhao, Q., Zhang, J. L., Li, F. (2018). Application of Metabolomics in the Study of Natural Products. *Natural products and bioprospecting*, 8(4), 321–334.
- Zhang, X., Zhang, Z., Zheng, B., He, Z., Winberg, G., Ernberg, I. (2013). An update on viral association of human cancers. *Archives of virology*, 158(7), 1433–1443.

### Sitios Web

- Center for Diseases Control and Prevention. (actualizado 7 de marzo de 2020)  
<https://www.cdc.gov/flu/index.htm> (acceso marzo de 2022)  
<https://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm> (acceso 8 de mayo de 2020).
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (actualizado 2020)  
<http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/rbiog4mgw.png> (acceso abril 2020).
- Dirección General de Epidemiología. Influenza (actualizado 2022)  
<https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-2022> (acceso marzo 2022)  
<https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-2020> (acceso enero 2020)
- Organización Panamericana de la Salud. (actualizado 2022)  
<https://www.paho.org/es/temas/influenza-otros-virus-respiratorios> (acceso marzo 2022)  
[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3352&Itemid=2469](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=3352&Itemid=2469) (acceso mayo 2020)

---

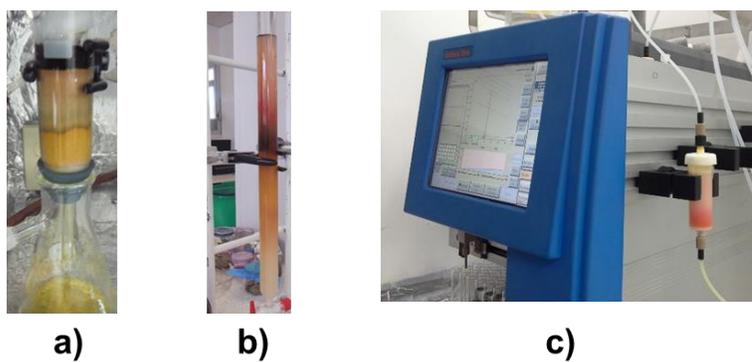
United Nations Environment Programme (actualizado 2022) <https://www.unep.org/> ( acceso enero 2022) [https://www.unenvironment.org/explore-topics/ecosystems?\\_ga=2.229753308.1129691093.1544322174-2056065479.1543321849](https://www.unenvironment.org/explore-topics/ecosystems?_ga=2.229753308.1129691093.1544322174-2056065479.1543321849) (acceso junio 2020).

World Health Organization. (Actualizado 2022). <http://apps.who.int/gho/data/node.main.172?lang=en> (acceso enero 2022). [http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm\\_strategy14\\_23/en/](http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/) (acceso mayo 2020) [https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/regulation\\_legislation/icdra/en/](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/regulation_legislation/icdra/en/) (acceso diciembre 2018).

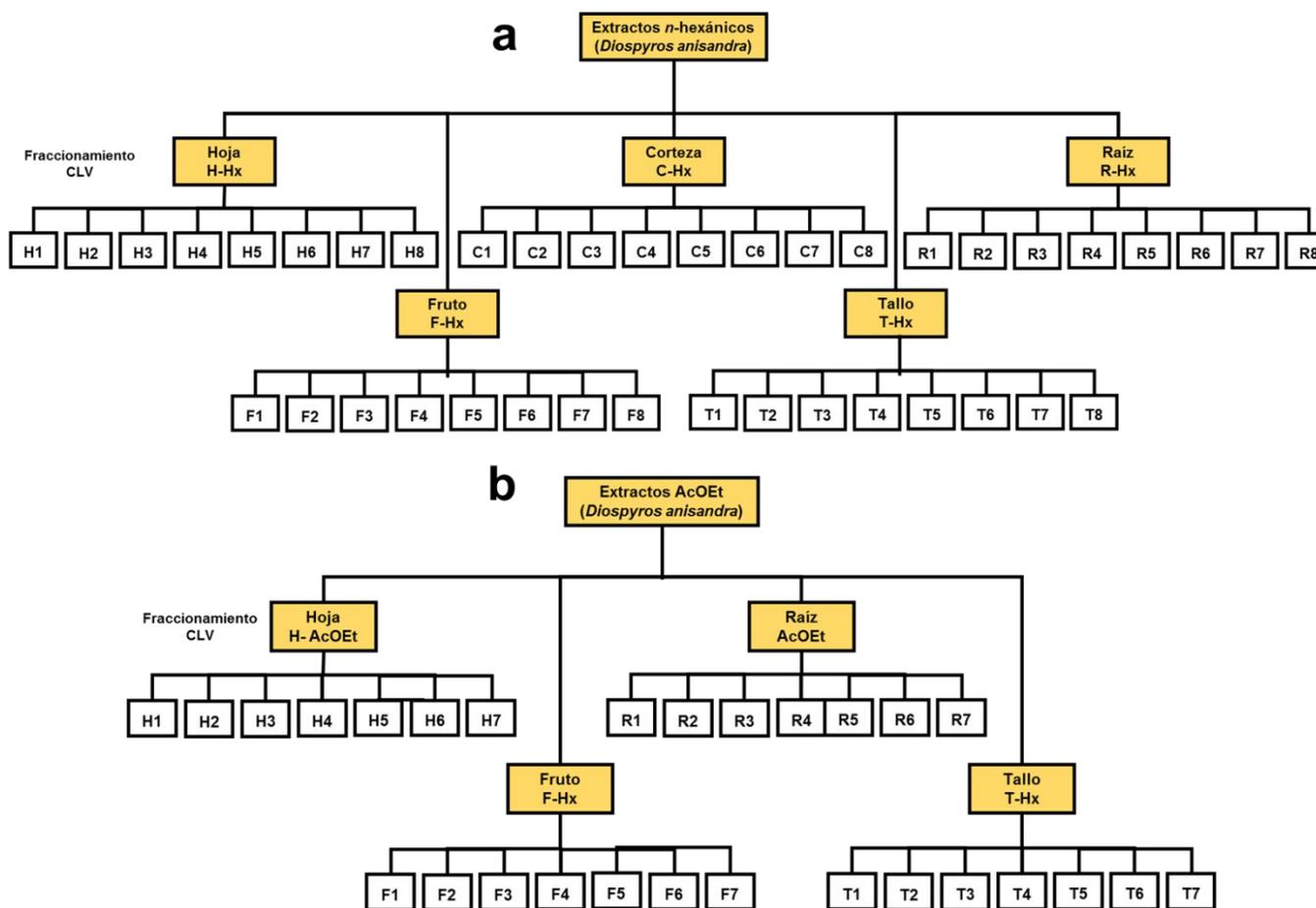
## ANEXO(S)

## APÉNDICES

## APÉNDICE A. Material adicional Capítulo I

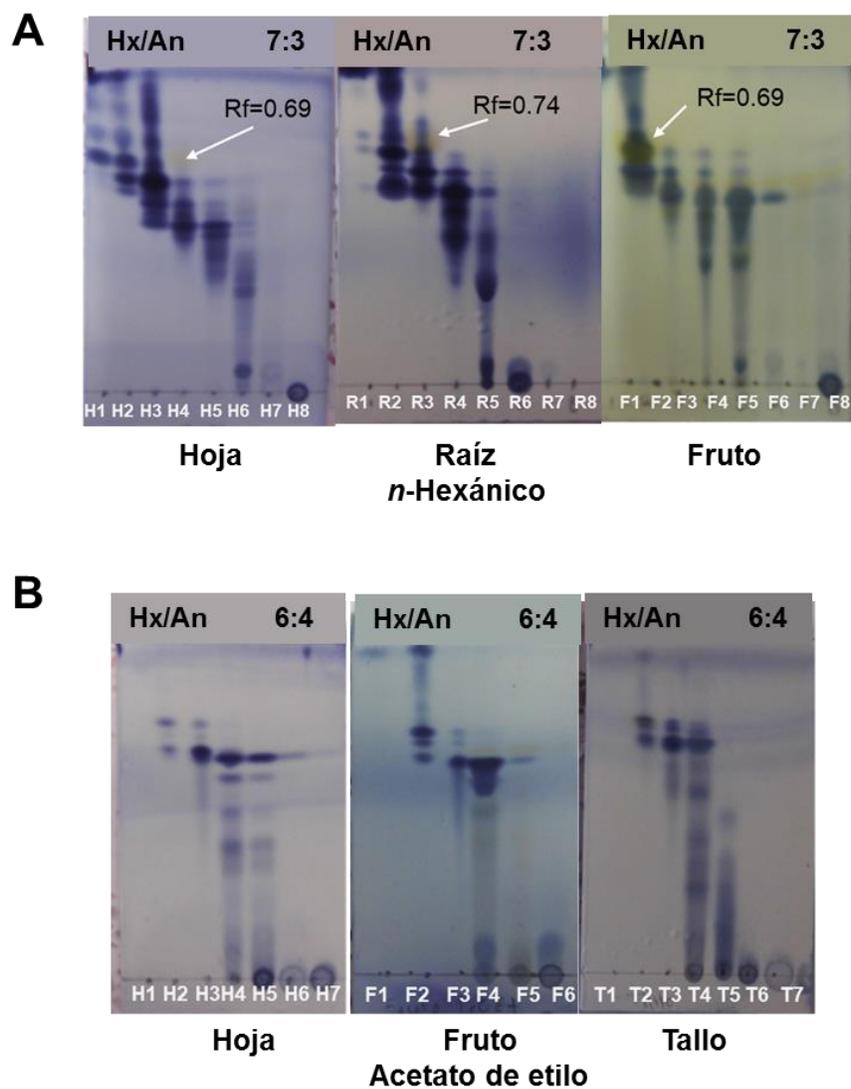


**Figura A1** Fraccionamiento de los extractos obtenidos de *D. anisandra* utilizando una columna a) CLV, b) cromatografía de permeación en gel y c) un sistema de purificación flash automatizado.



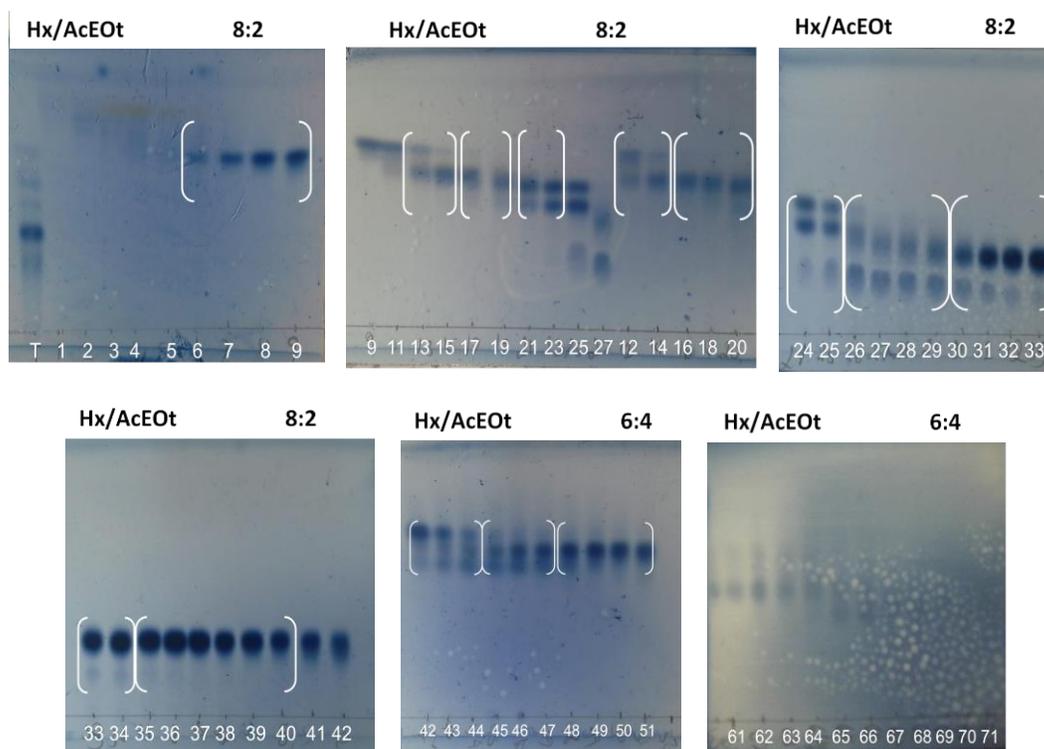
**Figura A2** Diagrama de obtención de fracciones a partir de extractos *n*-hexánicos (a) y de AcOEt (b) mediante fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (CLV).

## APÉNDICE B: Perfiles cromatográficos: CCD, HPLC y CG-EM

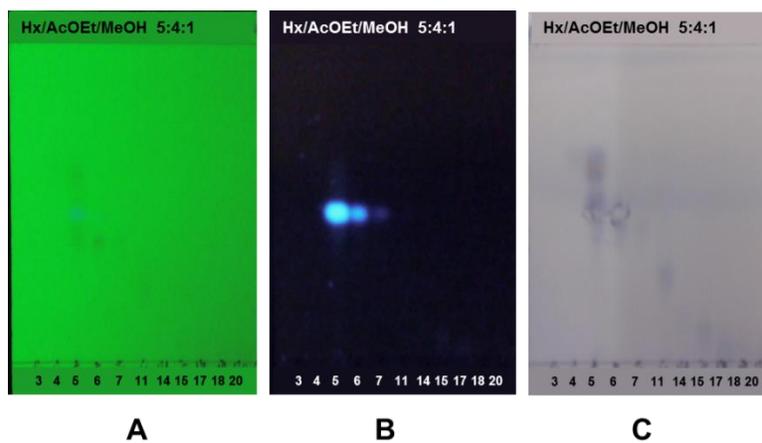


**Figura B1** Monitoreo por CCD de hoja, raíz y fruto *n*-hexánicos de *D. anisandra*.

Se llevó a cabo la CCD en un sistema *n*-hexano/An 7:3 (A) y CCD de hoja, fruto y tallo de compuestos de mediana polaridad (AcOEt) de *D. anisandra* en un sistema *n*-hexano/An 6:4 (B) reveladas con ácido fosfomolibdico.

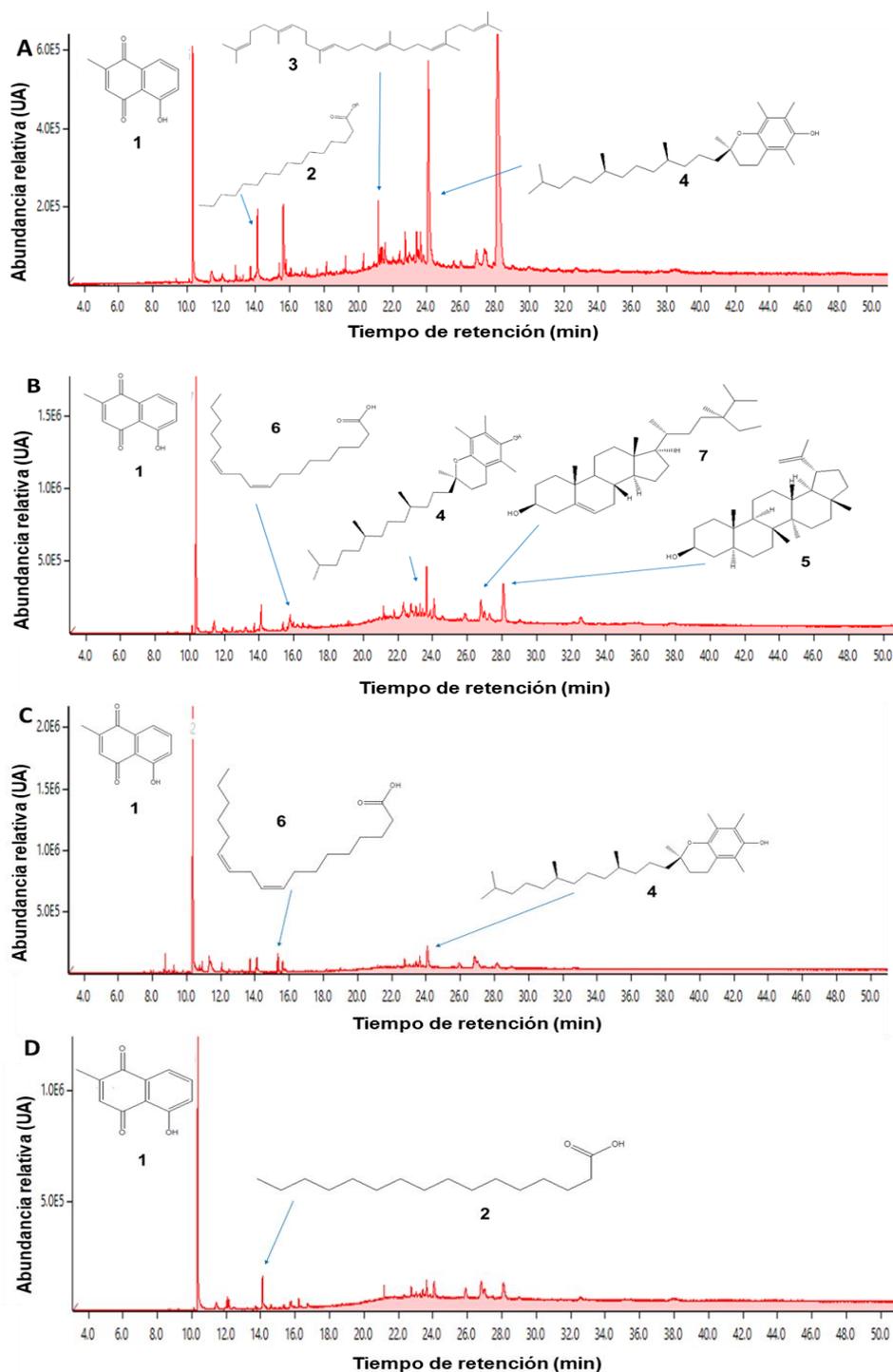


**Figura B2** Monitoreo de CCD de subfracciones obtenidas a partir de 40 mg de la fracción tres (F3) de fruto de *D. anisandra*.



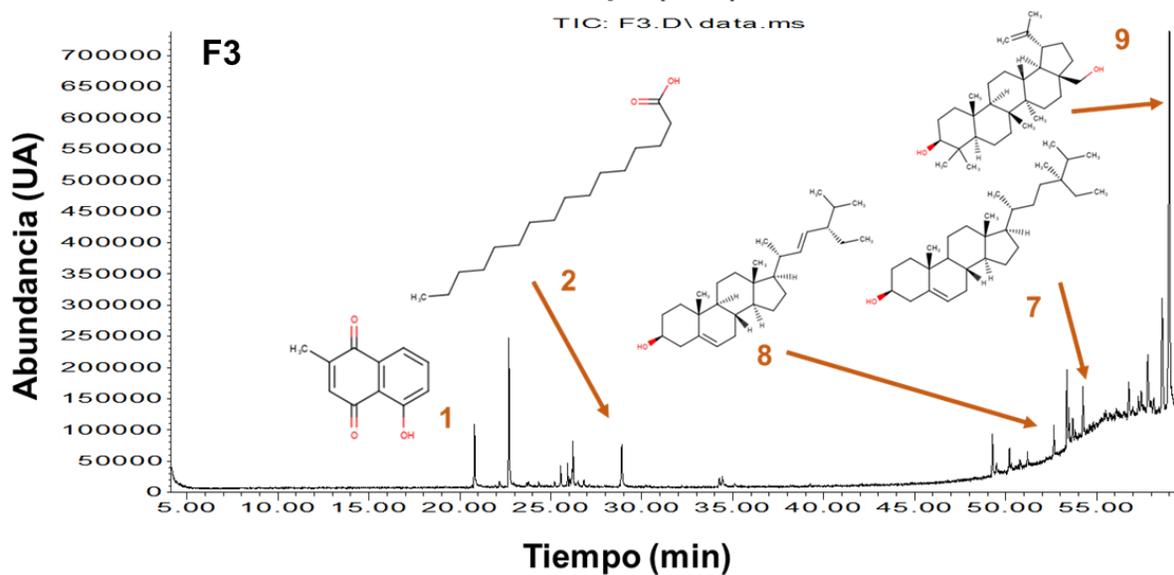
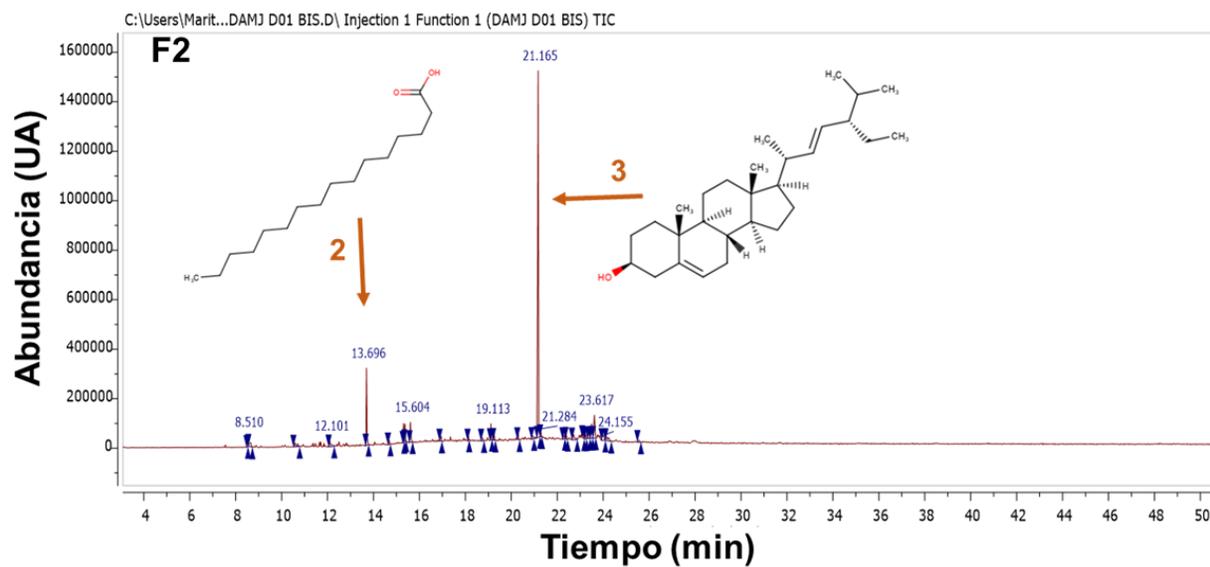
**Figura B3** Análisis por CCD.

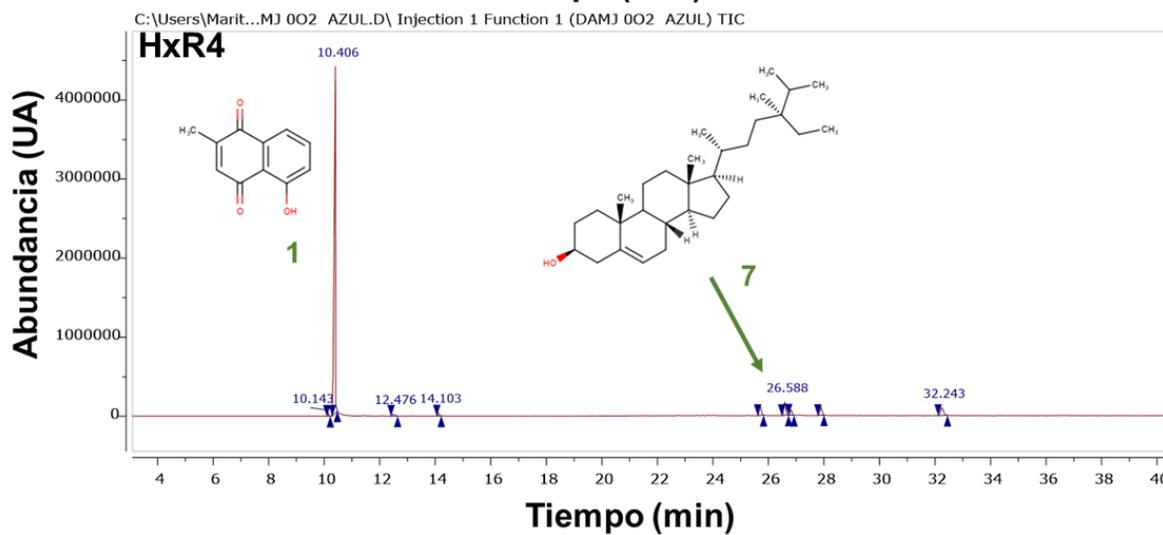
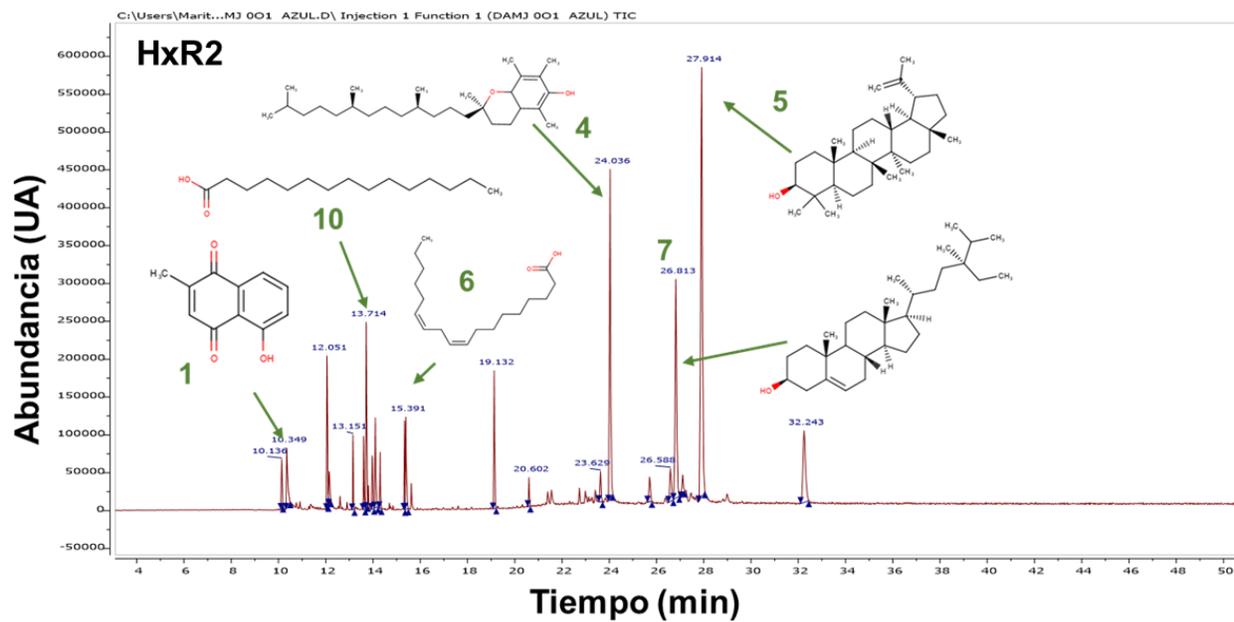
El Monitoreo de CCD se llevó a cabo en subfracciones obtenidas a partir de 28.8 mg de la fracción cinco (R5) de raíz de *D. anisandra*, obtenidas mediante fraccionamiento con purificación flash observadas a 264nm (A), 365 nm (B) y reveladas con ácido fosfomolibdico (C).

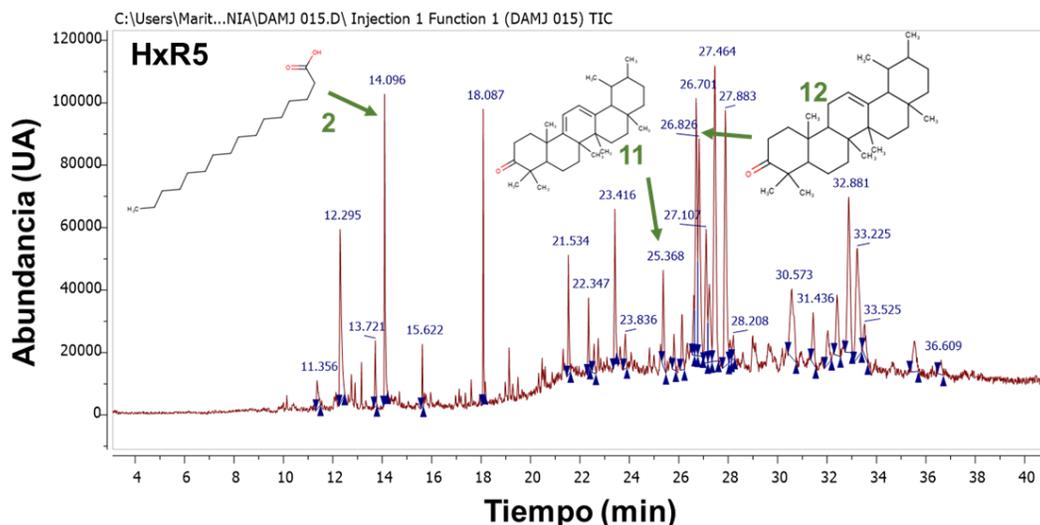


**Figura B4** Perfil cromatográfico de CG/EM de extractos *n*-hexánicos.

Se muestran los perfiles de hoja (A), fruto (B), tallo (C) y raíz (D) de *D. anisandra* donde se aprecian las estructuras de la plumbagina (1), ácido *n*-hexadecanoico (2), escualeno (3), vitamina E (4), lupeol (5), ácido 9,12-octadecadienoico (6) y sitosterol (7).

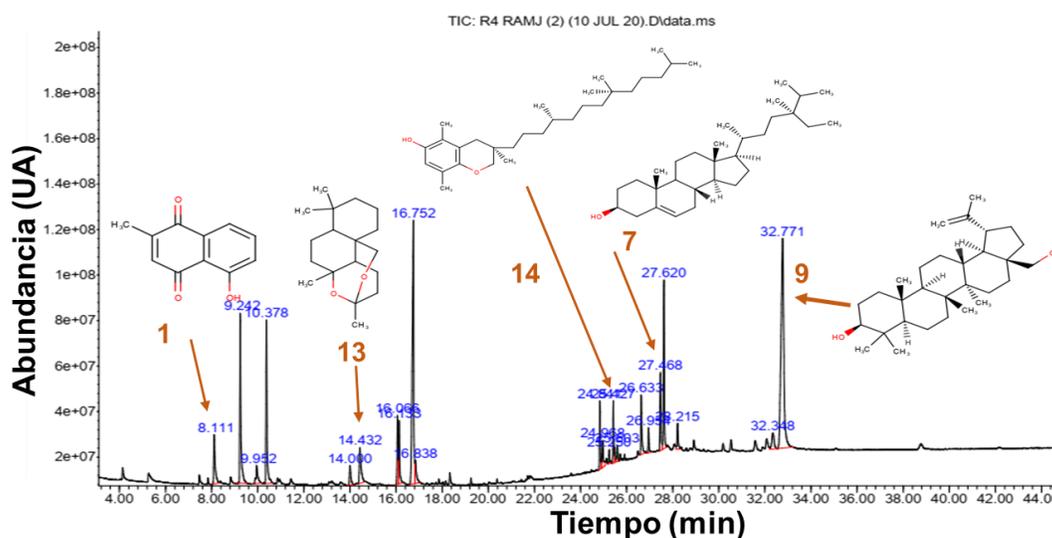






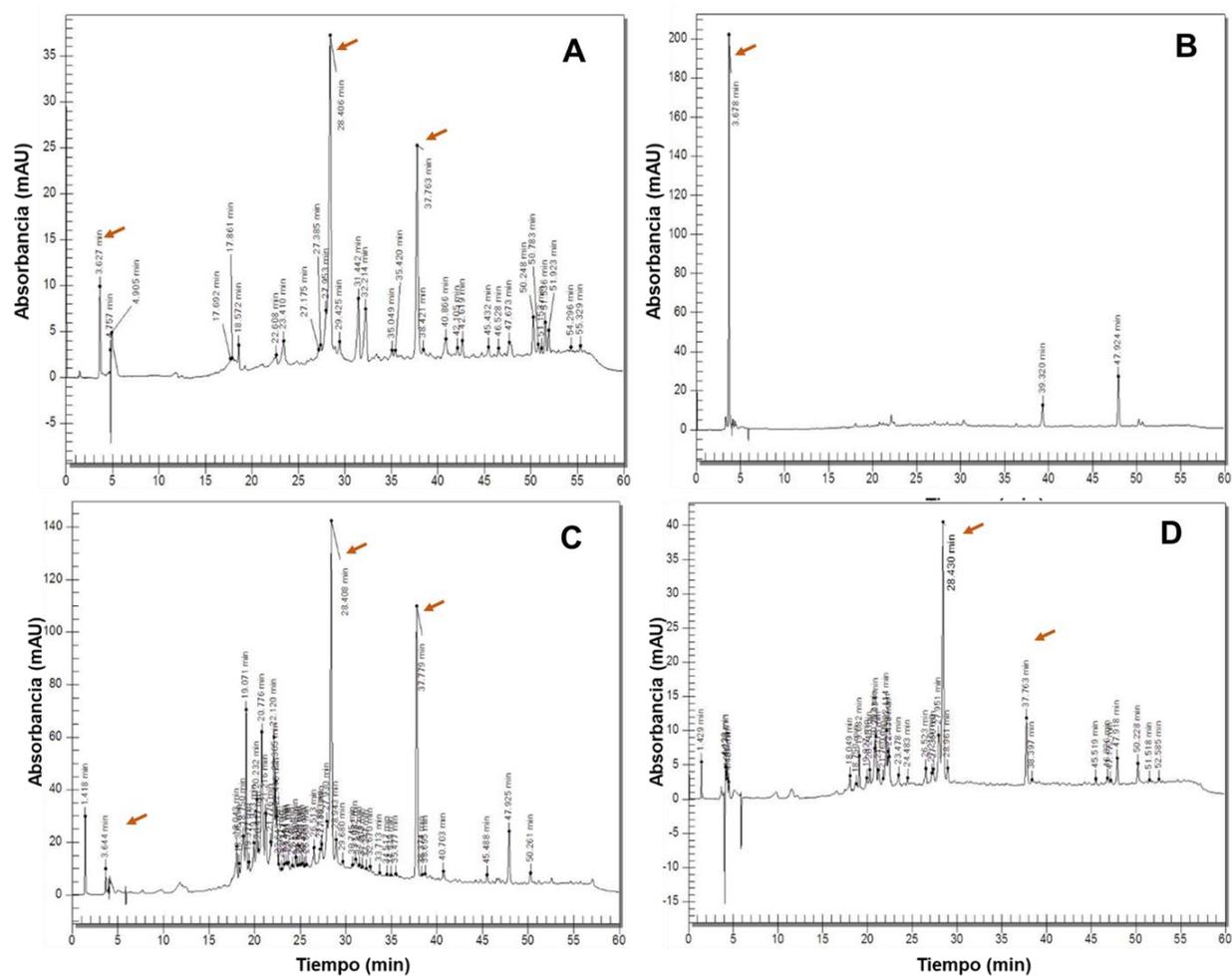
**Figura B5** Perfil cromatográfico de CG/EM de las fracciones F2, F3, HxR2, HxR4 y HxR5 obtenidas por CLV de los extractos *n*-hexánicos de fruto y de raíz de *D. anisandra*.

Se aprecian las estructuras de la plumbagina (1), ácido *n*-hexadecanoico (2), escualeno (3), vitamina E (4), lupeol (5), ácido 9,12-octadecadienoico (6), sitosterol (7), estigmasterol (8), betulina (9), ácido pentadecanoico (10), ursa-9(11),12-dien-3-ona (11) y urs-12-en-3-ona (12).

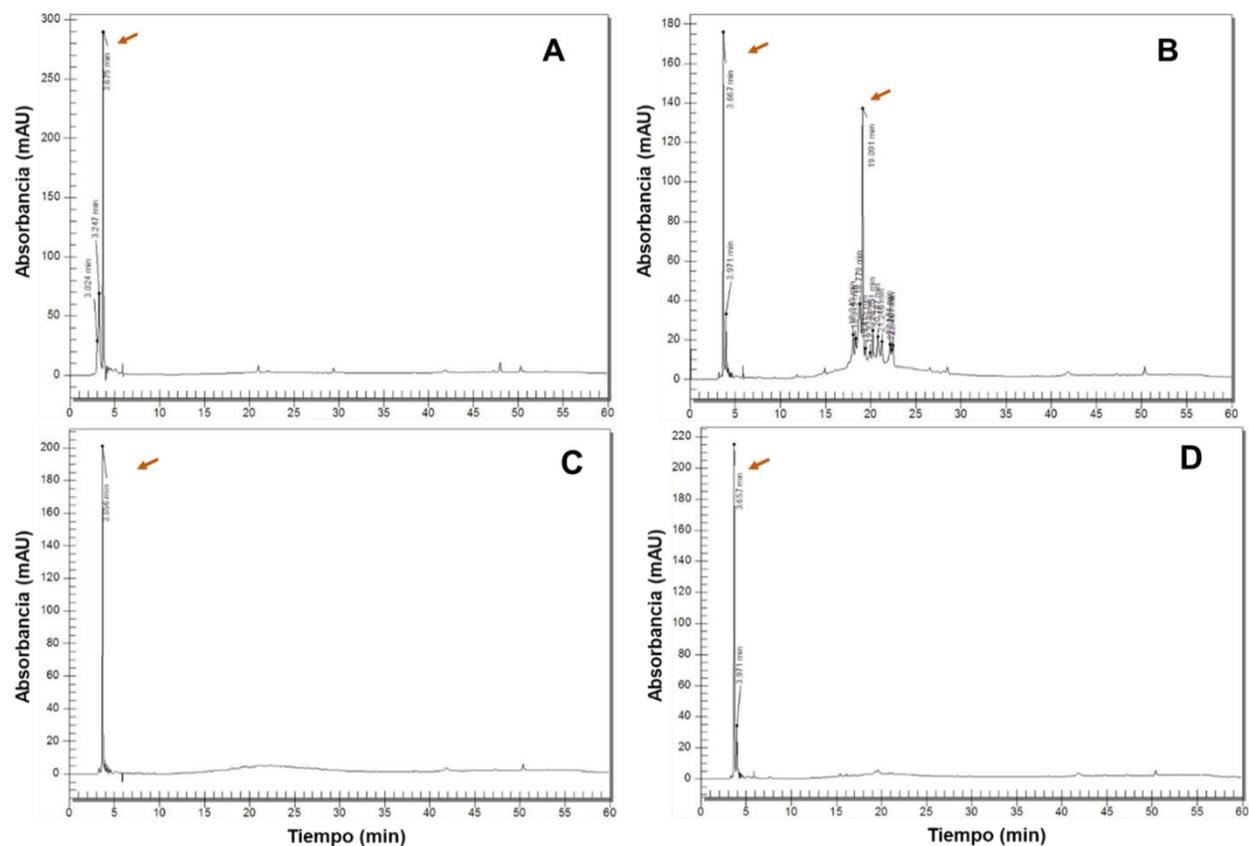


**Figura B6** Perfil cromatográfico de CG/EM de fracciones obtenidas de raíz.

La fracción R4 obtenida por CLV del extracto de acetato de etilo (AcOEt) de raíz de *D. anisandra* mostró picos con tiempos de retención que corresponden a las estructuras de la plumbagina (1), sitosterol (7), betulina (9), 8b,13:13,17-Diepoxi-14,15-bis-norlabdano (13) y  $\beta$ -tocoferol (14).



**Figura B7** Perfil cromatográfico por HPLC de los compuestos presentes en extractos de AcOEt de corteza (A), fruto (B), hoja (C) y tallo secundario (D) de *D. anisandra*



**Figura B8** Perfil cromatográfico por HPLC de los compuestos presentes en extractos acuosos de fruto (A), hoja (B), tallo secundario (C) y raíz (D) de *D. anisandra*

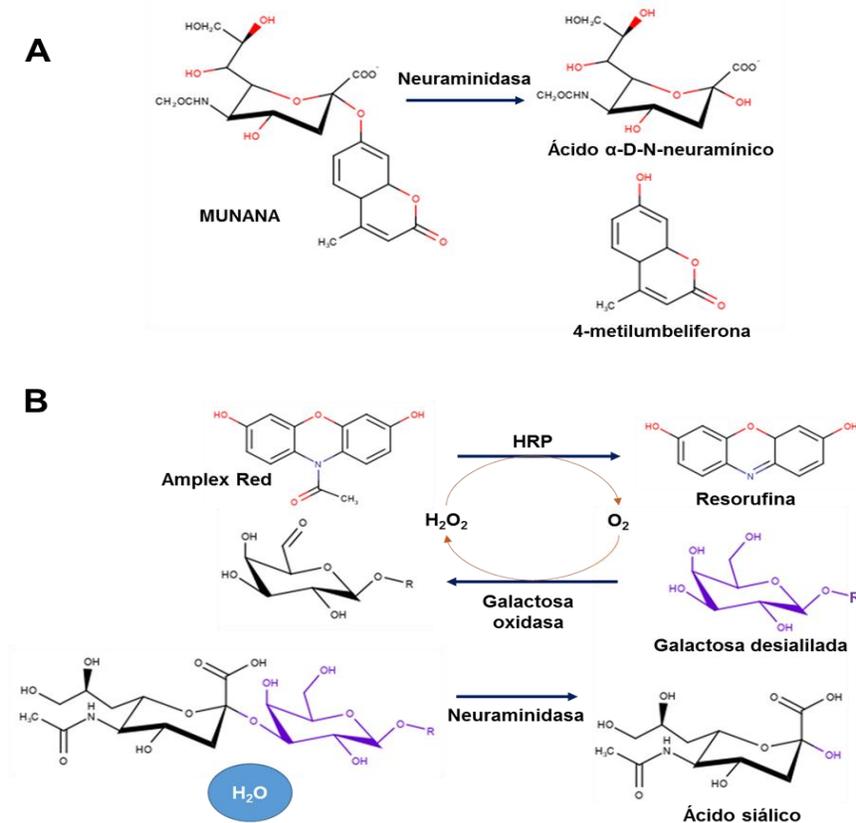
---

## APÉNDICE C. Metodologías

### *C1. Fundamento de los ensayos fluorescentes y quimioluminiscentes de actividad sialidasa.*

Uno de los ensayos emplea como sustrato sal hidratada de ácido 2'-(4-(metilumbelliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA), la enzima actúa directamente sobre este liberando umbeliferona (figura C.1A) dicha molécula absorbe a 325 nm en ácido y 365 nm en álcali; mientras que su emisión máxima es 460 nm (Fink & Koehler, 1970). El segundo es el kit comercial Amplex® Red, a diferencia del primero requiere de reacciones adicionales, el sustrato es fetuína (no fluorescente), una glicoproteína sobre la que actuará la neuraminidasa generando ácido sialico y una galactosa desialilada y agua, dicha galactosa desialilada es sustrato de la galactosa oxidasa liberando peróxido de hidrógeno que reacciona con la peroxidasa de rábano (HRP) y amplex red para generar resorufina; esta última es la molécula fluorescente que indica la actividad de la neuraminidasa (figura C.1B).

Entre los kit quimioluminiscentes encontramos el NA-Star, donde el sustrato (sodio (2-cloro-5-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il-fenil-5-acetamido-3,5-dideoxi- $\alpha$ -D-glicero-Dgalacto-2-nonulopiranosido)onato), genera un compuesto quimioluminiscente por intervención de la neuraminidasa viral, dicha quimioluminiscencia es detectada por un luminómetro.



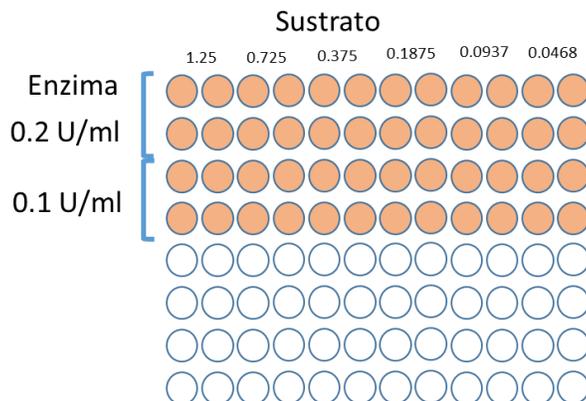
**Figura C1.1** Reacción enzimática del ensayo de inhibición de la neuraminidasa mediante fluorescencia.

La reacción que se lleva a cabo mediante NA-Fluor™ (A) y Amplex® Red (A). Imágenes tomadas y modificadas de Quosdorf *et al.*, 2017 y Gamaleldin *et al.*, 2017).

### C2 Protocolo de la de determinación de las condiciones de trabajo para la sialidasa comercial de *C. perfringens*

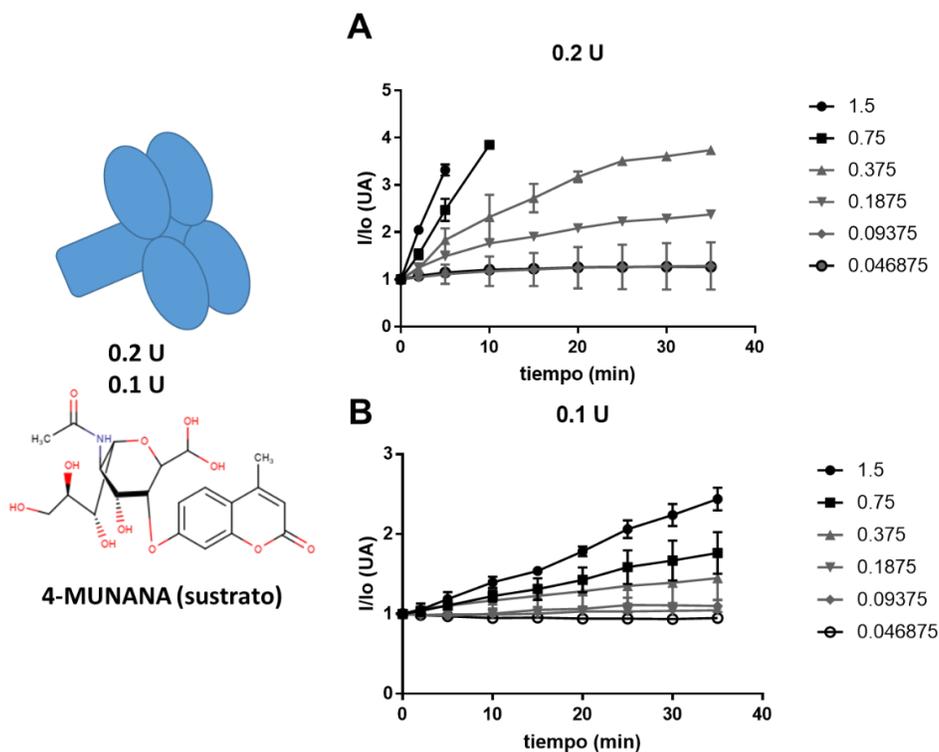
Las condiciones iniciales consistieron en evaluar las concentraciones de enzima y sustrato para este ensayo, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Uddin *et al.*, 2016), distribuyendo las concentraciones como se observa en la figura C2.1. En la figura C2.2 se observó que la mejor actividad se logra a una concentración de enzima de 0.2 U a las tres concentraciones más altas de sustrato, mientras que a 0.1U no se observa una velocidad máxima durante el tiempo que se realizaron las lecturas (30 minutos). Por lo que se llevó a cabo nuevamente otra evaluación comparando las dos concentraciones de enzima únicamente con las concentraciones más altas, y se observó que la concentración de 0.2 U/ml mostró mejor actividad, además volumen del buffer no tiene efecto significativo en las mediciones (Figura C2.3A) Finalmente que a una

concentración de enzima de 0.2 U/ml y una solución de 4-MUNANA de 0.5 mM fueron las seleccionadas para trabajar durante el ensayo (Figura C2.3B).

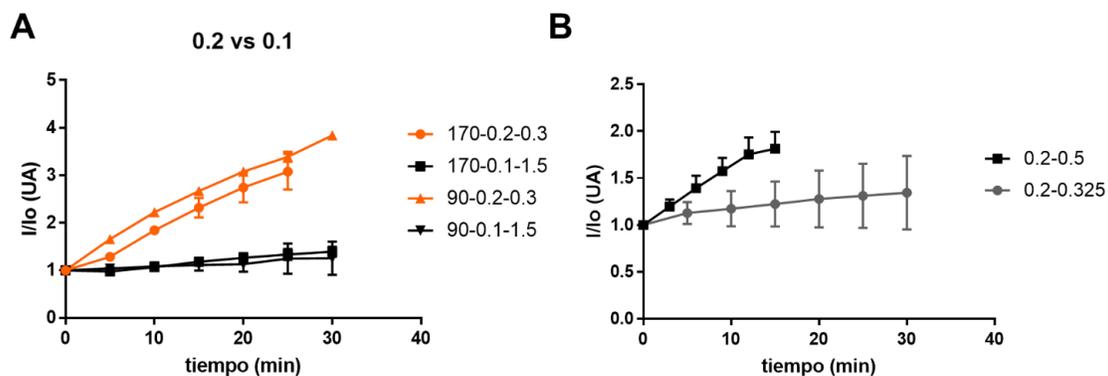


**Figura C2.1** Distribución de las pruebas realizadas en una placa 96 pozos.

Las dos primeras filas corresponden a la concentración de 0.2 U/ml de enzima y seguida por 0.1 U/ml. A partir de la columna 1 a 12 se colocaron diluciones seriadas del sustrato.



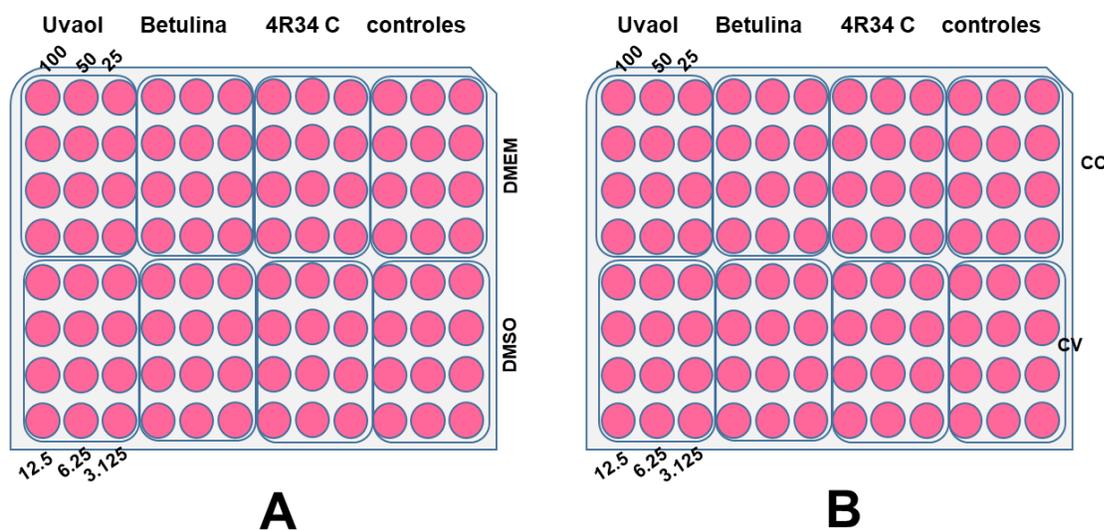
**Figura C2.2** Evaluación de la actividad neuraminidasa a dos concentraciones de enzima (0.2 U y 0.1 U) y de sustrato (1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.09375 y 0.046875 mM).



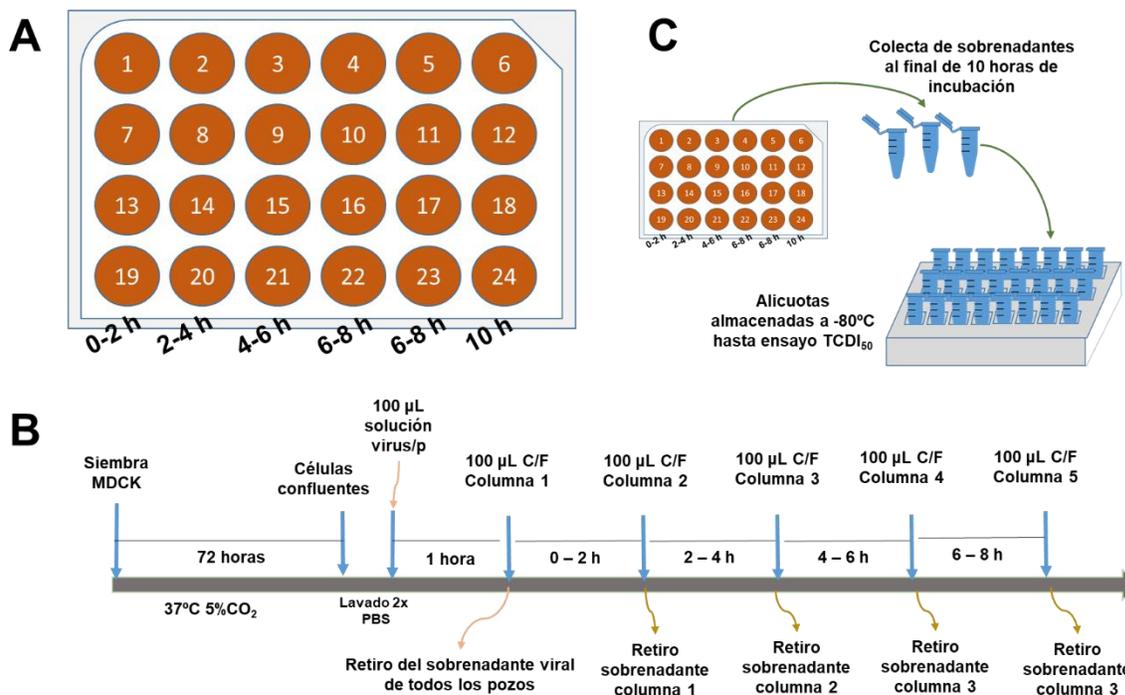
**Figura C2.3** Establecimiento de las condiciones del protocolo del ensayo de inhibición de la neuraminidasa.

Se utilizaron las concentraciones candidatas para establecer el protocolo (0.2-0.327 y 0.1 U-1.5) y su relación respecto a dos volúmenes distintos de reacción (A). Comparación de dos concentraciones de sustrato (0.5 y 0.325 mM) utilizando 0.2 U de enzima (B).

### C3 Ensayos de citotoxicidad y antivirales

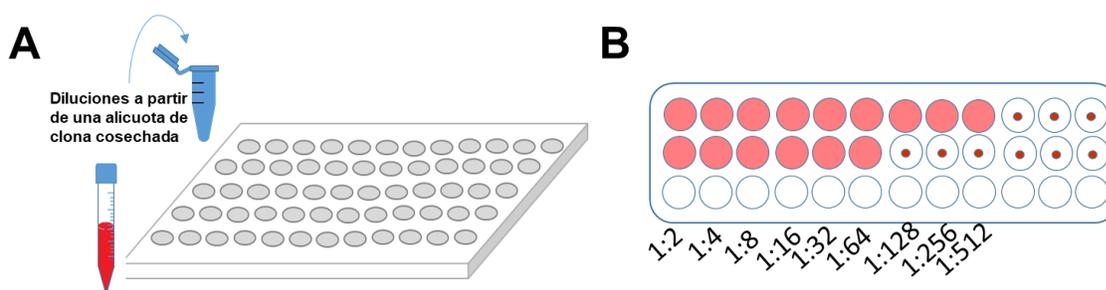


**Figura C3.1** Distribución de los compuestos y fracciones sometidos a ensayos de citotoxicidad (A) y reducción del efecto citopático (B), con sus respectivos controles, donde CC es control celular sin infección viral y CV control de células infectadas.



**Figura C3.2** Ensayo de un solo ciclo.

Placa de 24 pozos donde se visualiza la distribución por cuadruplicado de la adición de los compuestos a distintos tiempos de incubación (A). Línea de tiempo desde la siembra de células MDCK, infección y adición de los compuestos en un ensayo de un solo ciclo de infección viral (B) y la obtención de alícuotas para su posterior determinación del título viral (C).

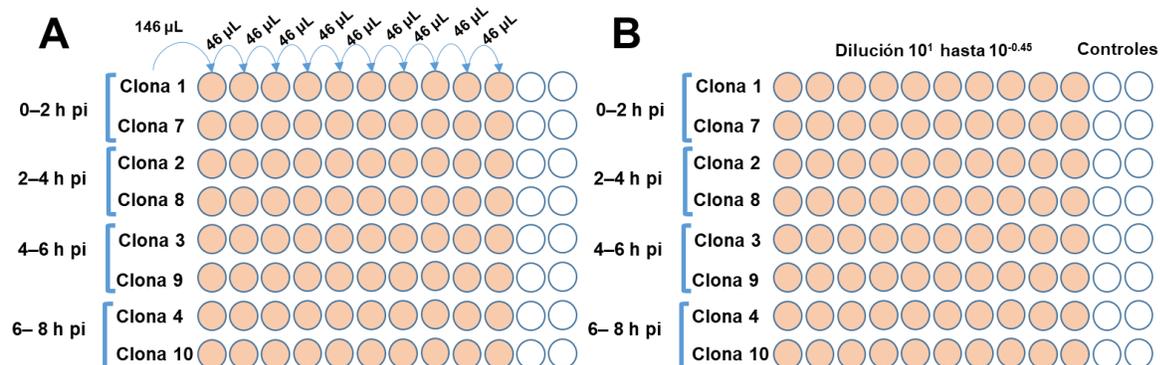


**Figura C3.3** Ensayo de hemaglutinación

El ensayo se lleva a cabo en una placa de 96 pozos de fondo U, donde se adicionan 50 µL de la dilución viral + 50 µL de una solución al 1% de eritrocitos de pavo (A) para determinar el título viral en función de la aparición de un punto rojo al fondo de la placa (B).

#### C4 Metodología y cálculos para TCID<sub>50</sub>

Se procedió a tomar 146  $\mu$ L del sobrenadante del ensayo de un solo ciclo (alícuotas que se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) y se colocaron en la primera columna de una microplaca estéril de 96 pozos de fondo V, a partir de la columna 2 se colocaron 100  $\mu$ L de medio DMEM (columna 2 a 10). Posteriormente se toman 46  $\mu$ L de la columna inicial y se agregan al siguiente pozo (columna 2) haciendo diluciones seriadas hasta el pozo número 10 (Figura D.4A). Una vez realizadas las diluciones, se toman 100  $\mu$ L de la dilución más diluida hasta la más concentrada, colocándola en los pozos respectivos de la microplaca con células (Figura D.4 B), dichas microplacas se incuban en un periodo de 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , al final de ese tiempo se desecha el sobrenadante, se lavan con solución de PBS dos veces y se tiñen con cristal violeta.



**Figura C4.1** Metodología para TCID<sub>50</sub>.

En una microplaca de 96 pozos fondo V, a partir del pozo de la columna 2, se colocaron 100  $\mu$ L de DMEM, en la primera columna se colocaron 146  $\mu$ L de la clona correspondiente y a partir de ese volumen se tomaron 46  $\mu$ L en el siguiente pozo y así sucesivamente hasta los pozos de la columna 10 (A). Posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L de cada dilución y se adicionaron en las microplacas de fondo plano (previamente con monocapa de células MDCK confluyente) y se incubó cada microplaca durante 1 hora (B).

Una vez que las microplacas han sido teñidas, de manera visual por cada repetición de la dilución correspondiente, se realizan los cálculos de la siguiente manera tomando como ejemplo la placa de la figura C.4.2:

1. Calcular la distancia proporcional (DP):

$$DP = \frac{(\% \text{ por encima del } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ por encima del } 50\% - \% \text{ por debajo del } 50\%)}$$

$$DP = \frac{(80 - 50)}{(80 - 0)} = 0.375$$

2. Identificar el exponente de la dilución que está por encima del 50%:

Identificamos que la dilución inmediata por encima del 50% es  $10^{-6}$ , por lo tanto el exponente es -6

3. Restar al exponencial de la dilución el valor de DP calculado y sustituir dicho valor en la base:

$$-6 - 0.375 = -6.375$$

$$\frac{1}{10^{-6.375}} = 2.37 \times 10^6$$

4. Calcular el TCID50 por cada ml: en este caso se agregaron 100  $\mu$ L de cada dilución

$$\frac{2.37 \times 10^6}{0.1 \text{ ml}} = 2.37 \times 10^8$$

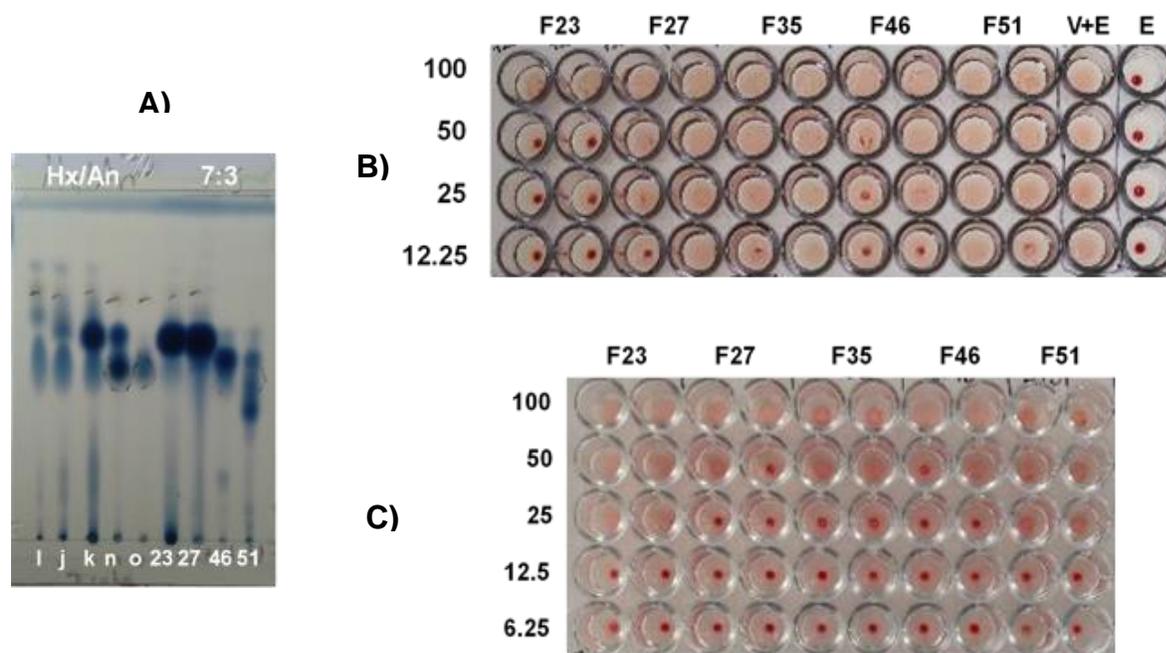
5. Calcular los PFU por ml y para ello solo el resultado anterior se multiplica por la constante 0.69

$$2.37 \times 10^8 * 0.69 = 1.635 \times 10^8 \text{ PFU/ml}$$

Dilución										Control	% Muerte	
10 <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	100
10 <sup>-2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	100
10 <sup>-3</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	100
10 <sup>-4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	100
10 <sup>-5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	100
10 <sup>-6</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	80
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

**Figura C4.2** Microplaca de 96 pozos donde se ejemplifica el porcentaje de muerte en función de diluciones del virus.

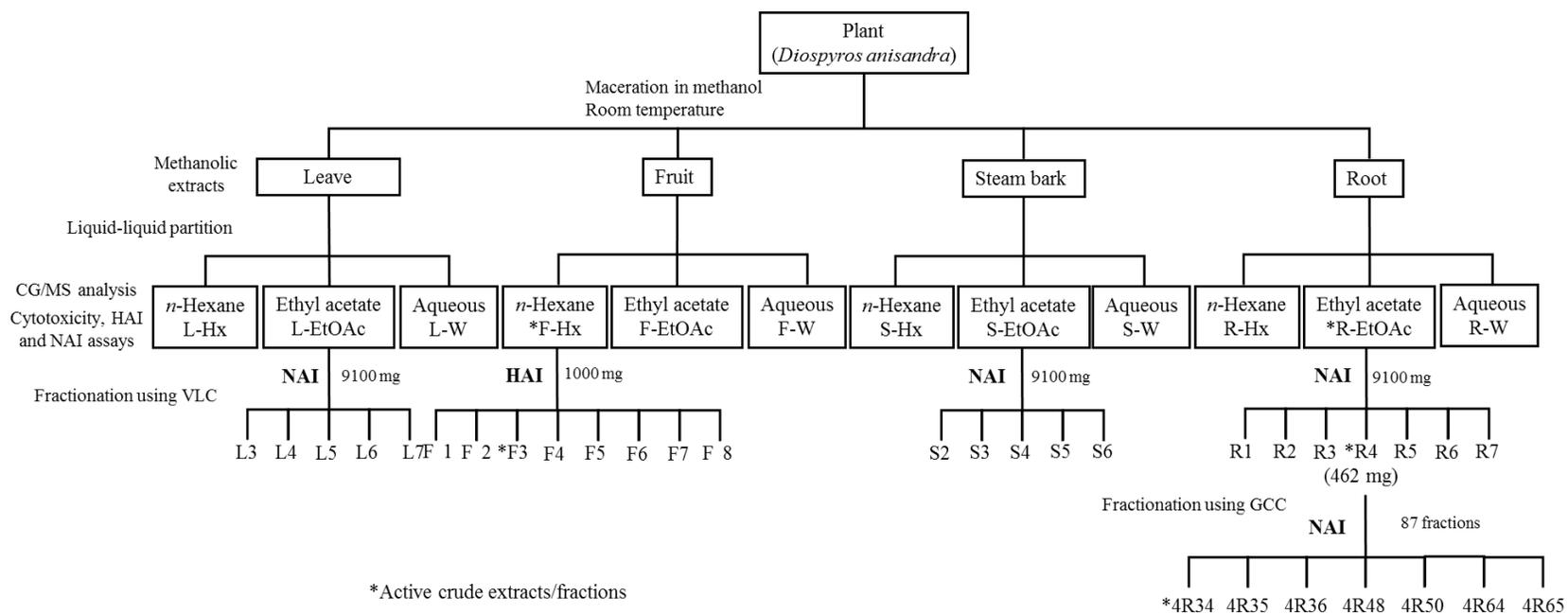
## APÉNDICE D. Material adicional Capítulo IV



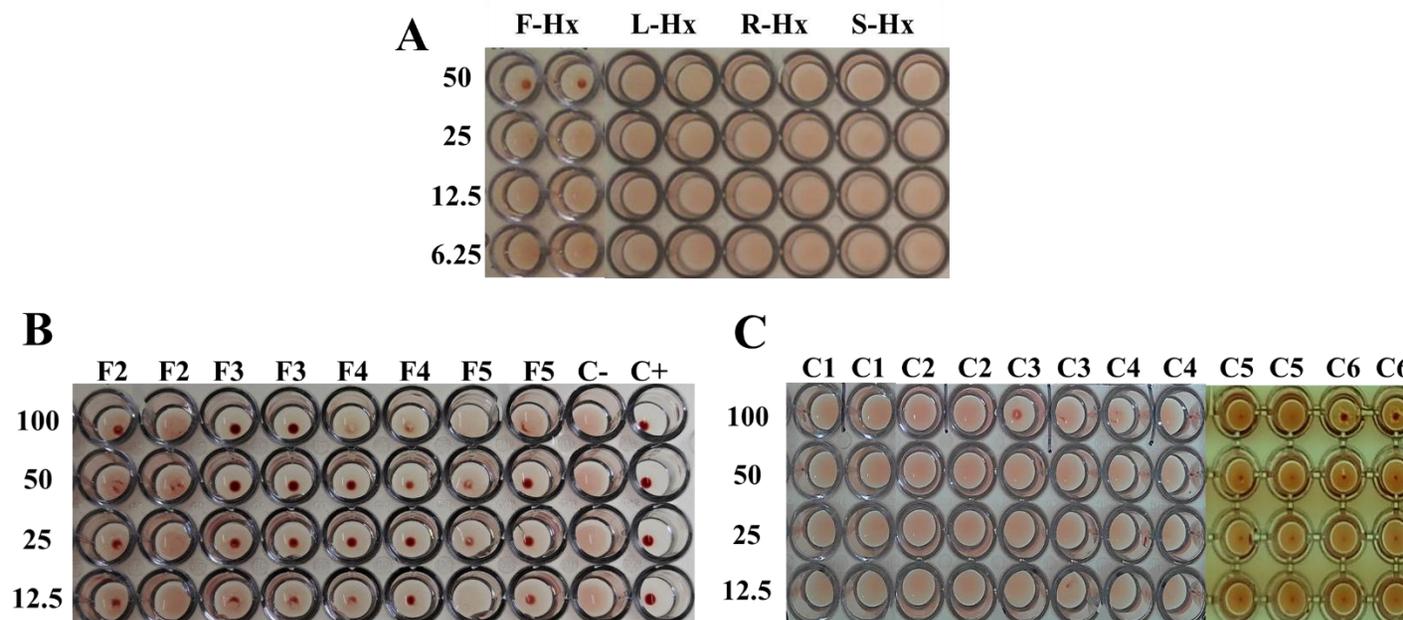
**Figura D1** Monitoreo por CCD de subfracciones de fruto de *D. anisandra* y ensayos de inhibición de la HA.

El análisis por CCD muestra las subfracciones obtenidas de un segundo fraccionamiento de la F3 del fruto de *D. anisandra* (A). Ensayo de hemaglutinación de subfracciones a partir de F3 del fruto (B). Efecto de la concentración de subfracciones de F3 sobre eritrocitos de pavo (C).

## APÉNDICE S. Supplementary material

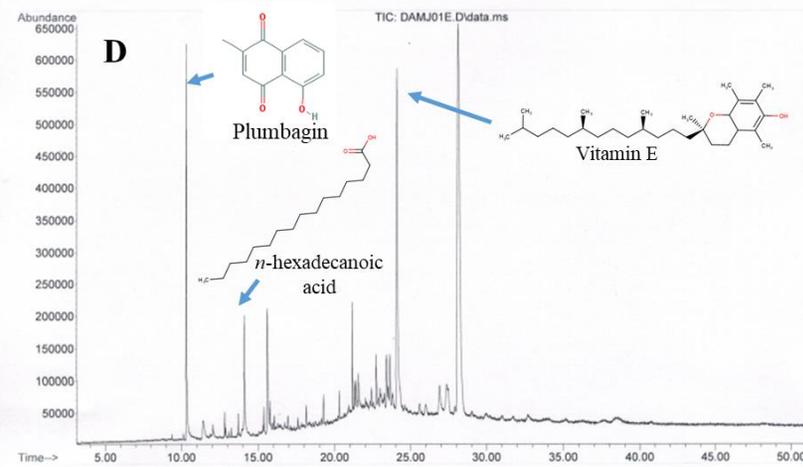
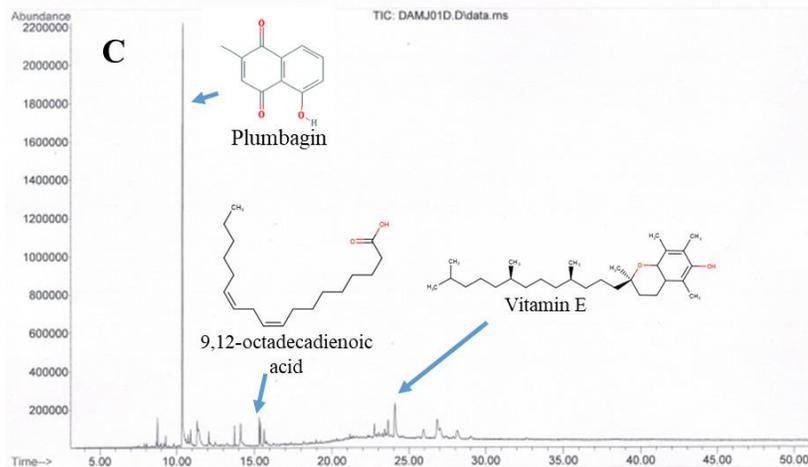
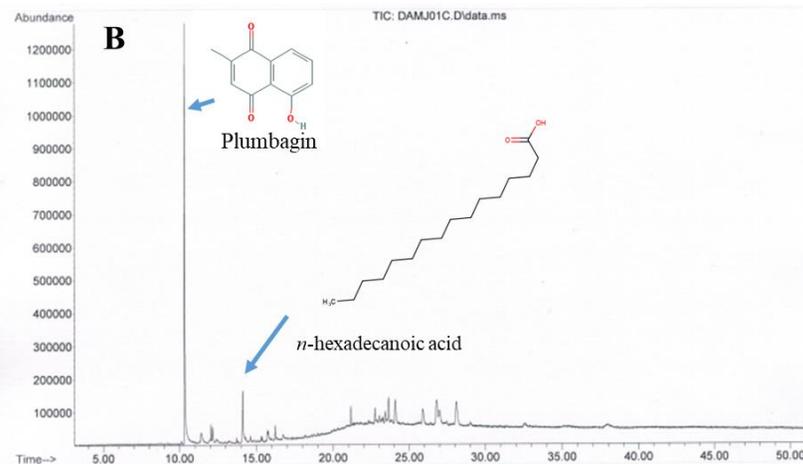
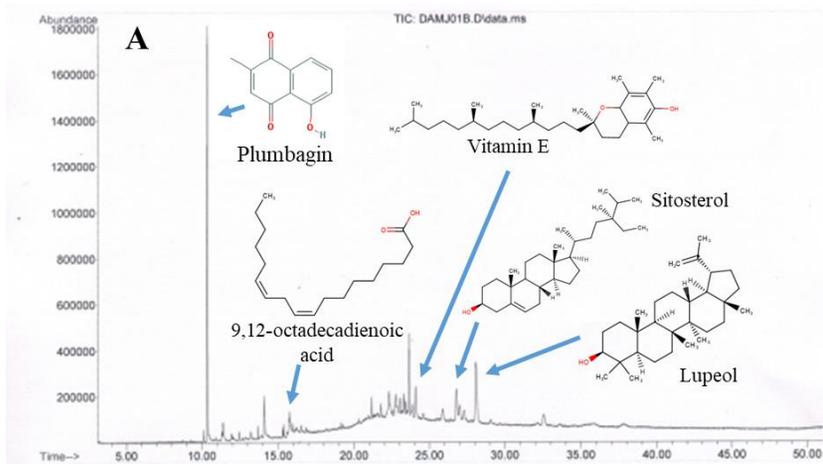


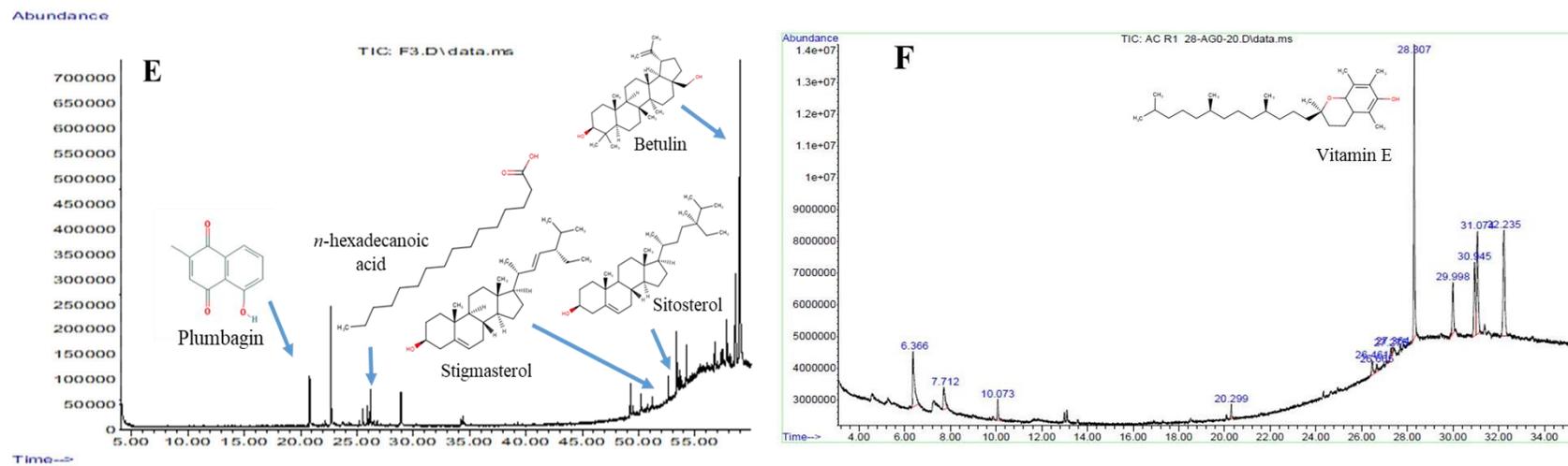
**Figure S1** Procedure of extraction and fractionation based on haemagglutinin inhibition (HAI), and neuraminidase activity inhibition (NAI) of leave (L), fruit (F), stem bark (S), and roots (R) from *Diospyros anisandra*.



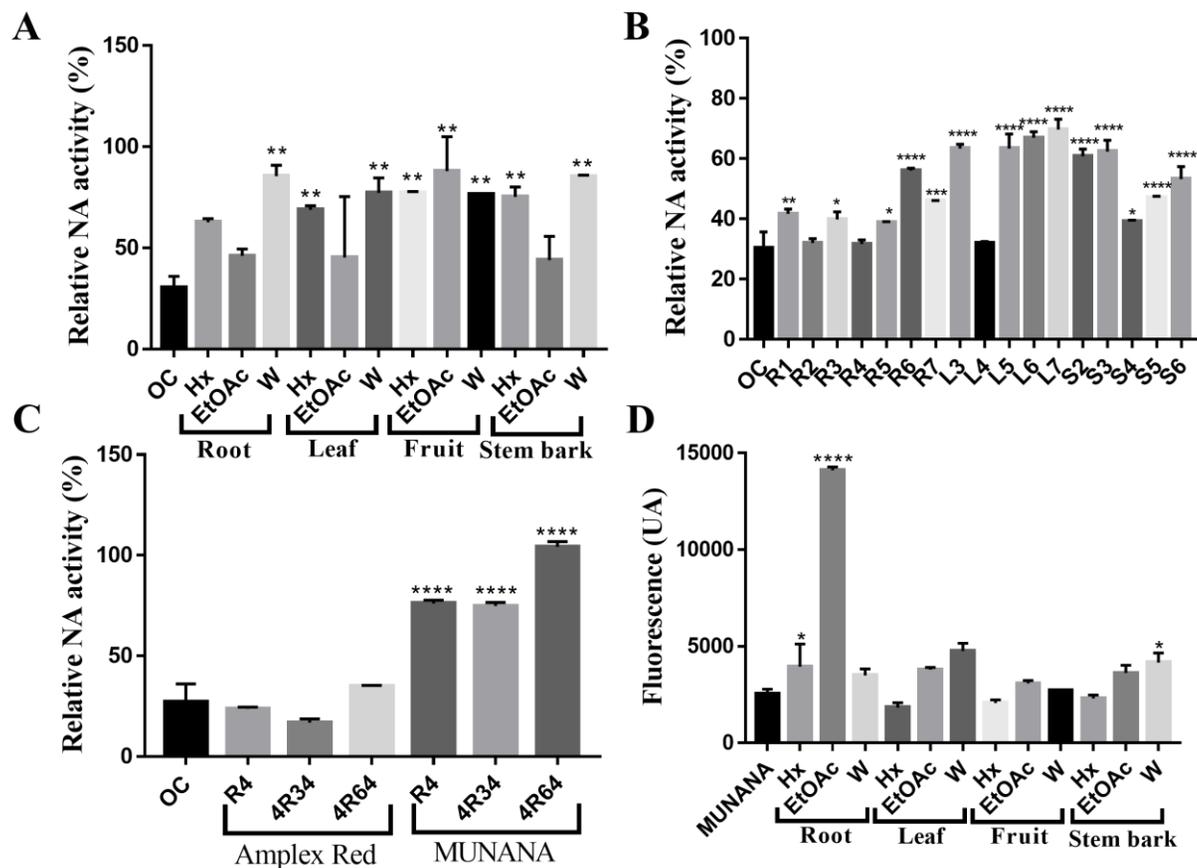
**Figure S2** Haemagglutination inhibition (HAI) assay.

HAI assay of *n*-hexanic extract of the fruit (F-Hx), leaf (L-Hx), root (R-Hx), and stem bark (S-Hx) from *D. anisandra* to 50, 25, 12.5, and 6.25 µg/ml (A). 1 Haemagglutination inhibition (HAI) assay of fractions obtained by VLC from the *n*-hexane extract of *D. anisandra* fruits (B), and pure compounds [plumbagin (C1), trans-9,12-octadecadienoic acid (C2), vitamin E (C3), β-sitosterol (C4), betulin (C5), and lupeol (C6)] (C) to 100, 50, 25, and 12.5 µg/ml.



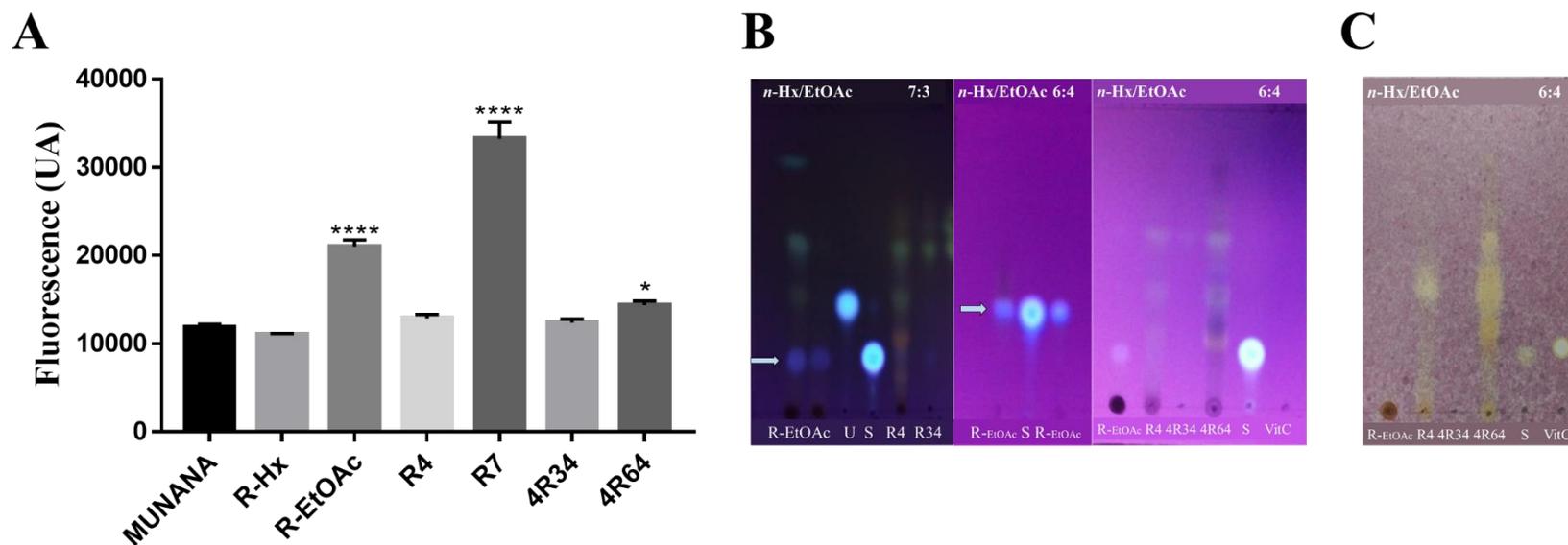


**Figure S3** Chromatogram of *n*-hexane extracts from leaves (A), fruits (B), roots (C), and stem (D), fraction F3 of *n*-hexane fruit extract (E), and EtOAc root extract (F) from *D. anisandra*.



**Figure S4** Neuraminidase inhibition (NAI) activity.

NAI assay of *n*-hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous (W) extracts (A), and NAI activity of fractions from root (R1-R7), leaf (L3-L7) and stem bark (S2-S6) fractions obtained from EtOAc extracts using Amplex Red assay (B). NAI activity of root fractions (R4, 4R34, and 4R64) using Amplex Red (AR), and MUNANA enzymatic assay using a positive control oseltamivir carboxylate (CO) (C). Fluorescence emission at 535 nm of *n*-hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous (W) extracts (D). Statistical analysis Dunnett's Test,  $p < 0.05$ .



**Figure S5** Fluorescence analysis.

Fluorescence emission at 535 nm of *n*-hexane (R-Hx) and ethyl acetate (R-EtOAc) extracts compared with R-EtOAc fractions (R4, 4R34, 4R64) (D) (**A**), Dunnett's Test,  $p < 0.05$ . Thin-layer chromatography of active fractions from *D. anisandra* compared with scopoletin (S) and umbelliferone (U) observed under UV at 365 nm (**B**), and plate sprayed with DPPH (0.2% in methanol) using as positive control vitamin C (**C**).

**Table S1 GC/MS analysis with retention times (RT) and peak area of components identified according to NIST library in *n*-hexanic extracts (fruits, roots, stem bark, and leaves), ethyl acetate roots extract, and fraction F3 from *n*-hexanic fruit extract of *D. anisandra*.**

Plant part	Peak	RT (min)	Compound	Peak area %
Fruits (F-Hx)	1	10.36	5-hydroxy-2-methylnaphthalene-1,4-dione	39.24
	2	15.77	9,12-octadecadienoic acid	5.24
	3	24.07	Vitamin E	5.81
	4	26.78	Sitosterol	5.96
	5	28.08	Lupeol	18.88
Roots (R-Hx)	1	10.34	5-hydroxy-2-methylnaphthalene-1,4-dione	85.01
	2	14.10	<i>n</i> -hexadecanoic acid	14.99
Stem bark (S-Hx)	1	10.36	5-hydroxy-2-methylnaphthalene-1,4-dione	64.6
	2	15.31	9,12-octadecanoic acid	5.17
	3	24.07	Vitamin E	10.74
Leaves (L-Hx)	1	10.33	5-hydroxy-2-methylnaphthalene-1,4-dione	10.33
	2	14.10	<i>n</i> -hexadecanoic acid	4.65
	3	24.09	Vitamin E	23.88
F3	1	20.798	5-hydroxy-2-methylnaphthalene-1,4-dione	4.92
	2	28.899	<i>n</i> -hexadecanoic acid	3.97

	3	52.645	Stigmasterol	1.87
	4	53.359	Sitosterol	5.16
	5	58.99	Betulin	40.53
Root (R-EtOAc)	1	28.307	Vitamin E	27.29

... continuation Table S1.

**Table S2 Cytotoxic activity on MDCK cells of plant part extracts from *D. anisandra* by *n*-hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous extracts (W).**

Solvent	Part	CC <sub>50</sub> (µg/ml)
Hx	Root	15.40 ± 1.16
	Leaf	25.12 ± 1.15
	Fruit	19.69 ± 2.69
	Stem bark	21.80 ± 5.02
EtOAc	Root	8.11 ± 5.27
	Leaf	52.58 ± 3.45
	Fruit	58.70 ± 7.96
	Stem bark	10.16 ± 6.89
W	Root	102.73 ± 3.22
	Leaf	103.59 ± 5.85
	Fruit	80.33 ± 4.39
	Stem bark	109.40 ± 2.88